

# Humorale Immunität gegen Tollwutvirus

bei Hunden, Katzen und Frettchen

Uta Verena Jakel

**Inaugural-Dissertation**  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr.med.vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen



Aus dem Institut für Virologie, Fachbereich Veterinärmedizin der  
Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer:

Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel

eingereicht von

**Uta Verena Jakel**  
Tierärztin aus Dortmund

Gießen 2018

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

Dekan                      Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter                Prof. Dr. H.-J. Thiel  
                                 Prof. Dr. A. Moritz

Tag der Disputation    27.06.2018

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen worden sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Verena Jakel  
11.06.2020

meinem Opa  
meiner Mama  
und meiner Familie



**Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:**

**Publikation:**

**V. Jakel, M. König, K. Cussler, K. Hanschmann, H. J. Thiel.** Factors influencing the antibody response to vaccination against rabies. *Dev Biol (Basel)*, 131:431-437. May 2008.

**Vorträge**

**V. Jakel, H. J. Thiel, K. Failing, M. König.** Nachweis von Antikörpern gegen Tollwutvirus im Rahmen des Reiseverkehrs: Einfluss des Testvirus auf die gemessene Titerhöhe. Internationale Fachtagung „Krankheitsdynamik in Populationen – Bedeutung von Surveillance- und Impfprogrammen“, Sept. 2009.

**V. Jakel, K. Cußler, M. König, K. Duchow, K.-M. Hanschmann, K. Failing, H.-J. Thiel.** Humorale Immunantwort von Heimtieren nach Tollwutimpfung. 29. AVID-Tagung Virologie, Sept. 2010

**Poster-Präsentationen:**

**K. Duchow, C. Kiefert, V. Jakel, H. J. Thiel, M. König, K. Cussler.** Adjuvant-free rabies vaccines: Serological immune respons in cats. 2005, Kiew, Ukraine

**V. Jakel, H. J. Thiel, M. König, K. Duchow, D. Wolff, D. Neubert, C. Kiefert, K. Cussler.** Comparison of serological immune responses in cats and ferrets induced by adjuvanted and non-adjuvanted rabies vaccines. 4TH International Veterinary Vaccines and Diagnostics Conference (IVVDC), Juni 2006, Oslo, Norwegen

„Die Förderung des Vorhabens erfolgte aus Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) aufgrund eines Beschlusses des deutschen Bundestages. Die Projektträgerschaft erfolgte über die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) im Rahmen des Programms zum Entscheidungshilfebedarf.“

## Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde am Institut für Virologie, Fachbereich Veterinärmedizin, der Justus-Liebig-Universität Gießen, unter der Betreuung von Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel und in Zusammenarbeit mit dem Referat S3 - Sicherheit veterinärmedizinischer Mittel, Tierschutz des Paul-Ehrlich-Instituts (Bundesinstitut für Impfstoffe und Biomedizinische Arzneimittel, Langen) angefertigt.

Ich bedanke mich bei allen, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, bei den namentlich Genannten und bei den nicht namentlich Genannten, die mich während des Entstehens dieser Arbeit ideell, moralisch, fachlich, materiell oder in sonst irgend einer Form unterstützt haben. Häufig sind es kleine Dinge, die große Wirkungen zeigen.

- Bei Herrn Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel bedanke ich mich für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Institut anfertigen zu können. Vielen Dank für Ihre Unterstützung und die sorgfältige Korrektur dieser Arbeit!
- Mein besonderer Dank geht an Klaus Cusler für die Überlassung des Themas und für die unermüdliche Unterstützung auf dem langen Weg von der ersten Projektskizze bis zur Fertigstellung. Danke, Klaus, für die schöne Zeit bei dir im Referat!
- Ein ebensolcher besonderer Dank gilt Matthias König, für die wissenschaftliche Anleitung, seinen Zuspruch und seine Geduld und für die vielen Dinge, die ich im diagnostischen Labor lernen durfte.
- Karin Duchow und Manfred Moos danke ich für Unterstützung bei den Impfversuchen und bei der Fertigstellung der Arbeit.
- Helma Wegner danke ich für die Begleitung bei den Blutentnahmen und ihre verlässliche Unterstützung in allen organisatorischen Fragen.
- Mein Dank geht an meine Kolleginnen und Kollegen in den Instituten, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen, die Einarbeitung erleichtert und unzählige Fragebögen für mich verschickt haben: Monika Grimm, Christine Förster, Stefanie Schmeiser, Barbara Bank-Wolf und Dominique Chauvet in Gießen, Andreas Mergel und Andreas Hoffmann in Langen.
- Mein Dank für die Durchführung der Impfungen und Blutentnahmen geht an Christiane Kiefert vom Ernst-Strüngmann-Institut für Neurowissenschaften (vormals Max-Planck-Institut für Hirnforschung), an Daniela Neubert vom Bundesinstitut für Risikobewertung und an Dr. Christiane Ernst von der Schule für Diensthundewesen der Bundeswehr und alle involvierten Kolleginnen und Kollegen in diesen Einrichtungen.
- Karin Thiel und Kerstin Goebler danke ich für die Einarbeitung in die Methoden, Elke Gottfried und Heidi Hanke-Robinson für die Pflege und Hege der Zellen sowie Anna Zitzaff und Sabine Biedenkopf für die kompetente Finanzverwaltung.

- Dankbar bin ich den Diensthundeführern für ihre Mitarbeit, allen Tierärztinnen und Tierärzte, die mir Blutproben geschickt haben sowie den vielen Tierarztpraxen, die Fragebögen ausgefüllt und zurückgesendet haben. Ohne die Daten aus dem Feld wäre diese Studie nicht möglich gewesen.
- Für ihren nicht gerade unerheblichen Beitrag bedanke ich mich aus vollstem Herzen bei den Statistikern Kai-Martin Hanschmann und Klaus Failing.
- Bei den Impfstoffherstellern bedanke ich mich für das Saatmaterial.
- Ein großer Dank gebührt Herrn Thimotheus Kuhrau von der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung.
- Meiner Mentorin Gaby Biemer-Daub danke ich für die Unterstützung, die Einsichten in ihren Arbeitsalltag und ihren bestärkenden Zuspruch.
- Schließlich danke ich der Deutschen Bahn und dem Semesterticket, denn ohne preisgünstige und zuverlässige Transportmöglichkeit wäre die Arbeit an zwei verschiedenen Standorten nicht realisierbar gewesen.
- Ich danke meiner großen und außerordentlich lieben und netten Familie.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Die Tollwut . . . . .	1
1.1.1. Taxonomie des Tollwutvirus . . . . .	4
1.1.2. Wirtsspektrum . . . . .	7
1.1.3. Epidemiologie . . . . .	7
1.1.4. Pathogenese . . . . .	9
1.1.5. Klinisches Bild . . . . .	10
1.1.6. Diagnostik . . . . .	11
1.1.7. Prophylaxe . . . . .	12
1.1.8. Neutralisierende Antikörper und ihre Schutzwirkung . . . . .	12
1.1.9. Impfstoffe . . . . .	14
1.2. Die Bekämpfung der Tollwut in Europa . . . . .	15
1.2.1. Die europäischen Reisebestimmungen für Heimtiere . . . . .	15
1.2.2. Erfahrungen mit den europäischen Reisebestimmungen . . . . .	17
1.3. Fragestellung der vorliegenden Arbeit . . . . .	17
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>19</b>
2.1. Material . . . . .	19
2.1.1. Viren . . . . .	19
2.1.2. Zellen . . . . .	19
2.1.3. Seren . . . . .	19
2.1.4. Medien . . . . .	20
2.1.5. Geräte . . . . .	22
2.1.6. Verbrauchsmaterialien . . . . .	22
2.1.7. Impfstoffe . . . . .	22
2.2. Labormethoden . . . . .	23
2.2.1. Fluorescent Antibody Virus Neutralisation (FAVN)-Test . . . . .	23
2.2.2. Staube-Serumneutralisationstest (SNT) . . . . .	25
2.3. Epidemiologische Datenerhebung und Auswertung . . . . .	25
2.3.1. Fragebogen . . . . .	25
2.3.2. Austitration von Seren aus der Routinediagnostik . . . . .	27
2.3.3. Access-Datenbank . . . . .	27
2.4. Impfversuche . . . . .	28
2.4.1. Impfversuche Katzen . . . . .	28
2.4.2. Impfversuch Frettchen . . . . .	30
2.4.3. Impfversuch Hunde . . . . .	32
2.5. Einfluss des Testvirus (FAVN-Test) . . . . .	34

<b>3. Ergebnisse</b>	<b>37</b>
3.1. Fragebogen . . . . .	37
3.1.1. Hunde . . . . .	37
3.1.2. Katzen . . . . .	52
3.1.3. Compliance . . . . .	55
3.2. Austitration von Seren aus der Routinediagnostik . . . . .	56
3.3. Access-Datenbank . . . . .	58
3.4. Impfversuche Katzen . . . . .	63
3.5. Impfversuch Frettchen . . . . .	65
3.6. Impfversuch Hunde . . . . .	70
3.7. Einfluss des Testvirus (FAVN-Test) . . . . .	70
<b>4. Diskussion</b>	<b>75</b>
4.1. Ergebnisse bei Hunden . . . . .	76
4.2. Ergebnisse bei Katzen . . . . .	83
4.3. Ergebnisse bei Frettchen . . . . .	85
4.4. Sonstige Ergebnisse . . . . .	86
4.5. Einfluss des Testvirus (FAVN-Test) . . . . .	87
4.6. Schlussfolgerungen . . . . .	89
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>95</b>
<b>6. Abstract</b>	<b>97</b>
<b>A. Abkürzungen</b>	<b>99</b>
<b>B. Fragebogen</b>	<b>103</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>107</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>109</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>111</b>

# 1. Einleitung

Mit der Verordnung VO 998/2003/EG sind für das Gebiet der Europäischen Union (EU) einheitliche Regelungen für den Import und das innergemeinschaftliche Verbringen von Heimtieren zu anderen als zu Handelszwecken geschaffen worden. Die Verordnung zielt insbesondere darauf ab, den Import tollwutverdächtiger Tiere sowie eine Verschleppung der Tollwut innerhalb der EU durch Festlegung geeigneter tiergesundheitslicher Anforderungen zu verhindern. Mit der Verordnung wurde dem Umstand Rechnung getragen, dass sich die Seuchensituation bei der Tollwut gemeinschaftsweit seit dem flächendeckenden Einsatz der „oralen Immunisierung von Füchsen“ (OIF) entscheidend verbessert hatte. Einerseits erlaubte die Seuchensituation eine Lockerung der restriktiven Quarantäne- und Einfuhrbestimmungen einiger Mitgliedstaaten, machte aber andererseits restriktivere Anforderungen für den Import von bestimmten Tierarten aus Tollwutendemiegebieten in die EU erforderlich.

Bei der Tollwutprophylaxe kommt der parenteralen Impfung von Heimtieren mit inaktivierten Impfstoffen eine zentrale Bedeutung zu. Die Impfstoffe induzieren die Bildung neutralisierender Antikörper, die als Parameter für einen sicheren Schutz vor der Krankheit gelten. Sobald ein ausreichender Antikörperspiegel vorhanden ist, liegt mit hoher Sicherheit eine protektive Immunität vor. Gemäß Empfehlungen ist ein Titer an neutralisierenden Antikörpern von mindestens 0.5 IU/ml ausreichend [110][78]. Darüber hinaus ist bekannt, dass der zellulären Immunität bei der Vermittlung des Schutzes gegen Tollwut eine wichtige Bedeutung zukommt [103]. Aus einem Titer unterhalb des Grenzwertes kann somit nicht auf das Fehlen einer protektiven Immunität geschlossen werden.

## 1.1. Die Tollwut

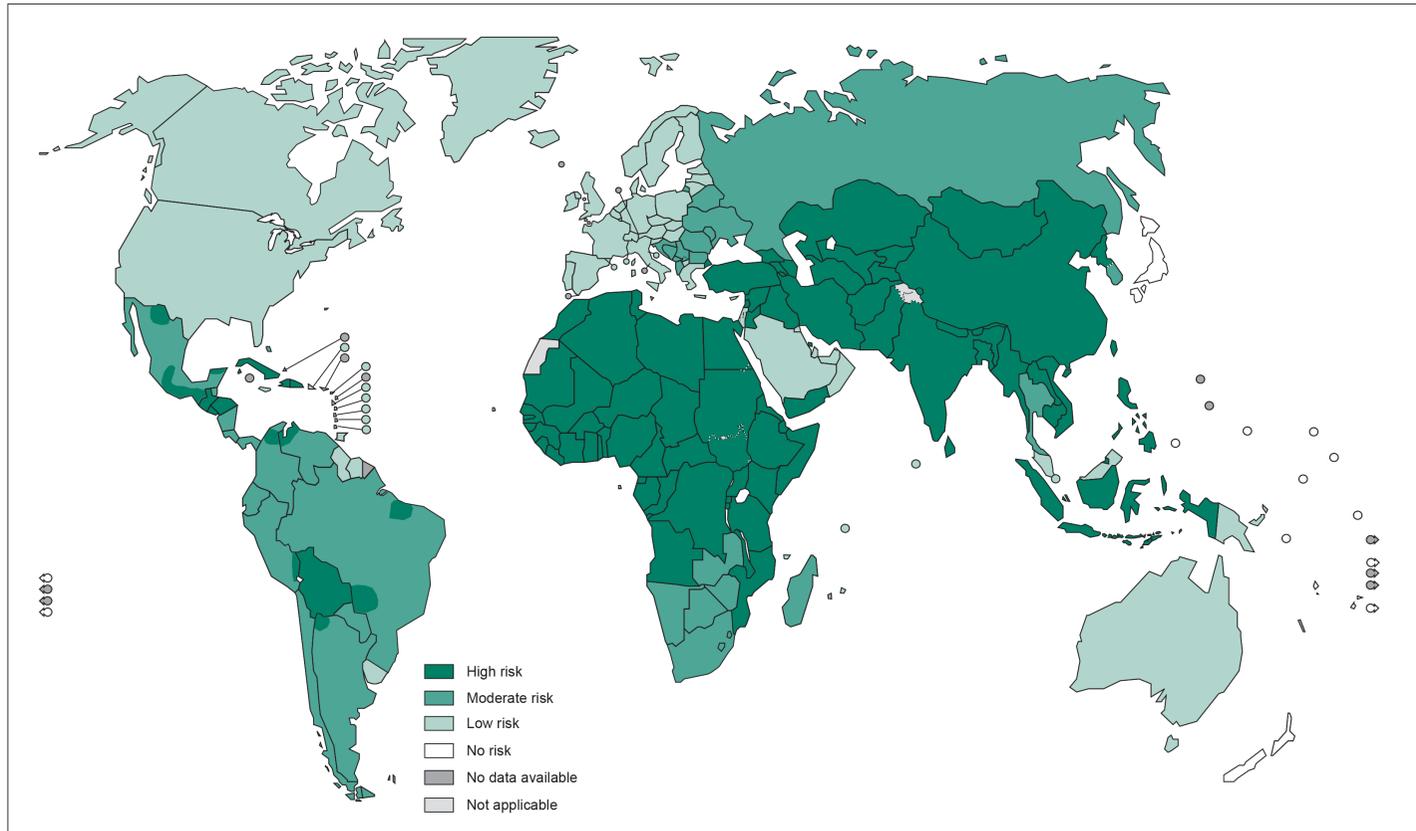
Tollwut ist eine akute, in der Regel tödlich verlaufende Infektionskrankheit der Säugetiere einschließlich des Menschen. Als Zoonose mit einer Letalität von praktisch 100% nach Ausbruch der Erkrankung beim Menschen und den meisten Tierarten spielt sie weltweit eine große Rolle in der Human- und Veterinärmedizin. Trotz weltweiter Anstrengungen in Bekämpfung und Erforschung und der Verfügbarkeit von wirksamen und sicheren Impfstoffen für Menschen und Tiere sowie Immunsereen für den Menschen ist die Tollwut über alle Kontinente mit Ausnahme der Arktis und einiger Inseln endemisch verbreitet (s. Abb. 1.1).

Neben unzähligen Todesfällen bei Tieren ist die Tollwut für jährlich geschätzte 59000 Tote und unzählige, durch tollwütige Hunde zum Teil schwer verletzte Menschen verantwortlich [57][44].

## 1. Einleitung

Die Tollwut war bereits in Babylon im 23. Jahrhundert v. Chr. bekannt [41] und ist vermutlich die erste Krankheit, für welche die Eigenschaft der Ansteckung erkannt wurde. Während Aristoteles (385 - 322 v. Chr.) die Übertragung auf den Menschen ausschloss, wurde der epidemiologische Zusammenhang zwischen dem Biss eines erkrankten Tieres und der „Wasserscheu“ des Menschen wahrscheinlich 300 Jahre später von griechischen und römischen Ärzten erkannt [113]. Übertragungsversuche im 19. Jahrhundert führten schließlich zu der Entwicklung des ersten attenuierten Impfstoffs durch Pasteur [41]. Im 20. Jahrhundert erfolgte die Weiterentwicklung der Impfstoffe zu inaktivierten Gewebe- und Zellkulturvakzinen und die Verbesserung des Schemas für die Postexpositionelle Prophylaxe (PEP) unter Verwendung von Rabies Immunglobulin (RIG). Die Verfügbarkeit von inaktivierten Impfstoffen für Haustiere in Verbindung mit Reisebeschränkungen und die Einführung der OIF führten zur Tilgung der terrestrischen Tollwut in Westeuropa. In den angrenzenden Gebieten konnte die Inzidenz deutlich vermindert werden. Zu Beginn des 21. Jahrhunderts überlebte zum ersten Mal in der Geschichte ein Mensch, der weder prä- noch postexpositionelle Prophylaxe erhalten hatte, eine Tollwuterkrankung nach Ausbruch der klinischen Symptome [21][112].

## Distribution of risk levels for humans contacting rabies, worldwide, 2013



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2014. All rights reserved

Data Source: World Health Organization  
Map Production: Control of Neglected  
Tropical Diseases (NTD)  
World Health Organization



Abbildung 1.1.: Einstufung nach Risikogebieten gemäß WHO.

### 1.1.1. Taxonomie des Tollwutvirus

Hervorgerufen wird die Tollwut durch das Klassische Tollwutvirus, im folgenden als Tollwutvirus bezeichnet. Dieses wird zu der Familie *Rhabdoviridae* gezählt, welche mit den Familien *Bornaviridae*, *Filoviridae*, *Mymonaviridae*, *Nyamiviridae* und *Paramyxoviridae*, *Pneumoviridae*, *Sunviridae* und einer weiteren, bisher unbeannten Familie die Ordnung *Mononegavirales* bildet [51]. Diese Ordnung umfasst Viren mit einem einzelsträngigen, nicht segmentierten RNA-Genom negativer Polarität.

Der Familie *Rhabdoviridae* werden 18 Genera zugeordnet: *Almendravirus*, *Curiovirus*, *Cytorhabdovirus*, *Dichorhavirus*, *Ephemerovirus*, *Hapavirus*, *Ledantevirus*, *Lyssavirus*, *Novirhabdovirus*, *Nucleorhabdovirus*, *Perhabdovirus*, *Sigmavirus*, *Spirivirus*, *Sripuvirus*, *Tibrovirus*, *Tupavirus*, *Varicosavirus*, *Vesiculovirus* und ein weiteres, bisher unbenanntes Genus. Das Tollwutvirus ist eine Spezies des Genus *Lyssavirus*. Diesem Genus wurden bis 2009 die zunächst als Genotypen [17] beschriebenen folgenden sieben Spezies zugeordnet: Klassisches Tollwutvirus (RABV), Lagos Bat Virus (LBV), Mokolavirus (MOKV), Duvenhage-Virus (DUVV), European Bat Lyssavirus Typ 1 (EBLV-1), European Bat Lyssavirus Typ 2 (EBLV-2) und Australian Bat Lyssavirus (ABLV) (s. Tab. 1.1).

Bei diesen Spezies lassen sich phylogenetisch zwei Gruppen unterscheiden. Zur phylogenetischen Gruppe I zählen die Genotypen 1, 4, 5, 6 und 7 (s. Tab. 1.1). Die phylogenetische Gruppe II umfasst die Genotypen 2 und 3 [10][73]. Antikörper gegen das Glykoprotein (G-Protein) zeigen zwischen den phylogenetischen Gruppen keine Kreuzreaktivität. Die Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz der Ekto-domäne des G-Proteins beträgt zwischen den phylogenetischen Gruppen  $\leq 62\%$  und innerhalb der Gruppen  $\geq 74\%$  [10].

In den Jahren 2009, 2011 und 2013 wurden dem Genus *Lyssavirus* weitere, zumeist bei Fledermäusen isolierte Spezies zugeordnet [48][49][50] (s. Tab. 1.2). WCBV und IKOV zeigen keine Kreuzreaktion mit Viren der Phylogruppen I und II und wurden daher in die Phylogruppe III eingeordnet.

Mit Ausnahme des Mokolavirus, dessen Hauptwirt und Epidemiologie nicht geklärt sind [110], haben alle dem Genus *Lyssavirus* zugeordneten Spezies phylogenetisch ihren Ursprung in Fledermäusen. Das Tollwutvirus etablierte sich nach Spillover-Infektionen in Carnivoren [11]. Die Stämme dieser als terrestrische Tollwut bezeichneten Lyssavirusspezies sind für den Großteil der Tollwuterkrankungen beim Menschen verantwortlich. Daneben erfolgen Infektionen mit Tollwutvirus durch Fledermäuse [87][59][58]. Die Genotypen 2 bis 7 werden als „rabies-related viruses“ bezeichnet und können ebenfalls bei Säugetieren und beim Mensch zu Tollwuterkrankungen führen [38][69][19]. Die Virulenz der „rabies-related viruses“ für die einzelnen Fledermausarten ist nicht abschließend geklärt [40].

Phylogenet. Gruppe	Genotyp	Spezies	Abkürzung	Geographische Verbreitung	Vektor
I	1	Klassisches Tollwutvirus (Rabies Lyssavirus)	RABV	Weltweit (Ausnahme: Arktis, einige Inseln)	Carnivoren (weltweit), Fledermäuse (Amerika)
II	2	Lagos Bat Lyssavirus	LBV	Afrika (Sub-Sahara)	fruchtfressende Fledermäuse ( <i>Megachiroptera</i> )
II	3	Mokola Lyssavirus	MOKV	Afrika (Sub-Sahara)	unbekannt
I	4	Duvenhage Lyssavirus	DUVV	südliches Afrika	insektenfressende Fledermäuse
I	5	European Bat Lyssavirus Typ 1	EBLV-1	Europa	insektenfressende Fledermäuse ( <i>Eptesicus serotinus</i> )
I	6	European Bat Lyssavirus Typ 2	EBLV-2	Europa	insektenfressende Fledermäuse ( <i>Myotis sp.</i> )
I	7	Australian Bat Lyssavirus	ABLV	Australien	frucht-, insektenfressende Fledermäuse ( <i>Megachiroptera/Microchiroptera</i> )

Tabelle 1.1.: Klassifizierung des Genus *Lyssavirus* (modifiziert nach [110][51])

Phylogenet. Gruppe	Spezies	Abkürzung	Geographische Verbreitung	Vektor
I	Aravan Lyssavirus	ARAV	Zentralasien	insektenfressende Fledermäuse (isoliert aus <i>Myotis blythi</i> )
I	Khujand Lyssavirus	KHUV	Zentralasien	insektenfressende Fledermäuse (isoliert aus <i>Myotis mystacinus</i> )
I	Irkut Lyssavirus	IRKV	Ostsibirien	insektenfressende Fledermäuse (isoliert aus <i>Murina leucogaster</i> )
III	West Caucasian Bat Lyssavirus	WCBV	Region Kaukasien	insektenfressende Fledermäuse (isoliert aus <i>Miniopterus schreibersi</i> )
II	Shimoni Bat Lyssavirus	SHIBV	Kenia	insektenfressende Fledermäuse (isoliert aus <i>Hipposideros commersoni</i> )
I	Bakeloh Bat Lyssavirus	BBLV	Westeuropa	insektenfressende Fledermäuse (isoliert aus <i>Myotis nattereri</i> )
III	Ikoma Lyssavirus	IKOV	Tanzania	Afrikanische Zibetkatze (isoliert aus <i>Civetticus civetta</i> )

Tabelle 1.2.: Klassifizierung des Genus *Lyssavirus*: 2009, 2011 und 2013 dem Genus *Lyssavirus* zugeordnete Spezies (modifiziert nach [110], [48], [49], [50], [51], [33], [65], [66])

### 1.1.2. Wirtsspektrum

Das Tollwutvirus ist für alle Säugetiere einschließlich des Menschen pathogen. Hinsichtlich ihrer Empfänglichkeit unterscheiden sich einzelne Spezies jedoch deutlich. Die höchste Empfänglichkeit zeigen verschiedene Carnivorenspezies wie Füchse, Coyoten, Schakale und Wölfe sowie einige Nagerarten. Als hochempfänglich gelten Skunks, Waschbären, Fledermäuse, Kaninchen, Rinder, einige Felidenspezies und Schleichkatzen. Eine geringere Empfänglichkeit zeigen Hunde, Schafe, Ziegen, Pferde und Primaten. Vögel und niedere Säugetierarten gelten als wenig empfänglich [43]. Innerhalb der Spezies Tollwutvirus kommt es zu einer ausgeprägten Adaptation von Virusstämmen an einen Hauptwirt, z.B. an eine in einem geographischen Gebiet vorherrschende Carnivorenspezies. Dieses führt zu einer verminderten Virulenz und somit geringeren Erkrankungswahrscheinlichkeit für andere Tierarten [6][14]. Ein Nicht-Hauptwirt scheidet mit geringerer Wahrscheinlichkeit und zudem weniger Virus aus, was wiederum die Wahrscheinlichkeit der Weiterverbreitung und der Übertragung auf den Menschen vermindert. Für die in Westeuropa vorherrschenden, an den Rotfuchs adaptierten Tollwutvirusstämme gelten Nagetiere, Katzen, Waschbären und Rinder als hochempfänglich. Hunde, Pferde, Schafe und Ziegen sind weniger empfänglich als diese. Der Mensch gilt als wenig empfänglich [14].

### 1.1.3. Epidemiologie

Weltweit kommt die terrestrische Tollwut in zwei epidemiologisch getrennten Infektionszyklen vor: der Wildtiertollwut oder silvatischen Tollwut und der urbanen Tollwut, die von Haushund und Hauskatze übertragen wird.

#### Silvatische Tollwut

Das Virus der silvatischen Tollwut zirkuliert in wildlebenden Carnivorenspezies, wobei sich in Abhängigkeit vom regionalen Hauptwirt verschiedene Virusstämme herausgebildet haben [100]. In Eurasien sind die Hauptwirte der Rotfuchs, der Polarfuchs, der Marderhund und der Wolf, in Afrika Schakale und Schleichkatzen, in Nordamerika Füchse, Skunks und Waschbären [43].

Seit Ende der 30er Jahre des 20. Jahrhunderts breitete sich eine Tollwutepidemie unter den Wildtieren Europas, insbesondere in der Fuchspopulation, aus [98][16]. Diese Epidemie nahm ihren Ausgang in Osteuropa und bewegte sich mit einer Ausbreitungsgeschwindigkeit von 20 bis 60 Kilometern pro Jahr westwärts [62]. Mit der Einführung von attenuierten Lebendimpfstoffen zur oralen Immunisierung von Füchsen mittels Ködern Anfang der 1980er Jahre konnte die Seuche zurückgedrängt und in Westeuropa Seuchenfreiheit erreicht werden [85]. Mehrere europäische Staaten haben durch die OIF die Tollwut erfolgreich bekämpft und gelten heute als tollwutfrei, u.a. Frankreich, Luxemburg, Schweiz, Belgien, die Niederlande und Finnland [22]. Deutschland gilt seit dem Jahr 2008 ebenfalls als tollwutfrei [39]. Aufgrund von Ausbrüchen der silvatischen Tollwut in Grenzgebieten hatten Italien (2008) und

## 1. Einleitung

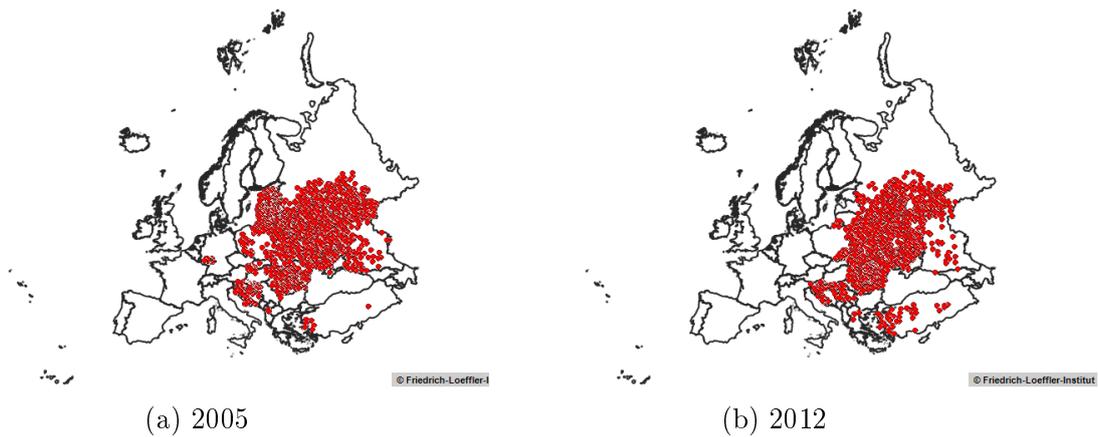


Abbildung 1.2.: Tollwutfälle bei Füchsen in Europa in den Jahren 2005 und 2012. Jeder rote Punkt steht für einen nachgewiesenen und gemeldeten Tollwutfall. Quelle: Rabies Bulletin Europe, WHO Collaborating Centre for Rabies Research and Surveillance, Friedrich-Loeffler-Institut, <http://rbe1.fli.bund.de>

Griechenland (2012) ihren Status als tollwutfrei vorübergehend eingebüßt [76][105]. Die Linie zwischen tollwutfreien Gebieten und Gebieten, in denen die silvatische Tollwut endemisch vorkommt, verläuft aktuell in Europa von Russland über das Baltikum, Polen und den Balkan (s. Abb. 1.2). Ziel aller Bekämpfungs- und Prophylaxemaßnahmen ist die dauerhafte Freiheit der Europäischen Union von terrestrischer Tollwut.

### Urbane Tollwut

Die urbane Tollwut ist in weiten Teilen Afrikas und Asiens, insbesondere Südostasiens, endemisch. Die Virusstämme sind an den Haushund und die Hauskatze adaptiert, so dass vor allem in Gebieten mit größeren Populationen von Straßenhunden und -katzen mit urbaner Tollwut gerechnet werden muss. Diese Tollwutvirusstämme bedeuten ein hohes Infektionsrisiko für den Menschen, da erkrankte Hunde und Katzen als Hauptwirte große Mengen Virus über den Speichel ausscheiden. Die enge Nähe beim Zusammenleben und der direkte Kontakt insbesondere von Kindern mit Hunden und Katzen bedingen ein höheres Risiko für Bissverletzungen durch tollwütige Tiere als die eher zufällige Begegnung zwischen Wildtieren und Menschen. Für Hunde ist nachgewiesen, dass die Virusausscheidung zwei Wochen vor dem Auftreten klinischer Symptome einsetzen kann [36], wodurch es unbemerkt zu Infektionen kommen kann. Gleiches gilt für das klinische Bild der „stillen Wut“, bei dem das Erkennen der Erkrankung erschwert ist. Laut Schätzungen der WHO treten jährlich etwa 59000 humane Tollwutfälle auf [44]. In mehr als 99% wurde die Infektion durch Hunde übertragen. Ein besonderes Problem stellen Straßenhunde dar. 56% der humanen Tollwutfälle ereignen sich in Asien und 44% in Afrika [44][57][110].

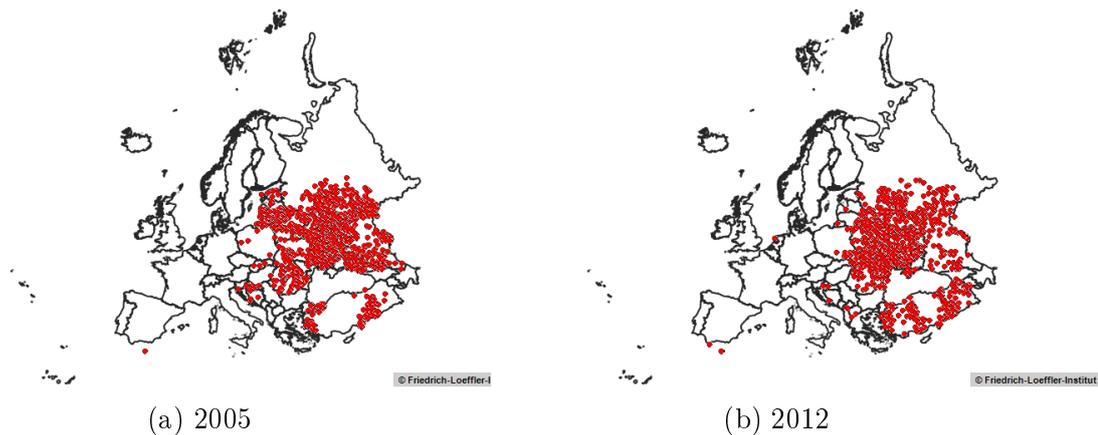


Abbildung 1.3.: Tollwutfälle bei Hunden in Europa in den Jahren 2005 und 2012. Jeder rote Punkt steht für einen nachgewiesenen und gemeldeten Tollwutfall. Quelle: Rabies Bulletin Europe, WHO Collaborating Centre for Rabies Research and Surveillance, Friedrich-Loeffler-Institut, <http://rbe1.fli.bund.de>

Zwischen 30% und 50% der Betroffenen sind Kinder unter 15 Jahren [111]. Darüber hinaus erhalten jährlich 6 bis 10 Millionen Menschen weltweit PEP nach Kontakt mit verdächtigen Tieren.

In der EU gehen autochtone Tollwutfälle bei Hunden meist auf Spillover-Infektionen ausgehend von Wildtieren zurück, was sich aus dem parallelen Vorkommen von Tollwut bei Wildtieren und bei Hunden ablesen lässt (s. Abb. 1.2 und 1.3). Berichte zu urbaner Tollwut liegen aus Bulgarien vor [60][54]. Ferner werden in der Türkei Hunde-adaptierte Tollwutvirusstämme gefunden [52].

#### 1.1.4. Pathogenese

##### Übertragung

Die Übertragung des Tollwutvirus erfolgt in der Regel durch den Kontakt von nicht-intakter Haut oder Schleimhaut mit virushaltigem Speichel. Die häufigste Ursache sind Bisse eines erkrankten Tieres. Infektionen können jedoch auch durch Belegen oder über die Augen erfolgen. Aerogene Infektionen [55][28] und Infektionen durch die Transplantation virushaltiger Organe sind ebenfalls möglich [42][94][45][86].

##### Die Virusausbreitung im Körper

Bei dem Tollwutvirus handelt es sich um ein neurotropes Virus. An der Inokulationsstelle kommt es zu einer Virusvermehrung in Muskelzellen, bevor das Virus über die neuromuskuläre Endplatte in lokale Nervenendigungen gelangt [90][107]. Durch zentripetalen axonalen Transport [13][101] wird es über das Dorsalhorn des Rückenmarks in das Gehirn transportiert [102][110]. Dort kommt es in den Neuronen

## 1. Einleitung

zu einer ausgeprägten Virusvermehrung [63], was mit der Bildung der histologisch sichtbaren, pathognomonischen Negri-Körperchen einhergeht [68]. Die Ausbreitung im zentralen Nervensystem (ZNS) erfolgt durch transsynaptischen Transport. Durch anterograden axoplasmatischen Transport entlang der Gehirnnerven gelangt das Virus schließlich in viele Organe des Körpers [104], wo es mit Einsetzen der klinischen Symptome nachgewiesen werden kann [110][35]. Die Infektion der Speicheldrüsen mit lokaler Virusreplikation führt zu einem hohen Virusgehalt im Speichel [31][15].

### Pathologie

Die Virusreplikation im ZNS ruft eine Enzephalitis hervor; diese bestimmt die klinischen, vorwiegend zentralnervösen Symptome. Bedingt durch die Virusreplikation in den dorsalen Wurzelganglien und die hervorgerufene Ganglionitis kommt es zu Beginn der Erkrankung zu Myalgien an der Eintrittspforte. Bei Beeinträchtigung des Vorderhorns wird das klinische Bild im Folgenden von Krämpfen dominiert, während eine Dysfunktion der peripheren Nerven zu Lähmungserscheinungen führt [110].

### Inkubationszeit

Die Länge der Inkubationszeit ist variabel und von verschiedenen Faktoren abhängig, z.B. von der infektiösen Virusdosis an der Eintrittspforte, der Virulenz des Virusstammes, der Entfernung der Bissstelle vom Gehirn, der Tiefe und Schwere der Bissverletzungen, der Empfänglichkeit des Wirtes und der Konzentration freier Nervenendigungen an der Bissstelle [36][43]. Sie liegt beim Hund meist zwischen 7 und 125 Tagen, in seltenen Fällen auch darüber, und bei der Katze zwischen 9 Tagen und 6 Monaten [6]. Beim Menschen liegt die Inkubationszeit meistens zwischen wenigen Wochen und mehreren Monaten, sie kann aber auch mehrere Jahre betragen [91][53].

## 1.1.5. Klinisches Bild

### Mensch

Während des Prodromalstadiums der Erkrankung kommt es zu unspezifischen Symptomen wie Unwohlsein, Kopfschmerzen, Hyperästhesien und zu psychischen Auffälligkeiten wie Nervosität, Angstgefühlen und Gereiztheit. Fieber kann auftreten. Im weiteren Verlauf verstärken sich die psychischen Symptome und es kommt zu generalisierten Krämpfen, die durch externe Stimuli ausgelöst werden können. Ein schmerzhafter Laryngospasmus verursacht Schluckbeschwerden und Hydrophobie. Schließlich gehen die Symptome in Lähmungserscheinungen über. Die kognitiven Fähigkeiten sind kaum beeinträchtigt. Der Tod tritt ohne intensivmedizinische Versorgung innerhalb weniger Tage durch Erschöpfung und Entkräftung ein, ansonsten nach 7 bis 20 Tagen durch eine aufsteigende Lähmung [110].

Nach Ausbruch der klinischen Symptome ist die Krankheit bei Mensch und Tier praktisch immer tödlich [84]. Es gibt bisher lediglich einzelne Fallberichte über die Genesung von klinischer Tollwut bei Menschen [21][112][30][8].

## Tiere

Beim Hund tritt zumeist die rasende Wut auf. Erkrankte Tiere sind unruhig und leicht erregbar und fallen Artgenossen und Menschen an. Sie können weite Strecken zurücklegen und nehmen Gegenstände auf, die sich post mortem im Magen finden. Der Laryngospasmus äußert sich in Hypersalivation und hellem, heiseren Bellen. Motorische und vegetative Ausfälle und Desorientierung nehmen in der paralytischen Phase zu. Die Virusausscheidung über den Speichel kann bereits zwei Wochen vor dem Auftreten klinischer Symptome einsetzen [36].

Bei Katzen ist meistens eine aggressive Phase mit deutlichen Verhaltensänderungen zu Beginn der Erkrankung zu beobachten [43].

Bei Rindern ist die stille Wut die vorherrschende klinische Verlaufsform, wobei die Tiere durch Apathie und Fressunlust auffallen.

Bei Wildtieren sind der Verlust der angeborenen Scheu vor dem Menschen und Orientierungslosigkeit häufig zu beobachtende Symptome.

### 1.1.6. Diagnostik

Nach Ausbruch der Erkrankung wird die Verdachtsdiagnose Tollwut *intra vitam* zumeist auf Grund der klinischen Symptomatik gestellt [109]. Insbesondere bei Fehlen der klassischen Symptome ist das Erkennen der Erkrankung erschwert. In tollwutfreien Ländern und Gebieten wird die Krankheit mitunter erst spät in die differentialdiagnostischen Überlegungen einbezogen. Nach dem Auftreten klinischer Symptome ist das Virus meistens im Speichel, im Auge, in der Niere und in den peripheren Nervenendigungen in Haarfollikeln der Nackenhaut nachweisbar. Der Virusnachweis kann mittels Färbung von Hautbiopsaten oder Corneaabstrichen mit FITC-markierten Antikörpern oder mittels RT-PCR aus Speichel- oder Liquorproben erfolgen [20][61][26]. Post mortem erfolgt der Virusnachweis durch die Färbung von histologischen Schnitten oder von Abklatschproben des Gehirns mit FITC-markierten Antikörpern. Antikörper im Serum oder Liquor können in der Regel erst in einem späten Stadium der klinischen Erkrankung nachgewiesen werden [26].

In Deutschland werden Füchse, Marderhunde und Waschbären, die mit auffälligem Befund erlegt oder verendet aufgefunden werden, im Rahmen der flächendeckenden Überwachung (Surveillance) auf Tollwutvirus untersucht [4].

Grundsätzlich schließt ein fehlender Virus- oder Antikörpernachweis das Vorliegen einer Infektion nicht aus. Besteht die Möglichkeit der Infektion, kann nur das Abwarten einer ausreichend langen Inkubationszeit eine Infektion mit ausreichender Sicherheit ausschließen (s. Abschnitt 1.1.8).

## 1. Einleitung

### 1.1.7. Prophylaxe

Da für die Tollwut keine spezifische, wirksame Therapie nach Ausbruch klinischer Symptome bekannt ist, kommt der Prophylaxe eine überragende Bedeutung zu. Es stehen wirksame und sichere Impfstoffe für die präexpositionelle Impfung gefährdeter Personengruppen sowie von Haus- und Wildtieren zur Verfügung. Beim Menschen werden inaktivierte, adjuvansfreie Impfstoffe eingesetzt. Für Haustiere stehen adjuvanshaltige Inaktivatimpfstoffe zur Verfügung. Ein rekombinanter Impfstoff, dessen Impfstamm eine das G-Protein des Tollwutvirus exprimierende Mutante des Kanari- enpockenvirus ist, ist für Katzen zugelassen. Alle diese Impfstoffe müssen parenteral verabreicht werden.

Bei einigen Wildtierspezies, z.B. Füchsen und Marderhunden, ist die orale Immunisierung mit attenuierten Lebendimpfstoffen erfolgreich [75][82]. Die orale Immunisierung von Haushunden hat bisher noch keine weite Verbreitung erfahren, obwohl Versuche zeigen, dass die orale Impfung von Hunden mit Ködern grundsätzlich erfolgreich ist [34][80][115].

#### Präexpositionelle Prophylaxe (PrEP)

Eine präexpositionelle Impfung wird Tierärzten sowie Personen empfohlen, die mit Tollwutvirus arbeiten, mit Fledermäusen Kontakt haben oder sich für längere Zeit in einem Risikogebiet der urbanen Tollwut aufhalten [74][110][95]. Nach Abschluss der Grundimmunisierung wird eine Wiederholungsimpfung empfohlen, wenn der Titer neutralisierender Antikörper unter den als schützend angenommenen Wert von 0.5 IU/ml absinkt. Gemäß Empfehlungen der WHO sollen beim Menschen nur noch inaktivierte Zellkulturvakzinen oder gereinigte, inaktivierte Hühnerembryovakzinen angewendet werden [110].

#### Postexpositionelle Prophylaxe (PEP)

Nach Kontakt von Menschen mit vermutet oder nachgewiesen tollwütigen Tieren soll nach den Empfehlungen der WHO eine PEP erfolgen. Je nach Grad der Exposition besteht diese aus der Reinigung und Desinfektion der kontaminierten Gewebe mit Seifenlauge, mehrfacher aktiver Immunisierung und der Verabreichung von RIG.

### 1.1.8. Neutralisierende Antikörper und ihre Schutzwirkung

Durch die Impfung mit den genannten Impfstoffen wird die Bildung von neutralisierenden Antikörpern induziert. Ein Antikörperspiegel von mindestens 0.5 IU/ml zum Zeitpunkt der Exposition korreliert mit einem Schutz vor Erkrankung, da das Virus vor dem Eindringen in die Nervenbahnen neutralisiert werden kann [110]. Bei Tieren konnte dieser Zusammenhang anhand von Belastungsversuchen gezeigt werden [9].

Beim Menschen zielt die PEP auf die schnelle Induktion hoher Titer bzw. die Verabreichung von Antikörpern in den Bereich der Inokulationsstelle ab. Da das Virus

insbesondere bei weniger empfänglichen Wirten längere Zeit an der Inokulationsstelle verbleibt, bevor es in die Nerven gelangt, ist dieses Vorgehen in den meisten Fällen erfolgreich.

Demgegenüber werden intraneuronale Viruspartikel nicht zuverlässig durch Antikörper neutralisiert [104]. Bei Hunden kann eine postexpositionelle Impfung den Ausbruch der Erkrankung nicht sicher verhindern. Nach einer postexpositionellen Impfung ist bei einigen Tieren von einer verkürzten Inkubationszeit berichtet worden, was als „early-death“-Phänomen bezeichnet worden ist [79]. Der Mechanismus dieses Phänomens ist ungeklärt. Behandlungsversuche bei ansteckungsverdächtigen Tieren sind in Deutschland laut Tollwutverordnung und entsprechend Empfehlungen der WHO verboten [4][109].

Als Folge einer Infektion treten messbare Antikörpertiter frühestens unmittelbar vor Einsetzen klinischer Symptome auf. Bei unklarer Impfanamnese kann davon ausgegangen werden, dass ein Titer durch eine Impfung hervorgerufen wurde, wenn innerhalb von 10 Tagen nach der Bestimmung des Antikörpertiters keine Krankheitsanzeichen beobachtet werden [99]. Damit ist jedoch, insbesondere in Endemiegebieten, nicht ausgeschlossen, dass sich das Tier in der Inkubationszeit befindet. Zur Unterscheidung zwischen geimpften, nicht infizierten sowie infizierten Tieren ist es bei möglicher Exposition vor der Impfung erforderlich, eine der Inkubationszeit entsprechende Frist abzuwarten. Nur anhand dieser 4 bis 6 monatigen Wartezeit können Tiere, die sich zum Zeitpunkt der Impfung in der Inkubationszeit befinden, mit ausreichender Sicherheit erkannt werden [109].

Darüber hinaus kann anhand des Titers der Erfolg einer Impfung festgestellt werden. In Analogie zur Humanmedizin (s. Absatz 1.1.7) kann die Notwendigkeit für Wiederholungsimpfungen anhand des Ergebnisses einer Titeruntersuchung bewertet werden. Für diese Indikation existieren bisher jedoch keine Empfehlungen.

Für den Nachweis und die Quantifizierung des Titers neutralisierender Antikörper stehen verschiedene Labormethoden zur Verfügung. Von der WHO und der OIE sind der Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT) und der Fluorescent Antibody Virus Neutralization (FAVN) Test (s. Kap. 2.2.1) zugelassen [92][23]. Die beiden Tests zeigen eine gute Korrelation untereinander [18].

## Maternale Antikörper

Welpen geimpfter Hündinnen sind über maternale Antikörper anfänglich geschützt. Maternale Antikörper interferieren jedoch mit der Ausbildung einer aktiven Immunität [81][7], so dass eine Impfung erst nach deren Verschwinden im Alter von 10 bis 12 Wochen erfolgversprechend ist. Daraus folgt, dass Jungtiere in dem Zeitraum zwischen Schwinden der mütterlichen und dem Aufbau einer belastbaren, aktiven Immunität empfänglich für Infektionen sind [9]. Bei Welpen ungeimpfter Hündinnen ist das Immunsystem frühestens ab der 4. Lebenswoche in der Lage, auf eine Impfung gegen Tollwut mit der Bildung von Antikörpern zu reagieren [7]. Ähnliche Beobachtungen gibt es bei Katzen [93].

### 1.1.9. Impfstoffe

Für die Impfung von Haustieren gegen die Tollwut sind in der EU ausschließlich parenteral zu verabreichende, inaktivierte Impfstoffe zugelassen. Seit 2010 steht zudem ein rekombinanter Impfstoff für Katzen zur Verfügung (s. Kap. 1.1.7). Für die Herstellung der inaktivierten Impfstoffe werden unterschiedliche Laborstämme des Tollwutvirus in Zellkulturen angezüchtet, gereinigt, inaktiviert und mit Adjuvantien versetzt.

Monovalente Impfstoffe enthalten ausschließlich die Tollwutviruskomponente. Polyvalente Impfstoffe enthalten neben der Tollwutviruskomponente Antigene anderer Erreger. Bei Hunden können dies verschiedene Serovare von *Leptospira interrogans*, Staupevirus, Canines Adenovirus, Parvovirus und Parainfluenzavirus sein. Bei Impfstoffen für Katzen sind polyvalente Impfstoffe mit Felinem Herpesvirus, Calicivirus und Felinem Panleukopenievirus auf dem Markt. Bei monovalenten Tollwutimpfstoffen ist in der Regel die zeitgleiche, ortstrennte Verabreichung mit Impfstoffen der gleichen Impfstoffpalette zugelassen, die die genannten Antigene enthalten. Daneben ist bei einigen mono- und polyvalenten Tollwutimpfstoffen für Hunde die zeitgleiche, ortstrennte Verabreichung mit Borrelioseimpfstoffen und *Bordetella bronchiseptica*-Impfstoffen zugelassen, bei Katzen mit Chlamydiose- und Leukoseimpfstoffen. Diese Zulassung gilt nur für bestimmte Impfstoffe, die in den Packungsbeilagen aufgeführt werden.

Für die Zulassung eines Impfstoffs muss der Hersteller entsprechend den europäischen und nationalen Vorschriften nachweisen, dass mit dem empfohlenen Impfschema eine ausreichende Wirksamkeit erreicht werden kann. Gemäß Monographie 0451 des Europäischen Arzneibuchs (Ph.Eur.) ist zum Wirksamkeitsnachweis eines Tollwutimpfstoffs und zur Festlegung des Impfschemas bei Hunden und Katzen die Durchführung von Belastungsversuchen vorgeschrieben [32]. Serologische Daten müssen nicht erhoben werden.

#### Empfehlungen zum Impfschema bei Heimtieren

Die in Deutschland zugelassenen inaktivierten Impfstoffe sehen eine Erstimpfung von Hunden, Katzen und Frettchen gegen Tollwut im Alter von mindestens 3 Monaten und regelmäßige Wiederholungsimpfungen vor. Mit der Änderung der Tollwutverordnung im Dezember 2005 wurde die pauschale Begrenzung der Gültigkeit einer Tollwutimpfung auf ein Jahr aufgehoben. Wiederholungsimpfungen müssen innerhalb des Zeitraums durchgeführt werden, den der Impfstoffhersteller für eine Wiederholungsimpfung angibt. Der maximale Abstand zwischen den Impfungen ergibt sich aus den Daten, die in Belastungsversuchen erhoben und den zuständigen Behörden vorgelegt wurden. Je nach Impfstoff und Tierart sind Wiederholungsimpfungen nach 1 bis 4 Jahren durchzuführen.

Nach den für Deutschland erarbeiteten Leitlinien der Ständigen Impfkommision Veterinärmedizin (StIKo Vet) sollte die Grundimmunisierung von Hunden und Katzen gegen Tollwut ab einem Alter von 12 Wochen erfolgen und aus 2 Impfungen im

Abstand von 4 Wochen sowie einer Wiederholungsimpfung ein Jahr später bestehen [96]. Es wird empfohlen, erst nach Abschluss dieses Schemas längere Impfintervalle gemäß den Herstellerangaben anzuwenden.

Die Gültigkeitsfrist einer Impfung ist vom impfenden Tierarzt in Abhängigkeit von den Angaben des Herstellers und unter Berücksichtigung individueller Faktoren, wie z.B. Alter, Erkrankungen und individuelles Expositionsrisiko des Tieres, festzulegen.

## 1.2. Die Bekämpfung der Tollwut in Europa

Die OIE zählt die Tollwut zu den anzeige- und bekämpfungspflichtigen Tierseuchen. In Europa wird sie von den meisten Staaten seit vielen Jahrzehnten bekämpft [24]. Die zu Beginn des 20. Jahrhunderts in Westeuropa vorherrschende Hundetollwut konnte durch Keulung erkrankter und verdächtiger Tiere, Zahlung von Entschädigungen und Verbringungsbeschränkungen zurückgedrängt werden.

Die Fuchstollwut wurde durch die Entwicklung wirksamer attenuierter Impfstoffe und deren flächendeckenden Einsatz im Rahmen der Programme zur OIF zu Beginn des 21. Jahrhunderts in Westeuropa eliminiert. Ergänzend trug die Immunisierung von Haustieren mit inaktivierten Impfstoffen zum Schutz des Menschen und der Haustiere bei.

In Deutschland wurden mit Inkrafttreten der „Verordnung zum Schutz gegen die Tollwut (Tollwutverordnung)“ im Jahr 1991 die allgemeinen und besonderen Schutzmaßnahmen bei Haus- und wildlebenden Tieren festgeschrieben [1].

Da der Reglementierung des Imports und des Verbringens von Tieren im Hinblick auf die lange Inkubationszeit der Tollwut eine besondere Bedeutung zukommt, gelten für den grenzüberschreitenden Transport von Tieren besondere Bedingungen. Die EU hat mit der Verordnung 998/2003/EG Empfehlungen der OIE umgesetzt, um den Import von infizierten Hunden, Katzen und Frettchen in die EU zu verhindern [109]. Darüber hinaus gelten für das Verbringen von Hunden, Katzen und Frettchen innerhalb der Gemeinschaft besondere Bedingungen.

### 1.2.1. Die europäischen Reisebestimmungen für Heimtiere

Für den innergemeinschaftlichen, grenzüberschreitenden Transport muss jedes Tier eindeutig mittels Tätowierung oder Mikrochip gekennzeichnet und gültig gegen Tollwut geimpft sein. Seit 03.07.2011 ist der Mikrochip für neu gekennzeichnete Tiere verpflichtend. Die Tollwutimpfungen sind im Heimtierausweis einzutragen, welcher für jedes Tier mitgeführt werden muss. Für die Impfung sind Impfstoffe zu verwenden, die den Anforderungen der OIE genügen und entsprechend der nationalen Gesetzgebung zugelassen sind. Laut Entscheidung 2005/91/EG ist eine Tollwutimpfung als gültig anzusehen, wenn sie im Rahmen einer Erstimpfung im Alter von mindestens 3 Monaten vorgenommen wurde und mindestens 21 Tage zurückliegt. Wiederholungsimpfungen sind unmittelbar gültig, sofern sie innerhalb der Gültig-

## 1. Einleitung

keitsfrist der vorhergehenden Impfung verabreicht worden sind. Die Gültigkeitsfrist einer Tollwutimpfung ist im Heimtierausweis einzutragen.

Für die tollwutfreien Mitgliedstaaten Schweden, Großbritannien, Irland und Malta galten zunächst für einen Zeitraum von 5 Jahren über diese Bestimmungen hinausgehende, zusätzliche Anforderungen. Diese Frist wurde zunächst bis Ende 2011 verlängert. Seit 01.01.2012 sind die zusätzlichen Anforderungen entfallen.

## PETS

Bis zum 01.01.2012 galt für das Verbringen von Hunden und Katzen aus den übrigen Mitgliedstaaten nach Großbritannien, Irland und Malta das Pet Travel Scheme *PETS*. Für eindeutig mittels Mikrochip gekennzeichnete Tiere musste ein Heimtierausweis ausgestellt werden. Nur danach erfolgte Impfungen gegen Tollwut waren für *PETS* relevant. Der Erfolg der Impfung musste anhand des Antikörpertiters gegen das Tollwutvirus von einem von der EU anerkannten Labor nachgewiesen werden. Entsprechend den Empfehlungen von WHO/OIE wurde ein Titer von mindestens 0.5 IU/ml Serum gefordert [109]. Die Länge des Zeitraums zwischen der letzten Tollwutimpfung und der Blutentnahme war im *PETS* nicht explizit festgelegt. Empfohlen wurden 30 Tage, da erfahrungsgemäß zu diesem Zeitpunkt der Antikörpertiter seinen höchsten Wert erreicht [64][56]. Gerechnet vom Tag der Blutentnahme, welche ein ausreichendes Ergebnis erbrachte, durfte das Tier 6 Monate später in die Länder verbracht werden, in denen *PETS* galt.

## Schweden

Schweden und das Nicht-EU-Land Norwegen forderten ebenfalls eine Antikörperbestimmung, jedoch war der zeitliche Abstand zwischen der letzten Tollwutimpfung und der Blutentnahme explizit festgelegt. Dieser musste mindestens 120 Tage betragen. Lag der Antikörpertiter bei mindestens 0.5 IU/ml, durfte das Tier unmittelbar einreisen. Ergab die Antikörperbestimmung einen niedrigeren Titer, musste das Tier nachgeimpft und erneut die Frist von 120 Tagen bis zur Blutentnahme eingehalten werden.

## Import in die EU

Die Verordnung 998/2003/EG wurde unter der Nummer 576/2013 und in Zusammenhang mit der Durchführungsverordnung 577/2013 im Jahr 2013 neu gefasst. Da für den Untersuchungszeitraum die Bestimmungen der VO 998/2003 relevant waren, wird im folgenden auf die seinerzeit gültigen Bestimmungen eingegangen. Im Hinblick auf die Einreisebestimmungen sind die Vorschriften vergleichbar.

Bei Hunden, Katzen und Frettchen, die in die EU importiert werden sollen, sind die Bedingungen von der tiergesundheitlichen Situation im Herkunftsland abhängig. Im Anhang 2 Teil B der Verordnung 998/2003/EG sind diejenigen Länder gelistet,

die die Anforderungen des Artikels 10 erfüllen und rechtlich den EU-Ländern gleichgestellt sind. Tiere, die aus diesen Ländern in die EU importiert werden, müssen entsprechend den Vorschriften für den innergemeinschaftlichen Transport eindeutig gekennzeichnet sein und eine gültige Tollwutimpfung aufweisen. Liegt für ein Tier kein Heimtierausweis vor, ist ein tierärztliches Gesundheitszeugnis gemäß Verordnung 824/2003 erforderlich. Eine Antikörperbestimmung ist nicht erforderlich.

Für Tiere, welche aus einem nicht gelisteten Drittland kommen oder die sich in den letzten 6 Monaten vor Import in die EU in einem solchen aufgehalten haben, muss eine Tollwutantikörperbestimmung in einem EU-anerkannten Labor durchgeführt werden. Die Blutentnahme darf frühestens 30 Tage nach der letzten Tollwutimpfung erfolgen. Sofern ein Titer von mindestens 0.5 IU/ml gemessen wird, darf das Tier 3 Monate nach der Blutentnahme in die EU einreisen. Diese 3-Monatsfrist gilt nicht für Tiere, die sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme innerhalb der EU befinden und diese z.B. für Urlaubsreisen verlassen.

#### 1.2.2. Erfahrungen mit den europäischen Reisebestimmungen

Erste Erfahrungen mit den harmonisierten Reisebestimmungen haben gezeigt, dass ein beträchtlicher Anteil der entsprechend Herstellerangaben gegen Tollwut geimpften Hunde und Katzen den vorgeschriebenen Titer von  $\geq 0.5$  IU/ml nicht erreicht. Veröffentlichungen aus Frankreich und UK aus den Jahren 2003 und 2004 geben hierfür Werte von 7,4% bzw. 4,12% der untersuchten Hunde an [25][64].

Das Referat Pharmakovigilanz des Paul-Ehrlich-Instituts fragte daraufhin den prozentualen Anteil nicht ausreichender Titerergebnisse bei den zugelassenen deutschen Labors ab. Von den Labors wurde berichtet, dass zwischen 10% und 18% der untersuchten Hunde einen Titer  $< 0.5$  IU/ml aufwiesen. Dieser hohe Anteil nicht ausreichender Titerergebnisse ist aus Sicht des Verbraucherschutzes unbefriedigend und warf die Frage auf, welche Ursachen sich dahinter verbergen. Alle von der EU zur Durchführung der Tollwutantikörperbestimmung zugelassenen Labors müssen regelmäßig an Ringversuchen teilnehmen und so konnte von laborunabhängigen Ursachen ausgegangen werden. Daher war es erforderlich, die in Deutschland eingesetzten Impfstoffe sowie das Impfmanagement bei Hunden und Katzen vor dem Hintergrund der Anforderungen der Reisebestimmungen zu überprüfen.

### 1.3. Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Mit der vorliegenden Studie sollte untersucht werden, inwiefern das von den Herstellern empfohlene Impfschema geeignet ist, bei Hunden, Katzen und Frettchen durch die Impfung gegen Tollwut einen Titer neutralisierender Antikörper von  $\geq 0.5$  IU/ml zu erzeugen. Darüber hinaus sollten Risikofaktoren identifiziert werden, welche insbesondere bei Hunden dazu führen, dass der im Rahmen der Einreisebestimmungen geforderte postvakzinale Mindesttiter nicht erreicht wird.

## *1. Einleitung*

Zusätzlich sollte bei Katzen und Frettchen der Einfluss der in den Tollwutimpfstoffen enthaltenen aluminiumhaltigen Adjuvanzen auf die Entwicklung des Antikörpertiters sowie bei Frettchen der Einfluss der zeitgleichen Verabreichung von monovalenten Impfstoffen gegen Tollwut und gegen Staupe auf die gemessenen Antikörperspiegel bewertet werden.

Die Untersuchungen gliederten sich in zwei Aspekte: Epidemiologische Erhebungen anhand eines Fragebogens und Impfversuche mit Hunden, Katzen und Frettchen. In einem letzten Schritt wurde der Einfluss des Testsystems auf die Testergebnisse bewertet.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Viren

##### Tollwutvirus

- Stamm CVS  
erhalten von Dr. M. König, Institut für Virologie, FB Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität (JLU) Gießen, ATCC: VR 959. Quelle: AFSSA Nancy
- Stamm Flury-LEP  
erhalten von Dr. M. König, Institut für Virologie, JLU Gießen, GenBank-Zugangsnummer DQ099524
- Stamm Virus fixe G52  
erhalten und zur Verfügung gestellt von Hersteller E
- Stamm Pasteur RIV  
erhalten und zur Verfügung gestellt von Hersteller C

##### Staupevirus

- Stamm Onderstepoort  
erhalten von Dr. M. König, Institut für Virologie, JLU Gießen

#### 2.1.2. Zellen

- BHK-21 ATCC: CCL-10. Quelle: AFSSA Nancy
- Verozellen (Nierenzellen von der Afrikanischen Grünen Meerkatze), Quelle: Institut für Virologie, JLU Gießen

#### 2.1.3. Seren

- Rückstellproben aus der Routinediagnostik zur Tollwutantikörperbestimmung
- Seren von Frettchen, Katzen und Hunden, die in den eigenen Impfversuchen gewonnen wurden (s. Kapitel 2.4)

## 2. Material und Methoden

### 2.1.4. Medien

#### Trypsin/EDTA-Lösung

Natriumchlorid (NaCl)	8 g
Kaliumchlorid (KCl)	0,2 g
Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ )	1,44 g
Trypsin (1:250)	2,5 g
Versen (EDTA)	1,23 g
Phenolrot	0,016 g

#### EDTA Stammlösung

KCl	2,5 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	18 g
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	2,5 g
NaCl	10 g
Aqua bidest	1000 ml

#### Trypsin/EDTA-Lösung pH 7,4

Trypsin 1:250 (Fa. Sigma)	2,5 g
EDTA	3,3 mM (1,23 g)
Phenolrot	0,016 g
PBS	ad 1 L

sterilfiltriert, bei 4°C gelagert

#### PBS

NaCl	171 mM
KCl	3,35 mM
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	10 mM
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,84 mM
Aqua bidest	ad 1 L

#### Trypanblau-Lösung

Trypanblau (Serva 37252)	0,25% (w/v)
NaCl	150 mM

in Aqua bidest gelöst, filtriert, bei 4°C gelagert

#### Medium für BHK Zellen

DMEM (Gibco 52100) mit Glutamin (0,75 mg/ml) (Fa. Gibco, Invitrogen)  
supplementiert mit 10% FBS und Penicillin (100 IU/ml)/Streptomycin (0,1 mg/ml)

### **CCM 34 supplementiert mit 100 IU/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin**

Gibco DMEM Pulver (High Glucose)	133,7 g
Aminosäure Stammlösung	200 ml
Biotin- Stammlösung	100 ml
Hypoxanthin-Lösung	260 ml
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	37 g

### **Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)**

Gibco DMEM Pulver (High Glucose)	13,37 g
Glutaminsäure-Stammlösung	20 ml
NaHCO <sub>3</sub>	3,7 g
Aqua Bidest	1000 ml

### **Glutaminsäure-Stammlösung**

L-Glutaminsäure	3 g
Aqua Bidest	800 ml

### **FBS**

Fetales bovines Serum  
getestet auf Freiheit von Mykoplasmen und Viren  
gelagert bei  $\leq -18^{\circ}\text{C}$   
vor der Verwendung bei  $56^{\circ}\text{C}$  für 30 Minuten dekomplementiert  
Lagerung für max. 2 Wochen bei  $2 - 8^{\circ}\text{C}$

### **Sonstige Medien**

Tween 20	Fa. Sigma
Aceton	Fa. Fluka p.A. ad 80% (v/v) verdünnt mit deionisiertem Wasser, gelagert bei $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$
FITC-Konjugat	Centocore anti-Rabiesvirus monoclonal globulin FITC konjugiert, Fa. Microtest

## 2. Material und Methoden

### 2.1.5. Geräte

Brutschrank mit CO <sub>2</sub> -Begasung	Fa. Labotect
Kühlschrank	Fa. Liebherr
Gefrierschrank -70°C	Fa. GFL
Gefrierschrank -20°C	Fa. Liebherr
Vortex MS1 Minishaker	Fa. IKA-Works
Sicherheitswerkbank Klasse II	Fa. Clean Air Technik
Inversmikroskop	Fa. Olympus Optical CO
Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axiovert und Filtermodule	Fa. Zeiss Axiovert
Heizwasserbad	Fa. Memmert
Absauganlage Vacusafe comfort „Vacuboy“	Fa. INTEGRA Biosciences AG
Zentrifuge Megafuge	Fa. Heraeus
Tischzentrifuge	Fa. Gerätebau Eppendorf
Einkanalpipetten 50, 200, 1000ul	Fa. Gilson
Einkanaldispensierpipetten	Fa. Biohit
Mehrkanaldispensierpipetten	Fa. Biohit
Mischpipette	Fa. Biohit
Zählkammer nach Fuchs-Rosenthal	Fa. Fisher Scientific

### 2.1.6. Verbrauchsmaterialien

Pipettenspitzen	Fa. Biohit, Fa. Gilson
Röhrchen 5, 14, 15, 50ml	Fa. Falcon
Zellkulturflaschen	Fa. Falcon
Zellkulturschalen	Fa. Falcon

### 2.1.7. Impfstoffe

In den Impfversuchen mit Katzen, Hunden und Frettchen wurden kommerzielle Tollwutimpfstoffe für Tiere und für den Menschen eingesetzt. Während in den Impfversuchen mit Katzen und Frettchen nur monovalente Tollwutimpfstoffe verabreicht wurden, kamen im Impfversuch mit Hunden mono- und polyvalente Impfstoffe zum Einsatz. Insgesamt wurde eine Vielzahl Chargen eingesetzt, die vom Paul-Ehrlich-Institut (PEI) für den deutschen Markt freigegeben waren.

Die für Haustiere zugelassenen Tollwutimpfstoffe waren inaktiviert und mit aluminiumhaltigen Adjuvanzen versetzt. Alle enthielten gemäß den Anforderungen der Monographie 0451 des Europäischen Arzneibuchs (Ph.Eur.) mindestens 1 IU/Dosis [32]. Die humanmedizinischen Tollwutimpfstoffe waren ebenfalls inaktiviert, aber adjuvansfrei und enthielten mindestens 2 IU/Dosis.

Es kann davon ausgegangen werden, dass alle inaktivierten Impfstoffe bei der Herstellung auf einen deutlich höheren Antigengehalt eingestellt werden, da ihre Wirksamkeit anhand eines hochvariablen Tierversuchs in Mäusen getestet wird [89].

In den Impfversuchen mit Katzen wurden Impfstoffe von vier verschiedenen Herstellern eingesetzt, wobei jeweils ein veterinärmedizinischer und ein humanmedizinischer Impfstoff den gleichen bzw. einen phylogenetisch nahe verwandten Impfstamm enthielt (Impfstoffe A und G sowie Impfstoffe E und H). Anhand des direkten Vergleichs der jeweiligen Impfstoffe sollte der Einfluss des Adjuvans auf die Entwicklung des Tollwutantikörpertiters abgeschätzt werden.

Angaben zu Adjuvans, Virusstamm und Zellsystem bei den eingesetzten Impfstoffen sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst. Aus Gründen der Neutralität wurden die Impfstoffe kodiert. Der Code wird durchgängig für die mono- und polyvalenten Impfstoffe bzw. den jeweiligen Pharmazeutischen Unternehmer verwendet. Die Impfstoffe A bis F sind für Tiere zugelassen und umfassen alle im Studienzeitraum in Deutschland auf dem Markt verfügbaren monovalenten Tollwutimpfstoffe. Bei den Impfstoffen G und H handelt es sich um humanmedizinische Impfstoffe.

Im Impfversuch mit Frettchen wurde ferner ein für Frettchen zugelassener Impfstoff gegen Staupe eingesetzt. Dieser enthält lebendes, attenuiertes Staupevirus.

Tabelle 2.1.: Übersicht über alle in den Impfversuchen eingesetzten Tollwutimpfstoffe gemäß Fachinformationen.

<b>Impfstoff</b>	<b>Adjuvans</b>	<b>Impfstamm</b>	<b>Zellsystem</b>
A	Al-hydroxid	Flury-LEP	Hühnerfibroblastenzellen (HFB)
B	Al-hydroxid	Flury-LEP	Baby Hamster Kidney (BHK)
C	Al-phosphat	Pasteur RIV	BHK
D	Al-hydroxid	Flury-LEP	BHK
E	Al-hydroxid	Virus fixe G52	BHK
F	Al-hydroxid	VP 12	BHK
G	-	Flury-LEP	Primary Chick Embryo Cells (PCEC)
H	-	Pitman-Moore	Human Diploid Cells (HDC)

## 2.2. Labormethoden

### 2.2.1. FAVN-Test

Der Fluorescent Antibody Virus Neutralisation (FAVN)-Test ist eine von der OIE anerkannte Methode zur Quantifizierung von neutralisierenden Antikörpern gegen das Tollwutvirus [23]. Die zu untersuchenden Seren wurden bei 56°C für 30 Minuten (min) inaktiviert. In einer 96-well-Mikrotiterplatte wurden im 4-fach Ansatz 50µl Serum mit 100µl Medium gemischt und eine 3-er Verdünnungsreihe mit fünf Verdünnungsstufen angelegt. Die 6. Reihe wurde als Viruskontrolle nicht in die Verdünnungsreihe einbezogen. Nach Zugabe von 50µl Virussuspension des Stamms CVS mit 100 TCID<sub>50</sub> (30 - 300 TCID<sub>50</sub>) wurde 60 min bei 37°C inkubiert. Dann wurden 50µl einer Suspension BHK-21- Zellen in einer Konzentration von 4x10<sup>5</sup> Zellen/ml

## 2. Material und Methoden

zugefügt und die Platten bei 37°C in 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre für 48 Stunden (h) inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS und einmal mit 80%iger Acetonlösung gewaschen, für 30 min mit 80%iger Acetonlösung fixiert und die Platten nach Abschütten der Acetonlösung für 30 min im Kaltluftstrom getrocknet. Pro Kavität wurden 50µl eines gegen das N-Protein des Tollwutvirus gerichteten FITC-gekoppelten monoklonalen Antikörpers zugefügt und für 60 min bei 37°C oder über Nacht bei 2 - 8°C inkubiert. Das FITC-Konjugat wurde abgeschüttet und jede Platte zwei Mal mit PBS gewaschen. Die Auswertung erfolgte bei 100-facher Vergrößerung qualitativ pro Kavität. Eine Kavität wurde positiv gewertet, wenn spezifische Fluoreszenz mindestens einer Zelle vorhanden war. Der Titer wurde nach Spearman & Kärber berechnet und angegeben als log<sub>10</sub>ND<sub>50</sub>. Dieses ist der negative dekadische Logarithmus der Serumkonzentration, bei welcher 50% der Testreplikat geschützt sind. Anhand des Standardserums der OIE wurde der Titer auf Internationale Einheiten pro Milliliter (IU/ml) umgerechnet. Für die statistische Auswertung der Impfversuche fand keine Umrechnung in Internationale Einheiten statt; die Titer wurden in log<sub>10</sub>ND<sub>50</sub> angegeben. Der Grenzwert von 0.5 IU/ml lag zwischen 1,19 und 1,31 log<sub>10</sub>ND<sub>50</sub>. Die Bewertung und Einteilung der gemessenen Titerwerte (ausreichend bzw. nicht ausreichend) erfolgte für jedes Serum individuell in Abhängigkeit vom Testdurchgang.

Standardseren:

1. OIE-Standardserum mit 0.5 IU/ml, hergestellt aus Seren von Tieren, die mehrfach mit einem breiten Spektrum derzeit aktueller Feldvirusisolate von Haustieren immunisiert worden sind. Aktuell zur Immunisierung von Haustieren gebräuchliche Virusstämme wurden bei der Herstellung dieses Serums nicht verwendet.
2. Naives Hundeserum der OIE, hergestellt aus Seren von nachweislich Antikörpernegativen, ungeimpften und keiner Infektion ausgesetzten Tieren.
3. Negativserum vom Hund, hergestellt aus in unserem Diagnostischen Labor negativ getesteten Seren
4. Internes Standardserum unseres Diagnostischen Labors, hergestellt aus Seren, die zur Routinediagnostik eingesandt wurden. Es sollte daher überwiegend das Antikörperspektrum abdecken, welches die in Deutschland eingesetzten Impfstoffe hervorrufen.

Als Validitätskriterien für die Standardseren wurden die in der Routinediagnostik geltenden Titerwerte zugrunde gelegt. Alle Seren wurden ein Mal untersucht. Eine Wiederholung der Untersuchung mit dem Standardprotokoll erfolgte bei nicht validem Ergebnis für die Standardseren und wenn z.B. aufgrund von Toxizität des Serums oder bakterieller Verunreinigung kein Titerwert ermittelt werden konnte. Bei Titern oberhalb der höchsten Verdünnungsstufe wurden die Seren ein weiteres Mal nach einem leicht modifizierten Protokoll mit einer Vorverdünnungsstufe untersucht. Dazu wurden in einer Kavität der ersten Reihe 10µl Serum mit 260µl Medium gemischt und jeweils 50µl in die 4 Kavitäten der nächsten Verdünnungsstufe überführt,

in denen 100 $\mu$ l Medium vorgelegt waren. Ausgehend davon wurde die 3-er Verdünnungsreihe über fünf Verdünnungsschritte angelegt und das Untersuchungsprotokoll wie oben zu Ende geführt. Als Viruskontrolle blieben die übrigen 3 Kavitäten der ersten Reihe serumfrei.

### 2.2.2. Staupe-Serumneutralisationstest (SNT)

Mit 50 $\mu$ l des zu untersuchenden Serums wurde eine geometrische Verdünnungsreihe in 3-er Stufen angelegt und nach Zugabe von 50 $\mu$ l Virussuspension mit 100 TCID<sub>50</sub> Staupevirus Stamm Onderstepoort 1 Stunde inkubiert. Dann wurden 50 $\mu$ l einer Suspension von Verozellen mit einer Konzentration von 2x10<sup>5</sup> Zellen/ml zugegeben und 3 Tage bei 37°C inkubiert. Zur Kontrolle wurde ein Negativserum und ein internes Standardserum mit bekanntem Titer mitgeführt. Eine Virusrücktitration wurde ebenfalls in jedem Test durchgeführt. Die Auswertung erfolgte im Durchlichtmikroskop bei 10-facher Vergrößerung qualitativ. Viruswachstum äußert sich durch zytopathische Effekte (zpE) im Zellrasen. Der Titer wurde berechnet nach Spearman & Kärber und angegeben als log<sub>10</sub>ND<sub>50</sub> (s. Abschnitt 2.2.1).

Standardseren:

1. ISS Internes Standardserum gegen CDV, Pool aus Hundeseren mit neutralisierenden Antikörpern gegen CDV, gelagert bei  $\leq -18^\circ\text{C}$ .
2. NES Internes negatives Kontrollserum, Pool aus Hundeseren, die im SNT keine neutralisierenden Antikörper gegen CDV aufwiesen, gelagert bei  $\leq -18^\circ\text{C}$ .

## 2.3. Epidemiologische Datenerhebung und Auswertung

### 2.3.1. Fragebogen

Anhand eines Fragebogens wurden Daten von Tieren erhoben, bei denen für Reisezwecke der Tollwutantikörpertiter bestimmt worden war. Es wurde angenommen, dass diese Tiere mindestens eine Impfung gegen Tollwut im Alter von mindestens 3 Monaten erhalten hatten. Zwischen Oktober 2004 und September 2006 wurde der Fragebogen zusammen mit dem Untersuchungsbefund an Tierärzte in Deutschland geschickt, die ein Serum zur Routinediagnostik an das Diagnostische Labor des Instituts für Virologie, Fachbereich Veterinärmedizin, der Universität Gießen gesandt hatten. Mit Hilfe des Fragebogens wurden genaue Angaben zum Tier (Spezies, Rasse, Alter, Reproduktionsstatus), zum verwendeten Tollwutimpfstoff (Datum der letzten Impfung, Name und Chargennummer des Impfstoffs), zur Anwendung anderer Impfstoffe und Arzneimittel innerhalb von 14 Tagen vor und nach der Impfung sowie zur Impfgeschichte erfragt. Die Daten wurden in einer Excel-Datenbank geführt und mit

## 2. Material und Methoden

den bei Einsendung der Blutprobe gemachten Angaben auf dem Untersuchungsantrag abgeglichen. Fehlende Daten wurden, soweit möglich, vervollständigt, Abweichungen vermerkt und unplausible Werte entfernt. Im Zweifel wurden die Daten aus dem Fragebogen belassen. Eine taggenaue Angabe des Geburtsdatums wurde grundsätzlich als plausibel angesehen und übernommen. Bei Tieren, bei denen das taggenaue Geburtsdatum nicht bekannt war, wurde der 1. des Monats bzw. der 1.1. des Jahres der Geburt eingesetzt. Wurde weder auf dem Fragebogen noch auf dem Untersuchungsantrag ein taggenaues Geburtsdatum angegeben oder wichen die Angaben voneinander ab, wurde das Datum des Fragebogens belassen. Das Reiseland wurde aus den Angaben im Untersuchungsauftrag übernommen. Bei einem Großteil der Tiere wurden mehrere Länder als Reiseziel angegeben. Für die Auswertung wurde das Land als Zielland angenommen, dessen Einreisebestimmungen den längsten zeitlichen Abstand zwischen der Impfung und der Blutentnahme vorschrieben.

Über die Mikrochip- oder Tätowierungsnummer wurde in der Accessdatenbank des Diagnostischen Labors überprüft, ob das Tier bereits vorher untersucht worden war oder ob es innerhalb eines Jahres nochmals untersucht wurde. Anhand der entsprechenden Antragsformulare konnte bei den betreffenden Tieren die Impfhistorie verifiziert und die weitere Impfgeschichte in die Excel-Datenbank eingetragen werden.

Bei allen Tieren wurde überprüft, ob sie das laut Tollwutverordnung vorgegebene Mindestimpfalter von 12 Wochen, d.h. 84 Tagen, erreicht hatten und die letzte Impfung höchstens 365 Tage zurück lag. Zudem wurde überprüft, ob die vorgegebenen Fristen von mindestens 30 Tagen zwischen Impfung und Blutentnahme für die Einreise in die EU und von mindestens 120 Tagen zwischen der letzten Impfung und der Blutentnahme für die Reise nach Skandinavien eingehalten worden waren. Die Plausibilität der Angaben zum eingesetzten Impfstoff wurde anhand des Freigabedatums der Chargen überprüft. Für die Auswertung wurden bei Hunden alle zeitgleichen Impfungen mit verschiedenen Kombinationsimpfstoffen der gleichen Impfstoffpalette gegen Staupe, Hepatitis contagiosa canis (CAV-2), Parvovirose, Zwingerhusten (Parainfluenzavirus) und Leptospirose als Standardimpfungen definiert. Tiere, die mit einer beliebigen Kombination dieser Valenzen geimpft worden waren, wurden gemeinsam ausgewertet. Für Katzen wurden analog die Impfungen gegen Katzenschnupfen (Felines Herpesvirus, Calicivirus) und Katzenseuche (Felines Panleukopenievirus) als Standard definiert. Aufgrund der Hinweise aus der Literatur auf eine bessere Wirksamkeit monovalenter Tollwutimpfstoffe wurde lediglich eine separate Auswertung für die Tiere vorgenommen, die mit einem monovalenten Tollwutimpfstoff geimpft worden waren. Impfungen gegen sonstige Krankheiten werden zur Abgrenzung als Nicht-Standard-Impfungen bezeichnet.

Ausschlusskriterien waren Einsendungen aus dem Ausland, unzureichende Angaben zur eindeutigen Zuordnung des Fragebogens zum Untersuchungsauftrag, nicht zu Reisezwecken durchgeführte Untersuchungen und doppelte Einsendungen.

Die Datenerhebung erfolgte in zwei Gruppen. Die Studiengruppe umfasste Tiere, die einen Titer  $<0.5$  IU/ml aufwiesen. Für die Kontrollgruppe wurden Daten von

Tieren erhoben, bei denen ein ausreichender Titer von  $\geq 0.5$  IU/ml gemessen worden war. Für die Auswertung der Daten mit dem Statistikprogramm SAS/STAT Software, Version 9.2, SAS System für Windows, wurden die beiden Gruppen miteinander verglichen. In einer schrittweisen logistischen Regression wurde untersucht, ob signifikante Unterschiede zwischen der Studien- und der Kontrollgruppe bestanden. Als Signifikanzniveau wurde  $\alpha \leq 0.05$  festgelegt. Ein statistisch signifikanter Unterschied ist somit bei p-Werten  $\leq 0.05$  gegeben.

Um den Einfluss der Hunderasse auf das Testergebnis zu untersuchen, wurden diese in Analogie zu Kennedy *et al.* [56] in fünf Größenklassen eingeteilt.

Zur genaueren Analyse des Einflusses der zeitgleichen Verabreichung anderer Arzneimittel wurden die von den Tierärzten genannten, zeitgleich verabreichten Arzneimittel zu folgenden Gruppen zusammengefasst: Corticosteroide, Antibiotika, Schilddrüsenhormone, Antiparasitika, Paramunitätsinducer, Narkose und andere Impfstoffe, d.h. Impfstoffe, die nicht zur Standardimpfung zählen, sowie Impfstoffe, für die keine Zulassung zur zeitgleichen, ortsgetrennten Verabreichung besteht, z.B. Impfstoffe anderer Hersteller.

Die Impfstoffe B und D haben laut Gebrauchsinformationen die gleiche Zusammensetzung und wurden daher in der Auswertung des Fragebogens gemeinsam betrachtet.

#### 2.3.2. Austitration von Seren aus der Routinediagnostik

In der Routinediagnostik wird von jedem Serum eine Verdünnungsreihe mit 5 Verdünnungsstufen angelegt. Weist ein Serum einen Titer oberhalb der höchsten Verdünnungsstufe auf, wird der Titer mit „ $\geq$ “ angegeben. Im Rahmen unserer Untersuchungen wurden die Seren des Jahres 2006 austitriert, bei denen ein Titer oberhalb der höchsten Verdünnungsstufe gemessen worden war und zu denen Angaben aus dem Fragebogen vorlagen.

Der geometrische Mittelwert der Titerergebnisse wurde im Hinblick auf 3 Untergruppen und jeweils getrennt für Hunde und Katzen deskriptiv betrachtet:

1. alle austitrierten Seren
2. austitrierte Seren ohne die Seren von Wiederholungsuntersuchungen nach nicht ausreichendem Titer
3. alle Kontrollseren des Jahres 2006 mit den austitrierten Werten, sofern vorhanden.

#### 2.3.3. Access-Datenbank des Diagnostischen Labors

Für den Zeitraum der Datenerhebung mittels Fragebogen von Oktober 2004 bis September 2006 wurden die Daten aller Hunde, Katzen und Frettchen ausgewertet, bei denen eine Tollwutantikörperbestimmung im Diagnostischen Labor des Instituts für Virologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Universität Gießen erfolgte. Der Auszug aus der Access-Datenbank umfasste Angaben zum Tier, zum Zweck der

## 2. Material und Methoden

Untersuchung (Reise oder Kontrolle), das Herkunftsland des Tierarztes sowie das Ergebnis der Untersuchung. Die Daten wurden deskriptiv ausgewertet und Risikofaktoren für einen Titer  $<0.5$  IU/ml anhand einer logistischen Regression identifiziert.

### 2.4. Impfversuche

Das Ziel der Impfversuche war, unter kontrollierten Bedingungen den Verlauf des Tollwutantikörpertiters nach der Impfung mit kommerziellen Tollwutimpfstoffen bei seronegativen, nicht gegen Tollwut geimpften Hunden, Katzen und Frettchen sowie den Einfluss von aluminiumhaltigen Adjuvanzen auf den Titerverlauf bei Katzen und Frettchen zu untersuchen. Bei Hunden sollte bewertet werden, inwieweit der Zeitpunkt einer Boosterimpfung Einfluss auf den Titerverlauf nimmt. Bei Frettchen sollten die Auswirkungen der zeitgleichen, ortsgetrenten Verabreichung des Staupeimpfstoffs auf den postvakzinal gemessenen Tollwutantikörpertiter untersucht werden.

Die Tiere wurden zu verschiedenen Zeitpunkten jeweils mit einfacher Dosis eines handelsüblichen Impfstoffs gegen Tollwut geimpft. Über einen Zeitraum von bis zu 3 Jahren und 2 Monaten wurden mehrfach Blutproben entnommen und der Antikörpertiter gegen Tollwutvirus gemessen. Ein Anstieg des Antikörpertiters um mindestens 2 Verdünnungsstufen wurde als Serokonversion gewertet. Der Anteil Tiere mit einem Titer  $\geq 0.5$  IU/ml pro Gruppe und Zeitpunkt wurde statistisch ausgewertet. Bei den Frettchen wurde zudem der Antikörpertiter gegen Staupevirus bestimmt.

#### 2.4.1. Impfversuche Katzen

##### Haltung der Katzen

Die in den Versuchen eingesetzten Katzen wurden am Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Frankfurt in konventioneller Gruppenhaltung für Versuchszwecke gehalten. Neben einem Innenraum hatten die Tiere über Katzenklappen Zugang zu einem eingefassten Außenbereich mit Betonboden. Im Innenbereich standen offene und geschlossene Ruheboxen, Hängematten, unterschiedliche Ebenen im Raum, Kratz- und Kletterbäume, handelsübliches Katzenspielzeug und mehrere mit Sägespänen gefüllte Toilettenboxen zur Verfügung. Die Tiere erhielten marktübliches Feuchtfutter für Katzen und Katzentrockenfutter der Fa. Ssniff Spezialdiäten GmbH. Der Zugang zu frischem Trinkwasser zur freien Aufnahme war jederzeit gesichert. Standardmäßig wurden Impfungen gegen Katzenschnupfen und Katzenscheuche durchgeführt.

##### 1. Impfversuch (Katzen)

28 nicht gegen Tollwut geimpfte und serologisch negative Katzen unterschiedlichen Alters und beiderlei Geschlechts wurden in 4 Gruppen zu je 7 Tieren eingeteilt. Die

Tiere der ersten beiden Gruppen wurden mit jeweils einer Dosis eines adjuvanshaltigen, für Katzen zugelassenen Impfstoffs geimpft (Impfstoffe A und E, s. Tab. 2.1). Die Tiere der anderen beiden Gruppen erhielten je eine Dosis eines adjuvansfreien Tollwutimpfstoffs für Menschen (Impfstoffe G und H). 2 Katzen wurden als ungeimpfte Kontrolltiere ebenfalls in die Studie einbezogen.

Am Tag 0 wurde von allen Katzen je 1 ml Blut aus der Vena cephalica gewonnen. Anschließend wurden sie mit einer Dosis Tollwutimpfstoff subkutan geimpft. Die Serumröhrchen wurden noch am gleichen Tag bei 4000 UpM für 10 min zentrifugiert und das Serum gewonnen. Dieses wurde bis zur Untersuchung und nach der Untersuchung bei  $\leq -18^{\circ}\text{C}$  gelagert. Weitere Blutentnahmen fanden an den Tagen 35, 77, 168, 308 und 371 statt (s. Abb. 2.1). Einzelne Tiere schieden zu unterschiedlichen Zeitpunkten aus dem Versuch aus.

Da bei den meisten Katzen der Titer 1 Jahr post vaccinationem (p.vacc.) über dem als schützend angenommenen Mindesttiter von  $\geq 0.5$  IU/ml lag, wurde der Beobachtungszeitraum auf 2,5 bis 3 Jahre verlängert. Weitere Blutentnahme fanden an den Tagen 513, 734 (N=25) und 974 (N=24) statt.

3 Jahre nach der Erstimpfung sollte bei den verbliebenen Katzen der Einfluss einer Wiederholungsimpfung gemessen werden. 6 Katzen erhielten am Tag 974 und 17 Katzen am Tag 1136 nach der Erstimpfung eine weitere Dosis Tollwutimpfstoff. Ein Tier, das keine Wiederholungsimpfung erhalten hatte, schied an Tag 1114 aus dem Versuch aus. Unmittelbar vor sowie 50 (Tag 1024) bzw. 28 (Tag 1164) Tage nach der Wiederholungsimpfung wurde allen Katzen eine Blutprobe entnommen.

Da zwei der ursprünglich eingesetzten Impfstoffe nicht mehr vertrieben wurden, mussten in einigen Gruppen andere Impfstoffe als bei der Erstimpfung eingesetzt werden. Statt Impfstoff A wurde bei der Wiederholungsimpfung Impfstoff B eingesetzt (s. Tab. 2.1). Dieser enthält den gleichen Impfstamm und das gleiche Adjuvans, ist jedoch von einem anderen Hersteller und wird unter Verwendung eines anderen Zellsystems hergestellt. Der einzige noch auf dem Markt befindliche adjuvansfreie, humanmedizinische Impfstoff G wurde für die beiden Gruppen verwendet, die bei der Erstimpfung einen adjuvansfreien Impfstoff erhalten hatten (Gruppen G und H). Der Impfstoff E konnte wie bei der Erstimpfung eingesetzt werden.

Von den Blutproben wurde das Serum wie beschrieben gewonnen, gelagert und im FAVN-Test auf Antikörper gegen Tollwutvirus untersucht. Bei der statistischen Auswertung wurde der Effekt der ersten Impfung mit einem gemischt-linearen Varianzanalysemodell für wiederholte Messungen mit den Faktoren Gruppe, Zeit und Wechselwirkung Gruppe\*Zeit untersucht. Der Effekt der zweiten Impfung wurde mit einem linearen Modell für den Titer 30 Tage nach der zweiten Impfung mit dem Faktor Gruppe und dem zeitlichen Abstand zwischen 1. und 2. Impfung als Kovariable (974 oder 1136 Tage bzw. 32/37 Monate bzw. 2,7/3,1 Jahre) untersucht.

## 2. Material und Methoden

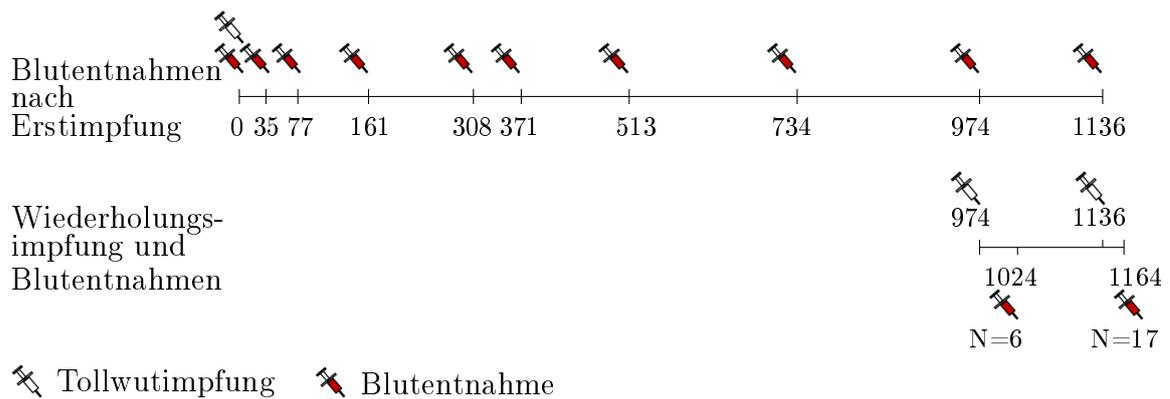


Abbildung 2.1.: Schematische Darstellung der zeitlichen Abfolge der Blutentnahmen und Impfungen im ersten Impfversuch mit Katzen. Nach der ersten Impfung wurde der Verlauf des Tollwutantikörpertiters über einen Zeitraum von bis zu 3 Jahren verfolgt. Ein Teil der Tiere wurde nach 2,5 Jahren erneut gegen Tollwut geimpft und der Titer letztmalig 7 Wochen später bestimmt. Bei den meisten Katzen wurde die Wiederholungsimpfung 3 Jahre nach der Erstimpfung verabreicht und der Titer 4 Wochen später bestimmt.

### 2. Impfversuch (Katzen)

15 nicht gegen Tollwut geimpfte und serologisch negative Katzen beiderlei Geschlechts im Alter zwischen 5 und 10 Monaten wurden mit einfacher Dosis des Impfstoffs B subkutan an der rechten rippengestützten Brustwand geimpft. Die 8 Katzen der Gruppe 1 erhielten 30 Tage später eine weitere Dosis des selben Impfstoffs an der linken rippengestützten Brustwand verabreicht. Die übrigen 7 Tiere bildeten Gruppe 2. Bei allen Katzen wurde jeweils eine Blutprobe an den Tagen 0, 30, 58, 196 und 365 bzw. 379 genommen (s. Abb. 2.2). Zwei ungeimpfte Kontrollkatzen wurden ebenfalls in die Studie einbezogen. Die Gewinnung, Handhabung und Untersuchung der Blutproben erfolgte wie im ersten Versuch. Ein Tier aus Gruppe 1 schied an Tag 163 aus dem Versuch aus. 3 Tiere aus Gruppe 1 und 1 Tier aus Gruppe 2 schieden nach Tag 196 aus.

#### 2.4.2. Impfversuch Frettchen

##### Haltung der Frettchen

Die Frettchen wurden am Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) in Berlin in Gruppen zu 10 Tieren gehalten. Die Käfige waren mit verschiedenen Einrichtungsgegenständen ausgestattet: Plastikrohren, Hütten, Hängematten, Seile. Gefüttert wurde handelsübliches Feuchtfutter für Katzen. Wasser stand ad libitum bereit.

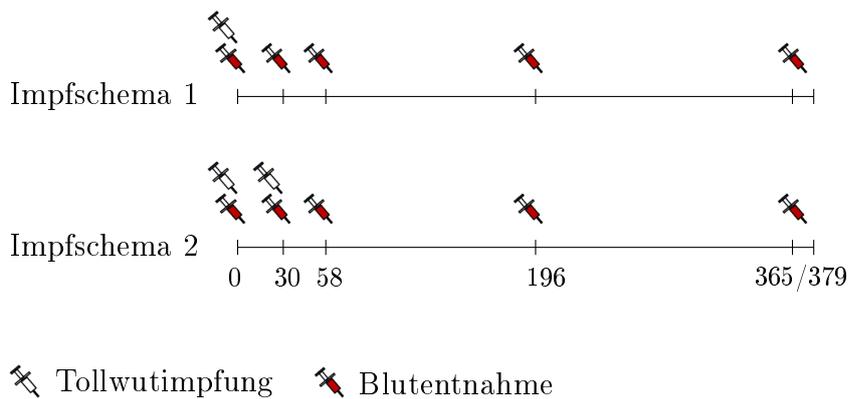


Abbildung 2.2.: Schematische Darstellung der zeitlichen Abfolge der Impfungen und Blutentnahmen im zweiten Impfversuch mit Katzen. Die Tiere der Gruppe 1 erhielten eine, die Tiere der Gruppe 2 zwei Tollwutimpfungen im Abstand von 30 Tagen. Die letzte Blutentnahme erfolgte an Tag 365 bzw. 379 bei jeweils der Hälfte der Tiere jeder Gruppe.

### Versuchsdurchführung

Insgesamt wurden 64 ungeimpfte und serologisch gegen Tollwut- und Staupevirus negative Frettchen beiderlei Geschlechts und verschiedenen Alters in die Studie einbezogen. Die Tiere wurden in 6 Gruppen mit je 1 Dosis verschiedener monovalenter Tollwutimpfstoffe an der lateralen rippengestützten Brustwand subkutan gegen Tollwut vakziniert. Verwendet wurden 3 adjuvanshaltige veterinärmedizinische Tollwutvakzinen (Impfstoffe C, D und E) und 2 adjuvansfreie humanmedizinische Impfstoffe (G und H, s. Tab. 2.1). Zum Zeitpunkt der Impfung war nur der Impfstoff C zur Anwendung bei Frettchen zugelassen. In der Zwischenzeit sind auch die Impfstoffe D und E für Frettchen zugelassen worden. Die ersten 5 Gruppen zu je 10 Tieren erhielten zeitgleich zur Tollwutimpfung an der kontralateralen rippengestützten Brustwand eine Dosis des Staupeimpfstoffs verabreicht.

Die 7 Tiere der Impfstoffgruppe „C + 4 Wo“ erhielten zunächst nur den Staupeimpfstoff verabreicht und wurden 4 Wochen später mit dem veterinärmedizinischen Impfstoff C gegen Tollwut geimpft. Als Kontrolltiere dienten 7 Frettchen, die nur gegen Staupe geimpft wurden.

Allen Frettchen wurde unmittelbar vor den Impfungen sowie an den Tagen 33, 119, 238 und 369 jeweils ca. 1 ml Blut aus der Vena cephalica entnommen (s. Abb. 2.3). Bei den Tieren mit den zeitversetzten Impfungen (Gruppe „C + 4 Wo“) erfolgten die Blutentnahmen bezogen auf die Tollwutimpfung an den Tagen 33, 119, 244 und 341. 4 Monate nach der Tollwutimpfung wurden alle Gruppen auf 6 bis 7 Tiere verkleinert. 8 Monate nach der Erstimpfung erhielten die verbliebenen Frettchen eine Boosterimpfung gegen Staupe.

Die Gruppen der mit Humanimpfstoffen geimpften Frettchen und die Kontrolltie-

## 2. Material und Methoden

re schieden nach einem Jahr aus dem Versuch aus, während die mit Veterinärimpfstoffen geimpften Tiere in der Einrichtung verblieben und über insgesamt 2 Jahre verfolgt werden konnten. Bei diesen Tieren erfolgten weitere Blutentnahmen an den Tagen 546 bzw. 552 und 742. Am Tag 742 (2 Jahre nach der Erstimpfung gegen Tollwut) erhielten die Tiere mit zeitgleicher Impfung denselben Tollwutimpfstoff wie bei Erstimpfung sowie den Impfstoff gegen Staupe an der kontralateralen Seite verabreicht. Die Frettchen der Gruppe „C + 4 Wo“ erhielten am Tag 713 die Impfung gegen Staupe und am Tag 741 die Impfung gegen Tollwut. Die letzte Blutentnahme erfolgte 4 Wochen nach der erneuten Tollwutimpfung am Tag 770 bzw. 769. Alle Blutproben wurden nach der Gerinnung am Tag der Entnahme bei 4000 UpM für 10 min zentrifugiert und das Serum gewonnen. Die Seren wurden im FAVN-Test auf Antikörper gegen Tollwutvirus und im Staupe-SNT auf Antikörper gegen canines Staupevirus untersucht. Bis zu den Untersuchungen und danach wurden die Seren bei  $\leq -18^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Bei der statistischen Auswertung wurde zunächst der Effekt der ersten Tollwutimpfung mit einem gemischt-linearen Varianzanalysemodell für wiederholte Messungen mit den Faktoren Gruppe, Zeit, Wechselwirkung Gruppe\*Zeit und Geschlecht untersucht. Hierfür wurde der Zeitraum nach der ersten bis zur zweiten Impfung betrachtet. Der Effekt der zweiten Tollwutimpfung wurde mit einem linearen Modell mit den Faktoren Gruppe und Geschlecht für den Titer 30 Tage nach der zweiten Impfung untersucht.

### 2.4.3. Impfversuch Hunde

Für die Durchführung des Impfversuchs wurde eine Kooperation mit der Schule für Diensthundewesen der Bundeswehr vereinbart. 40 Welpen, die noch nicht gegen Tollwut geimpft worden waren, erhielten im Alter von 12 Wochen einen monovalenten Tollwutimpfstoff und an anderer Stelle den polyvalenten Impfstoff des gleichen Herstellers mit Caninem Staupevirus (CDV), Caninem Adenovirus-2 (CAV-2), Caninem Parvovirus (CPV), Caninem Parainfluenzavirus (CPiV) und *Leptospira interrogans*, *Serovare canicola* und *icterohaemorrhagiae* verabreicht. Die Hälfte der Hunde wurde mit den Impfstoffen des Herstellers B und die andere Hälfte mit den Impfstoffen des Herstellers E geimpft (s. Tab. 2.1). Jeweils 10 Hunde einer Gruppe erhielten 30 Tage später eine zweite Dosis des Tollwutimpfstoffs des selben Herstellers. Die anderen 10 Tiere jeder Gruppe erhielten die Boosterimpfung 120 Tage nach der Erstimpfung (s. Abb. 2.4).

Jeweils vor Verabreichung der Impfstoffe wurde den Hunden eine Blutprobe entnommen. Weitere Blutentnahmen erfolgten 30 und 120 Tage nach der Boosterimpfung. Gegen Ende des Versuchs wurde deutlich, dass eine Ausweitung der Untersuchung auf den Effekt der Wiederholungsimpfung sinnvoll wäre. Daher erhielten einige Hunde die Wiederholungsimpfung 365 Tage nach der Boosterimpfung und es wurden zu diesem Termin sowie 30 Tage später weitere Blutproben entnommen. Pro Impfgruppe konnten noch bei 2 bis 4 Tiere Daten erhoben werden.

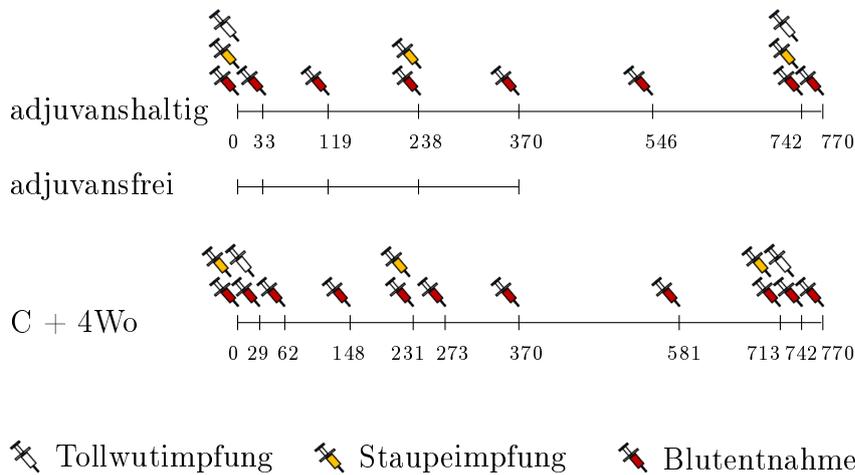


Abbildung 2.3.: Schematische Darstellung der zeitlichen Abfolge der Blutentnahmen und Impfungen im Impfversuch mit Frettchen. Die Frettchen der Impfstoffgruppen C, D und E erhielten den adjuvanshaltigen Tollwut- und den Staupeimpfstoff zeitgleich aber ortsgetrennt an Studientag 0 verabreicht. Eine Wiederholungsimpfung gegen Staupe erfolgte nach 8 Monaten. Die Tiere wurden innerhalb von 2 Jahren regelmäßig serologisch untersucht und die Immunantwort nach einer Wiederholungsimpfung gegen Tollwut und Staupe nach 2 Jahren bestimmt. Die Gruppen Frettchen, die mit adjuvansfreien Impfstoffen geimpft worden waren (G, H), erhielten die Erstimpfung nach dem gleichen Schema, schieden jedoch nach längstens einem Jahr aus dem Versuch aus. Diese Tiere erhielten keine Wiederholungsimpfung gegen Tollwut. In der Impfstoffgruppe „C + 4 Wochen“ wurden sowohl bei der Erst- als auch bei der Wiederholungsimpfung nach 2 Jahren die Staupe- und die Tollwutimpfung im Abstand von 4 Wochen verabreicht.

## 2. Material und Methoden

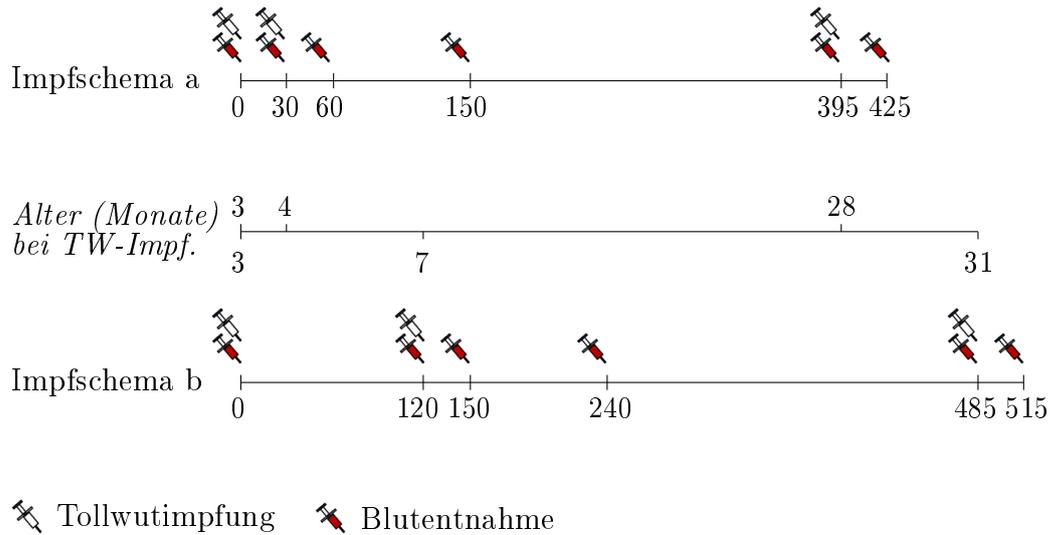


Abbildung 2.4.: Schematische Darstellung der zeitlichen Abfolge der Blutentnahmen und Impfungen im Impfversuch mit Hunden. Alle Hunde waren bei der ersten Impfung 3 Monate alt. Tiere, die nach Impfschema a geimpft wurden, erhielten die zweite Impfung mit 4 Monaten, Tiere nach Impfschema b mit 7 Monaten. Entsprechend wurde die dritte Impfung mit 28. bzw. 31 Monaten verabreicht.

Um den Hunden weite Transporte zu ersparen, wurden die meisten Impfungen und die Blutentnahmen in Praxen von niedergelassenen Tierärzten in der Nähe der Einheit des Diensthundeführers durchgeführt. Mit den Tierärzten wurde im Vorfeld brieflich und telefonisch Kontakt aufgenommen und der Ablauf der Studie erklärt. Die benötigten Impfstoffe wurden jeweils einige Tage vor dem Impftermin zusammen mit einem Terminplan und weiteren Erläuterungen sowie Versandröhrchen und frankierten Rückumschlägen an die jeweilige Praxis verschickt. Die meisten Tierärzte schickten wie erbeten Serum ein. Bei der Einsendung von Vollblut wurde dieses bei 4000 UpM für 10 min zentrifugiert und das Serum gewonnen. Alle Serumproben wurden bis zur Untersuchung bei  $\leq -18^{\circ}\text{C}$  gelagert. In mehreren Testdurchläufen wurden die Seren im FAVN-Test auf neutralisierende Antikörper gegen Tollwutvirus untersucht.

### 2.5. Einfluss des Testvirus (FAVN-Test)

Um den Einfluss des Testsystems auf die Höhe der gemessenen Antikörpertiter abzuschätzen, wurde der FAVN-Test mit verschiedenen Testviren durchgeführt. Die Impfstoffproduzenten C und E (s. Tab. 2.1) stellten jeweils ihr zur Produktion des Tollwutimpfstoffs verwendete Virus zur Verfügung. Der Virusstamm Flury-LEP (enthalten in den Impfstoffen A, B, D und G) wurde von Dr. M. König (Institut

für Virologie, FB Veterinärmedizin, JLU Gießen) bereit gestellt. Die Sequenz dieses Stammes ist veröffentlicht (GenBank-Zugangsnummer DQ099524). Die Virusstämme wurden mit einer MOI von 0,5 einmalig auf BHK-Zellen passagiert und der Überstand gewonnen. Nach Bestimmung des Titers wurde der Verdünnungsfaktor festgelegt, um je Kavität 100 TCID<sub>50</sub> (30 - 300 TCID<sub>50</sub>) einzusetzen.

Standardseren (s. Kap. 2.2.1):

1. OIE-Standardserum mit 0.5 IU/ml
2. Naives Hundeserum der OIE
3. Internes Standardserum des Diagnostischen Labors

Die getesteten Seren stammten von Tieren, die laut Fragebogen ausschließlich mit Tollwutimpfstoffen von einem der Hersteller C, D oder E geimpft worden waren. Für jede der 3 Impfstoffgruppen wurden jeweils 40 Seren in mehreren Testläufen (Testdurchgang 1 bis 4) gegen jedes der drei Impfviren (Pasteur RIV, Flury-LEP, Virus fixe G52) sowie gegen CVS titriert. In jedem Testdurchgang wurden jeweils 10 Seren gegen die 4 Virusstämme getestet. Bei diesem Versuchsdesign war der Virusstamm die einzige Testvariable bei identischen Versuchsbedingungen (eingesetzte Chargen der Kulturmedien, Zellzahl, Temperatur- und Zeitverlauf etc.). War für die gesamte Testreihe zu wenig Serum vorhanden, erfolgte vor dem Auftragen auf die Platte eine geeignete Vorverdünnung mit Medium. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Statistikprogramm BMDP.



# 3. Ergebnisse

## 3.1. Fragebogen

In die Auswertung gingen 1941 Fragebögen ein, davon 1850 zu Hunden und 91 zu Katzen. Zu Frettchen ging lediglich ein Fragebogen ein, so dass diese Tierart für die Auswertung nicht berücksichtigt werden konnte.

### 3.1.1. Hunde

Bei den Hunden entfielen 1366 Fragebögen auf die Studien- (Titer  $<0.5$  IU/ml) und 484 auf die Kontrollgruppe (Titer  $\geq 0.5$  IU/ml). Damit beträgt die Datenbasis dieser Untersuchung 21,4% der im Studienzeitraum mit nicht ausreichendem Titer getesteten Hunde bzw. 1,3% der Tiere mit ausreichendem Titer als Kontrollen. Das Geschlechterverhältnis entsprach mit 51,6% Rüden : 48,4% Hündinnen (s. Tab. 3.1) der zu erwartenden Verteilung in der Population.

Tabelle 3.1.: Geschlecht und Reproduktionsstatus der Hunde

		<0.5 IU/ml (Studiengruppe)		$\geq 0.5$ IU/ml (Kontrollgruppe)	
Geschlecht	kastriert	N	%	N	%
weiblich	ja	113	17.8	76	31.7
	nein	499	78.6	146	60.8
	k.A.	23	3.6	18	7.5
$\Sigma$		<b>635</b>		<b>240</b>	
männlich	ja	55	7.9	48	20.6
	nein	608	87.2	165	70.8
	k.A.	34	4.9	20	8.6
$\Sigma$		<b>697</b>		<b>233</b>	

fehlende Angabe zum Geschlecht - 45 Hunde

81% der Hunde waren nicht kastriert und 48,4% bei der Impfung jünger als 1 Jahr. 109 Hunde (5,9%) hatten das Mindestalter für eine gültige Impfung von 84 Tagen (s. S. 26) noch nicht erreicht. Bei 4 Hunden erfolgte die Impfung laut behandelndem Tierarzt intramuskulär, während 1732 Tiere (93,6%) subkutan geimpft wurden. Bei 114 Hunden (6,2%) wurden keine näheren Angaben gemacht. 60,8% der Tierärzte gaben Skandinavien als Reiseziel des Tieres an (s. Abb. 3.1).

### 3. Ergebnisse

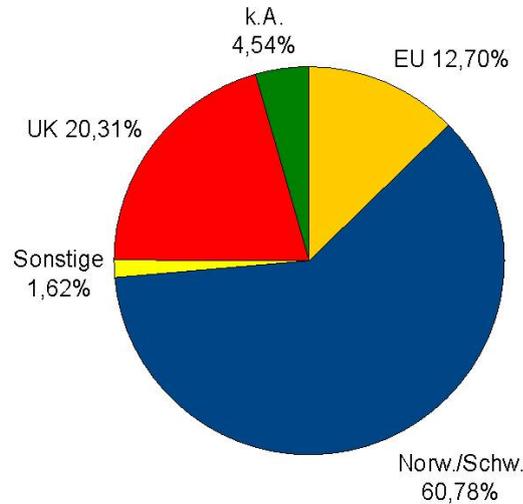


Abbildung 3.1.: Reiseziele Hunde, N=1850

Der zeitliche Abstand zwischen der Impfung und der Blutentnahme betrug bei 61,8% der Tiere mehr als 4 Monate. 344 Hunde (18,58%) bekamen zeitgleich zur Tollwutimpfung Nicht-Standard-Impfstoffe (zur Definition siehe S. 26) und/oder Arzneimittel verabreicht.

Laut Angabe der behandelnden Tierärzte waren 36,6% der Tiere vor der Untersuchung einmalig gegen Tollwut geimpft worden, wovon bei 165 Tieren (24,4%) ein monovalenter und bei 511 Hunden (75,5%) ein polyvalenter Impfstoff eingesetzt worden war. Bei einem Tier (0,1%) fehlten Angaben zum verwendeten Impfstoff. Bei 46 (28%) der mit monovalenten Tollwutimpfstoffen geimpften Tiere (entsprechend 3,5% der Grundgesamtheit) wurden zeitgleich weitere (Standard- und Nicht-Standard-) Impfstoffe (zur Definition siehe S. 26) verabreicht.

Von 1366 Hunden mit nicht ausreichendem Titer wurden 691 nach einer Wiederholungsimpfung erneut untersucht. Davon wurde bei 67 Hunden (8,31%) erneut ein Titer  $<0.5$  IU/ml gemessen. Von diesen Hunden wurden 19 noch einmal und 3 noch zwei Mal untersucht.

Die Erstimpfung gegen Tollwut erfolgte bei den meisten Hunden innerhalb des ersten halben Jahres: von 1594 Hunden, zu denen die Daten der Erstimpfung vorlagen, erhielten 1089 (68,3%) diese bis zum Alter von 180 Tagen. 382 Hunde waren entsprechend den Impfeempfehlungen der StIKo Vet [97] innerhalb des ersten halben Jahres zweimalig geimpft worden.

In der Studiengruppe stieg der durchschnittlich gemessene Titer mit jeder zusätzlichen Impfung an (s. Tab. 3.2). Für die Kontrollgruppe liegen nur für einen Teil der Seren austitrierte Titerergebnisse vor. Diese sind für die Berechnung des Durchschnittstiters erforderlich. Die Ergebnisse werden in Abschnitt 3.2 (s. S. 56)

dargestellt.

Tabelle 3.2.: Durchschnittliche Titerhöhe in der Studiengruppe in Abhängigkeit von der Anzahl der Tollwutimpfungen bei Hunden

	<0.5 IU/ml (Studiengruppe)		
Anzahl Impfungen	N*	GMT**	95%-KI***
1	618	0.15	0.14 - 0.16
2	360	0.21	0.19 - 0.22
3	94	0.23	0.20 - 0.26
≥3	135	0.27	0.25 - 0.30
unbekannt	159	0.17	0.15 - 0.20

\*Anzahl Beobachtungen \*\*geometrischer mittlerer Titer \*\*\*95%-Konfidenzintervall für GMT

## Alter

Das Alter des Hundes zeigte einen signifikanten Einfluss auf das Testergebnis. 109 Hunde hatten das für eine gültige Impfung gesetzlich vorgeschriebene Alter von 84 Tagen noch nicht erreicht und zwar 104 in der Studien- und 5 in der Kontrollgruppe. Die Plausibilitätsprüfung der 5 Tiere der Kontrollgruppe ergab bei 2 Tieren Auffälligkeiten. Bei einem Tier wurde auf dem Fragebogen und im Untersuchungsantrag ein unterschiedliches ungefähres Geburtsdatum angegeben. In diesem Fall konnte das Alter nicht verifiziert werden und die Angabe aus dem Fragebogen wurde zugrunde gelegt. Dennoch bestehen Zweifel am Alter des Tieres, welches eventuell bei der Impfung 2 Monate älter war. Bei einem anderen Tier, das bei der Impfung 65 Tage alt war, wurde zwei Mal in kurzem Abstand der Titer bestimmt. Die erste Untersuchung ergab einen Titer von 0.07 IU/ml und die zweite einen Titer von  $\geq 11.9$  IU/ml. Aus den gesamten vorliegenden Daten lässt sich ableiten, dass das Datum der zweiten Blutentnahme wahrscheinlich nicht der Wahrheit entspricht und das Tier vor der Blutuntersuchung, die ein ausreichendes Ergebnis erbrachte, ein zweites Mal geimpft wurde. Das Datum der zweiten Impfung wurde nicht angegeben. Bei den übrigen 3 Tieren ergab sich kein direkter Hinweis auf Unregelmäßigkeiten.

In der Studiengruppe war die Altersgruppe <1 Jahr am stärksten besetzt, in der Kontrollgruppe dagegen die Gruppe der 3- bis 7-jährigen Tiere (s. Abb. 3.2). Je jünger das Tier, desto höher war demnach das Risiko für einen Titer <0.5 IU/ml. Für einen Hund im ersten Lebensjahr war das Risiko 5 Mal so hoch wie für 3- bis 7-jährige Hunde und doppelt so hoch wie für Hunde im zweiten und dritten Lebensjahr (s. Tab. 3.3). Hunde im Alter von mindestens 8 Jahren wiesen dagegen ein tendenziell niedrigeres Risiko für einen nicht ausreichenden Titer auf als 3- bis 7-jährige Hunde.

### 3. Ergebnisse

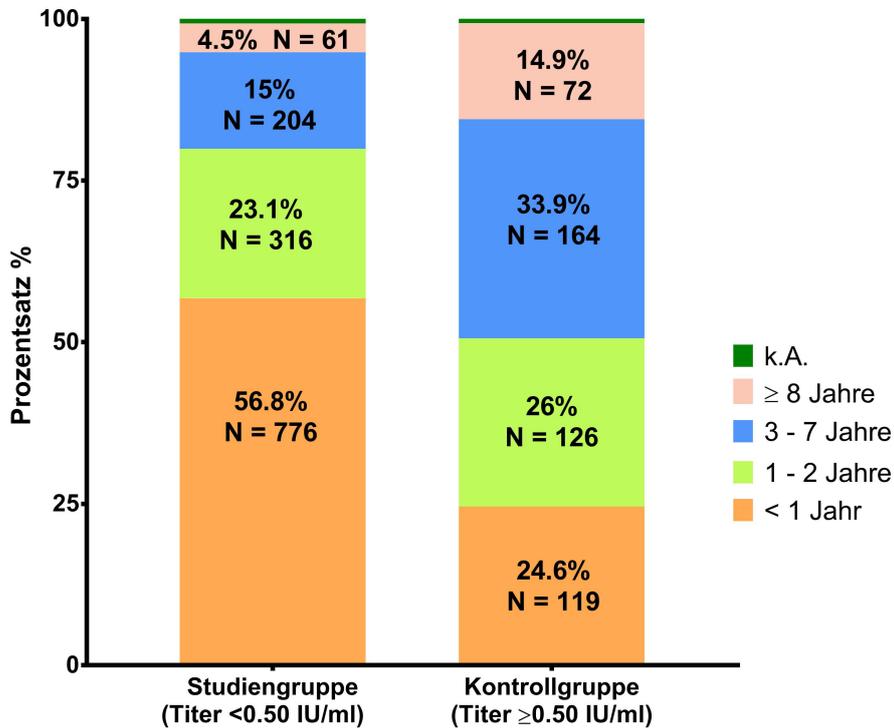


Abbildung 3.2.: Prozentualer Anteil der Altersgruppen in der Studien- und Kontrollgruppe bei Hunden

Tabelle 3.3.: Risikoverhältnis (Odds Ratio - OR) für einen Titer <0.5 IU/ml in Abhängigkeit vom Alter bei Hunden

Vergleich		OR	95%-KI*		p-Wert**
<1 Jahr	3 - 7 Jahre	5.236	3.953	6.944	<0.0001
1 - 2 Jahre	3 - 7 Jahre	2.016	1.506	2.698	<0.0001
≥8 Jahre	3 - 7 Jahre	0.681	0.457	1.014	0.0587

\*95%-Konfidenzintervall \*\*Walds Chi-Quadrat-Test, p-Werte Bonferroni-Holm adjustiert für multiple Vergleiche

### Zeitlicher Abstand zwischen Impfung und Blutentnahme

Eine Übersicht über den zeitlichen Abstand zwischen der Impfung und der Blutentnahme wird in Tabelle 3.4 gegeben. Dieser zeitliche Abstand hatte einen signifikanten Einfluss auf das Testergebnis. Tiere, bei denen die Blutentnahme mehr als 4 Monate nach der Impfung erfolgte, hatten ein signifikant höheres Risiko für einen nicht ausreichenden Titer als Tiere mit früherer Blutentnahme (s. Tab. 3.5). Der Effekt war bei Hunden nach der Erstimpfung deutlicher ausgeprägt als bei Hunden, die bereits mehrfach geimpft waren.

Tabelle 3.4.: Zeitlicher Abstand ( $\Delta t$ ) zwischen Tollwutimpfung (Impf.) und Blutentnahme (BE), Hunde

	nach Erstimpfung				nach mehrfacher Impfung			
	<0.5 IU/ml Studiengruppe		$\geq$ 0.5 IU/ml Kontrollgruppe		<0.5 IU/ml Studiengruppe		$\geq$ 0.5 IU/ml Kontrollgruppe	
$\Delta t$ Impf. - BE	N	%	N	%	N	%	N	%
0 - <120 Tage	163	26.5%	25	43.1%	126	21.5%	167	46.0%
120 - 240 Tage	291	47.2%	26	44.8%	289	49.2%	119	32.8%
>240 Tage	162	26.3%	7	12.1%	172	29.3%	77	21.2%
$\Sigma$	<b>616</b>		<b>58</b>		<b>587</b>		<b>363</b>	

fehlende Angaben - 226 Hunde

Tabelle 3.5.: Risikoverhältnis (Odds Ratio - OR) für einen Titer <0.5 IU/ml in Abhängigkeit vom zeitlichen Abstand zwischen Tollwutimpfung und Blutentnahme bei Hunden

		nach Erstimpfung			
Vergleich		OR	95%-KI		p-Wert*
0 - <120 Tage	>240 Tage	0.282	0.119	0.670	<b>0.0123</b>
0 - <120 Tage	120-240 Tage	0.583	0.326	1.042	1.372
120-240 Tage	>240 Tage	0.484	0.205	1.139	1.965

		nach mehrfacher Impfung			
Vergleich		OR	95%-KI		p-Wert*
0 - <120 Tage	>240 Tage	0.338	0.237	0.482	<b>&lt;0.0001</b>
0 - <120 Tage	120-240 Tage	0.311	0.227	0.426	<b>&lt;0.0001</b>
120-240 Tage	>240 Tage	1.087	0.771	1.532	0.6333

\*Walds Chi-Quadrat-Test

### 3. Ergebnisse

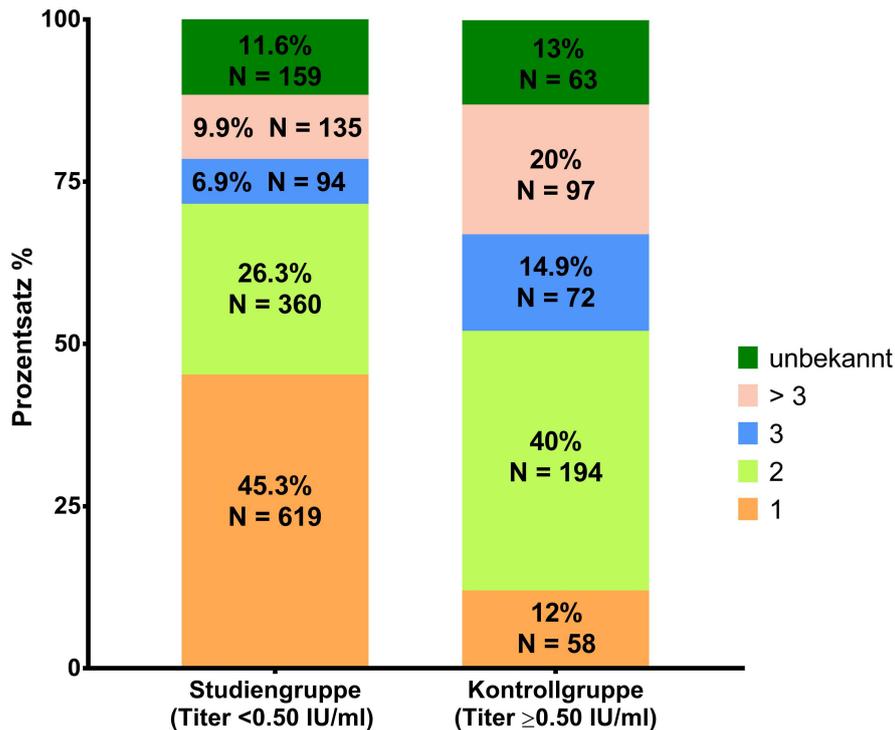


Abbildung 3.3.: Anzahl der Impfungen gegen Tollwut vor der Blutentnahme bei Hunden

#### Impfhistorie

Während in der Studiengruppe Hunde nach der Erstimpfung in der Mehrzahl waren, war diese Klasse in der Kontrollgruppe am schwächsten besetzt (s. Abb. 3.3). Daraus ergibt sich für Hunde nach der Erstimpfung ein 6-fach höheres Risiko für einen nicht ausreichenden Titer im Vergleich zu Hunden, die bereits mehr als eine Tollwutimpfung in ihrem Leben erhalten hatten ( $p < 0.0001$ , s. Tab. 3.6). Zwischen Tieren, die 2 Tollwutimpfungen bzw. mehr als 2 Impfungen erhalten hatten, ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen ( $p > 0.5$ ).

Von den Tieren nach der Erstimpfung waren solche mit niedrigem Titer signifikant jünger als Tiere mit  $\text{Titer} \geq 0.5 \text{ IU/ml}$ , während der zeitliche Abstand zwischen der Impfung und der Blutentnahme signifikant länger war (s. Tab. 3.7).

Zur Berechnung des Alters bei der Erstimpfung wurden die Daten der Impfhistorie aller Tiere analysiert. 89% der Hunde, bei denen die Tollwutantikörperbestimmung nach der Erstimpfung erfolgte, erhielten diese bis zum Alter von 180 Tagen. Auffällig ist, dass der Anteil Tiere, von denen die erste Tollwutimpfung bis zu diesem Alter berichtet wurde, mit jeder weiteren Impfung deutlich sank und zwar über 63,6% bei zwei Mal geimpften Tieren und 53,7% bei Tieren mit 3 Impfungen auf 25,24% bei Tieren mit 4 oder mehr Impfungen.

Tabelle 3.6.: Risikoverhältnis (Odds Ratio - OR) für ein Impfversagen in Abhängigkeit von der Anzahl der Impfungen vor der Blutentnahme bei Hunden. Die ersten drei Paarvergleiche sind signifikant, die letzten drei nicht.

Vergleich	OR	95%-KI		p-Wert*
1 >3	7.656	5.263	11.138	< <b>0.0001</b>
1 3	8.161	5.426	12.276	< <b>0.0001</b>
1 2	5.742	4.166	7.914	< <b>0.0001</b>
2 3	1.421	0.999	2.023	0.1530
2 >3	1.333	0.974	1.825	0.1448
3 >3	0.938	0.627	1.403	0.7557

\*Walds Chi-Quadrat-Test, p-Werte Bonferroni-Holm adjustiert für multiple Vergleiche

Tabelle 3.7.: Durchschnittliches Alter und zeitlicher Abstand zwischen der Impfung und der Blutentnahme bei einmalig geimpften Hunden. Angegeben ist jeweils der Median in Tagen.

	<0.5 IU/ml (Studiengruppe)	≥0.5 IU/ml (Kontrollgruppe)	p-Wert*
Alter	94	120	< <b>0.0001</b>
Abstand Impfung - BE	154	127	<b>0.0002</b>

\*Wilcoxon-Rangsummentest

## Impfstoff

In der Studiengruppe war der prozentuale Anteil der mit Tollwutimpfstoffen der Hersteller B/D und C geimpften Tiere höher als in der Kontrollgruppe. Der prozentuale Anteil von mit Impfstoffen der Hersteller E und F geimpften Tieren war hingegen in der Studiengruppe niedriger als in der Kontrollgruppe (s. Abb. 3.4). Daraus ergibt sich für Hunde, die mit B/D- und C-Impfstoffen geimpft worden waren, ein statistisch signifikant höheres Risiko, einen nicht ausreichenden Titer aufzuweisen ( $p < 0.0001$ , s. Tab. 3.8).

Da das Durchschnittsalter für Hunde, die mit Impfstoffen des Herstellers C geimpft worden waren, deutlich niedriger lag als das Durchschnittsalter in den übrigen Impfstoffgruppen, wurde die gleiche Berechnung für Hunde im ersten Lebensjahr durchgeführt (s. Abb. 3.5). Mit Impfstoffen des Herstellers C geimpfte Tiere schnitten signifikant schlechter ab als mit Impfstoffen der Hersteller E und F geimpfte Tiere. Der Paarvergleich für B/D- mit E- und F- geimpfte Tiere war für diese Altersgruppe nicht signifikant unterschiedlich (s. Tab. 3.9).

Wurde bei der Erstimpfung ein monovalenter Impfstoff eingesetzt, was die zeitgleiche, ortsgetrennte Applikation anderer Impfstoffe nicht ausschließt, bestand ein tendenziell niedrigeres Risiko, einen Titer unterhalb des Grenzwertes aufzuweisen als bei Verwendung eines polyvalenten Impfstoffs (s. Abb. 3.6). Der Unterschied war jedoch nicht signifikant ( $p = 0.0587$ ). Bei Betrachtung aller Hunde unabhängig von

### 3. Ergebnisse

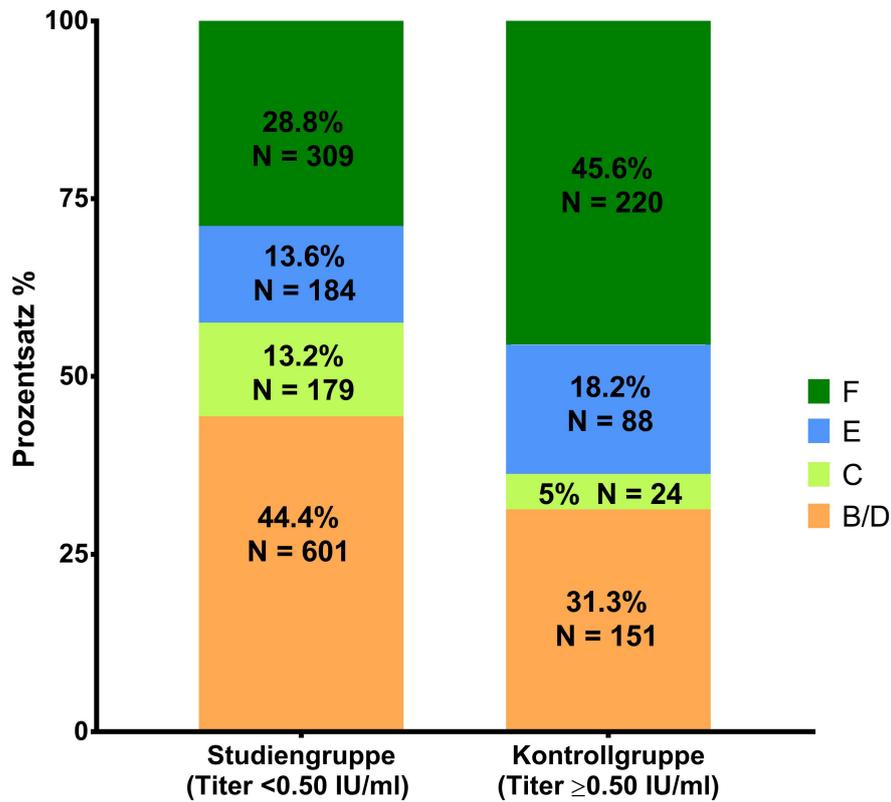


Abbildung 3.4.: Übersicht über die prozentualen Anteile der jeweiligen Impfstoffe bei der letzten Impfung vor der Blutentnahme in der Studien- und Kontrollgruppe bei Hunden

Tabelle 3.8.: Risikoverhältnis (Odds Ratio - OR) für ein Impfversagen in Abhängigkeit vom Impfstoff bei Hunden. Die ersten fünf Vergleiche sind signifikant, der letzte nicht.

Vergleich		OR	95%-KI		p-Wert*
C	F	4.183	2.648	6.607	<0.0001
C	E	3.547	2.160	5.826	<0.0001
B/D	F	2.245	1.761	2.863	<0.0001
B/D	E	1.904	1.396	2.596	<0.0001
C	B/D	1.862	1.174	2.959	<b>0.0166</b>
E	F	1.179	0.871	1.597	0.2857

\*Walds Chi-Quadrat-Test, p-Werte Bonferroni-Holm adjustiert für multiple Vergleiche

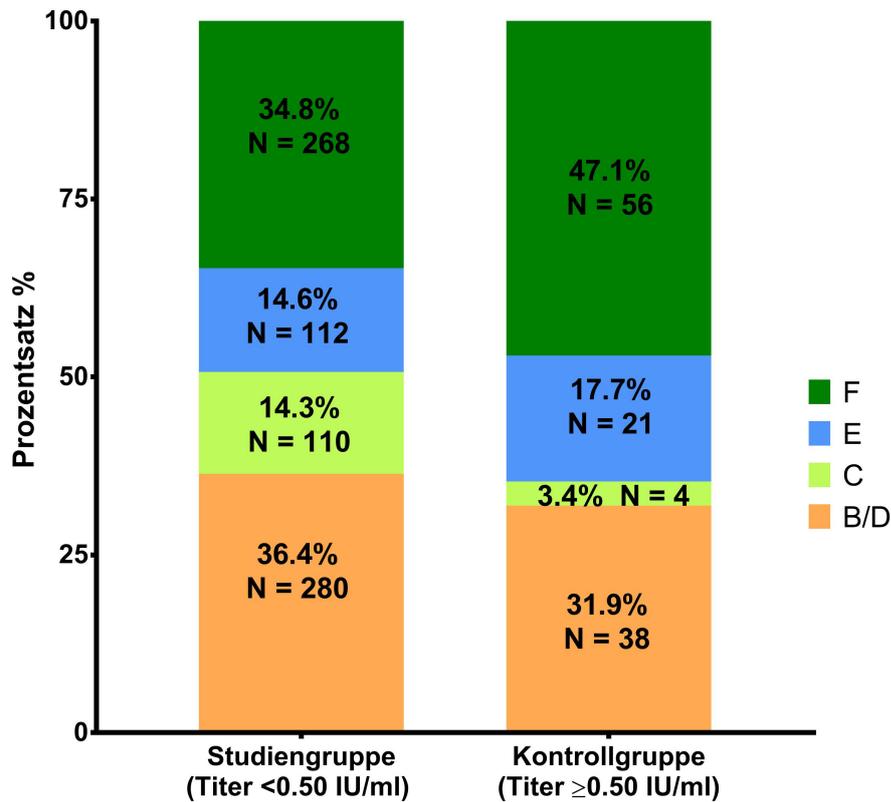


Abbildung 3.5.: Prozentuale Anteile der jeweiligen Impfstoffe bei der letzten Impfung vor der Blutentnahme in der Studien- und Kontrollgruppe bei Hunden im ersten Lebensjahr

Tabelle 3.9.: Risikoverhältnis (Odds Ratio - OR) für ein Impfversagen in Abhängigkeit vom Impfstoff bei Hunden im ersten Lebensjahr. Die ersten beiden Vergleiche sind signifikant.

Vergleich		OR	95%-KI		p-Wert*
C	F	5.694	2.016	16.085	<b>0.0060</b>
C	E	5.109	1.699	15.369	<b>0.0185</b>
C	B/D	3.704	1.289	10.638	0.0600
B/D	F	1.540	0.987	2.402	0.1713
B/D	E	1.382	0.776	2.458	0.5432
E	F	1.114	0.644	1.927	0.6983

\*Walds Chi-Quadrat-Test, p-Werte Bonferroni-Holm adjustiert für multiple Vergleiche

### 3. Ergebnisse

der Anzahl der Impfungen ließ sich ein statistisch signifikant besseres Abschneiden von Tieren nachweisen, die mit einem monovalenten Impfstoff geimpft worden waren ( $p=0.0008$ ). Ein monovalenter Impfstoff wurde jedoch signifikant häufiger bei einer Nachimpfung innerhalb von 180 Tagen eingesetzt als bei einem zeitlichen Abstand zwischen zwei Impfungen von mehr als 180 Tagen ( $p<0.0001$ ).

Ein Hersteller empfiehlt zur Erstimpfung von Hunden gegen Tollwut den zeitgleichen, ortsgetrennten Einsatz des monovalenten Tollwut- und des 6-fach Kombinationsimpfstoffs (Staupe, Hepatitis (CAV-2), Parvovirus, Parainfluenzavirus, Leptospira interrogans) und zur Wiederholungsimpfung den 7-fach- Kombinationsimpfstoff mit Tollwutkomponente. Wurden nur die Tiere betrachtet, die bei der Erstimpfung den Impfstoff dieses Herstellers erhalten hatten, zeigte sich, dass dieses Impfschema von den Tierärzten überwiegend nicht eingehalten wird: 62,4% erhielten den polyvalenten 7-fach Kombinationsimpfstoff und nur 34,8% wurden gemäß der Fachinformation ortsgetrennt mit dem monovalenten Tollwutimpfstoff geimpft. Ein Einfluss auf das Risiko für einen nicht ausreichenden Titer ließ sich nicht nachweisen ( $p=0.4492$ ,  $OR=0.606$ ,  $95\% \text{ KI}=0.166 - 2.217$ ).

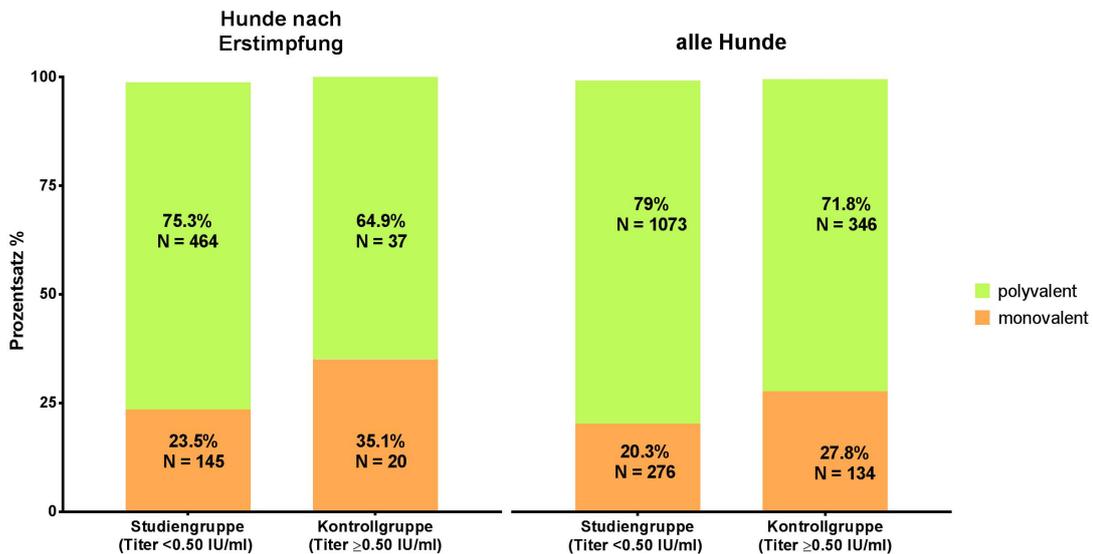


Abbildung 3.6.: Anteil mono- und polyvalenter Impfstoffe gegen Tollwut bei Hunden in der Studien- und Kontrollgruppe und in Abhängigkeit von der Impfhistorie.

Um den Einfluss der Impfstoffe weiter zu untersuchen, wurde der Frage nachgegangen, inwieweit die Wahl des Impfstoffs bei Wiederholungsimpfungen Einfluss auf das Ergebnis der Tollwutantikörperbestimmung hat. Dazu wurden nur die Tiere betrachtet, die bis zur Blutentnahme zweimalig gegen Tollwut geimpft worden waren. Bei Gegenüberstellung der Tiere, die bei der ersten und bei der zweiten Impfung einen Tollwutimpfstoff des gleichen Herstellers erhalten hatten und der Tiere, bei

denen Impfstoffe verschiedener Hersteller eingesetzt worden waren, konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Risikos für nicht ausreichende Titer festgestellt werden ( $p=0.3585$ , s. Tab. 3.10). Bei Betrachtung der einzelnen Hersteller zeigten sich jedoch signifikante Unterschiede. Nach der Erstimpfung mit Impfstoffen der Hersteller B/D und C führte ein Wechsel zu einem anderen Hersteller signifikant häufiger zu einem ausreichenden Titer ( $p=0.0319$  bzw.  $p=0.0195$ ) als wenn wieder mit Impfstoffen des gleichen Herstellers geimpft wurde.

Bei Verwendung des Tollwutimpfstoffs von Hersteller F bei der Erstimpfung scheint es wiederum für das Ergebnis besser zu sein, die Nachimpfung ebenfalls mit einem Impfstoff dieses Herstellers vorzunehmen ( $p=0.0189$ ). Keine signifikanten Unterschiede wurden für Hersteller E festgestellt ( $p=0.5059$ ).

Tabelle 3.10.: Impfstoffe bei der Erst- und bei der Wiederholungsimpfung. Betrachtet wurden nur Hunde, die zum Zeitpunkt der Blutentnahme zweifach gegen Tollwut geimpft waren.

	<0.5 IU/ml Studiengruppe		≥0.5 IU/ml Kontrollgruppe					
<b>Hersteller</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>Σ</b>	<b>p-Wert</b>	<b>OR</b>	<b>KI</b>
gleich	259	74.86%	339	71.97%	598	0.3585	1.159	0.846-
ungleich	87	25.14%	132	28.03%	219			1.589
Σ	346		471		817			
<b>Hersteller B/D</b>								
<b>Herst. B/D</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>Σ</b>	<b>p-Wert</b>	<b>OR</b>	<b>KI</b>
gleich	147	82.58%	103	72.54%	250	<b>0.0319</b>	1.795	1.052-
ungleich	31	17.42%	39	27.46%	70			3.065
Σ	178		142		320			
<b>Hersteller C</b>								
<b>Herst. C</b>								
gleich	27	54.00%	22	32.35%	49	<b>0.0195</b>	2.454	1.156-
ungleich	23	46.00%	46	67.65%	69			5.213
Σ	50		68		118			
<b>Hersteller F</b>								
<b>Herst. F</b>								
gleich	64	84.97%	147	72.73%	211	<b>0.0189</b>	0.472	0.252-
ungleich	24	27.27%	26	15.03%	50			0.884
Σ	88		173		261			
<b>Hersteller E</b>								
<b>Herst. E</b>								
gleich	21	70.00%	67	76.14%	88	0.5059	0.731	0.291-
ungleich	9	30.00%	21	23.86%	30			1.839
Σ	30		88		118			

### 3. Ergebnisse

#### Mehrfach geimpfte Hunde

Tiere, die mindestens 3 Impfungen vor der Blutentnahme erhalten hatten, waren in der Studiengruppe signifikant jünger als die Tiere der Kontrollgruppe und der Zeitabstand zwischen der Impfung und der Blutentnahme war länger (s. Tab. 3.11). Bei der letzten Impfung vor der Blutentnahme wurde häufiger ein Impfstoff der Hersteller B/D und C als E und F eingesetzt (s. Abb. 3.7).

Tabelle 3.11.: Vergleich zwischen Studien- und Kontrollgruppe hinsichtlich Alter, Reproduktionsstatus und Impfhistorie von Hunden, die vor der Blutentnahme mindestens 3 Mal gegen Tollwut geimpft worden waren.

	<0.5 IU/ml (Studiengruppe)	≥0.5 IU/ml (Kontrollgruppe)
Anzahl	229	169
durchschnittl. Alter in Jahren [95%-KI]	4.7 [4.3, 5.0]	5.6 [5.1, 6.1]
Abstand Impfung-BE (Tage) [95%-KI]	200 [188, 213]	163 [145, 180]
Prozent männliche Tiere	48.5%	53.3%
Prozent kastrierte Tiere	28.0%	34.3%

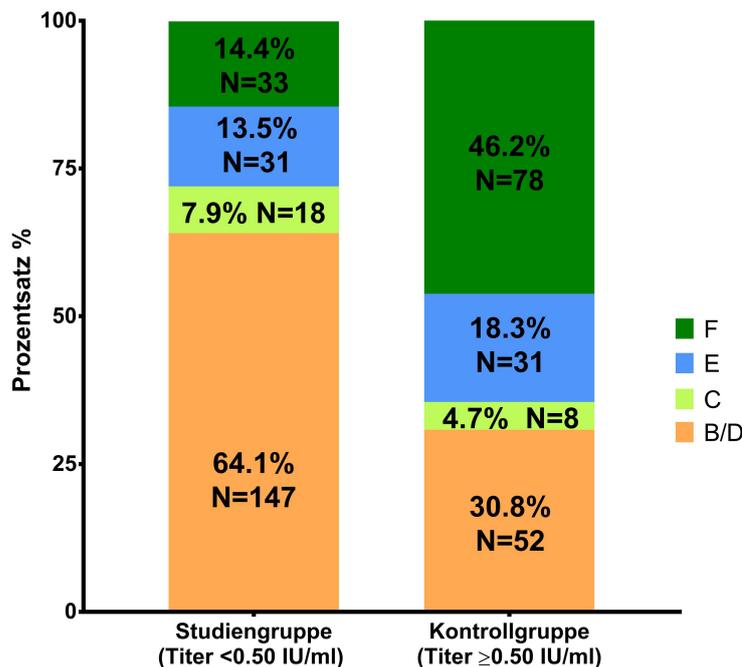


Abbildung 3.7.: Hersteller der letzten Impfung vor der BE bei Hunden, die mindestens 3 Mal gegen Tollwut geimpft worden waren.

Tabelle 3.12.: Risikoverhältnis (Odds Ratio - OR) für ein Impfversagen in Abhängigkeit vom Impfstoff bei mehrfach geimpften Hunden. Die ersten vier Vergleiche sind signifikant, die letzten beiden nicht.

Vergleich		OR	95%-KI		p-Wert*
B/D	F	6.682	3.991	11.188	< <b>0.0001</b>
C	F	5.318	2.105	13.438	<b>0.0020</b>
B/D	E	2.827	1.567	5.098	<b>0.0024</b>
E	F	2.364	1.243	4.496	<b>0.0261</b>
C	E	2.250	0.853	5.937	0.2028
B/D	C	1.256	0.516	3.062	0.6155

\*Walds Chi-Quadrat-Test, p-Werte Bonferroni-Holm adjustiert für multiple Vergleiche

### Rasse

Hinsichtlich der Rasse konnte kein signifikanter Einfluss auf das Testergebnis beobachtet werden. Die prozentuale Besetzung der einzelnen Größenklassen in der Studiengruppe war mit derjenigen in der Kontrollgruppe vergleichbar (s. Abb. 3.8). Das relative Risiko unterschied sich für die einzelnen Größenklassen nicht ( $p > 0.3$ ).

### Kastration

Um den Einfluss der Kastration auf das Ergebnis der Titeruntersuchung abzuschätzen, wurden die Hunde betrachtet, die mindestens 1 Jahr alt waren und bei denen die Blutentnahme nach der 2. Tollwutimpfung erfolgte. Kastrierte Tiere wiesen tendenziell ein geringfügig, nicht signifikant niedrigeres Risiko für einen Titer unter dem Grenzwert auf ( $p = 0.1229$ , s. Abb. 3.9). Wurden nur die männlichen Tiere betrachtet, verstärkte sich diese Tendenz ( $p = 0.0936$ ), während bei den weiblichen Tieren kein Einfluss beobachtet werden konnte ( $p = 0.6753$ ). Ein ähnliches Bild ergab sich bei Betrachtung aller über 1-jährigen Hunde, die bereits mehr als 2 Impfungen erhalten hatten.

### Zeitgleiche Verabreichung anderer Arzneimittel

Ein signifikanter Einfluss der zeitgleichen Verabreichung von Nicht-Standard-Impfstoffen und anderen Arzneimitteln auf die Wahrscheinlichkeit, dass ein Titer  $< 0.5$  IU/ml gemessen wird, ließ sich nicht feststellen. Auch bei den Paarvergleichen mit den unbehandelten Tieren zeigte sich kein signifikanter Einfluss der Arzneimittelgruppen auf das Testergebnis (s. Tab. 3.13).

### 3. Ergebnisse

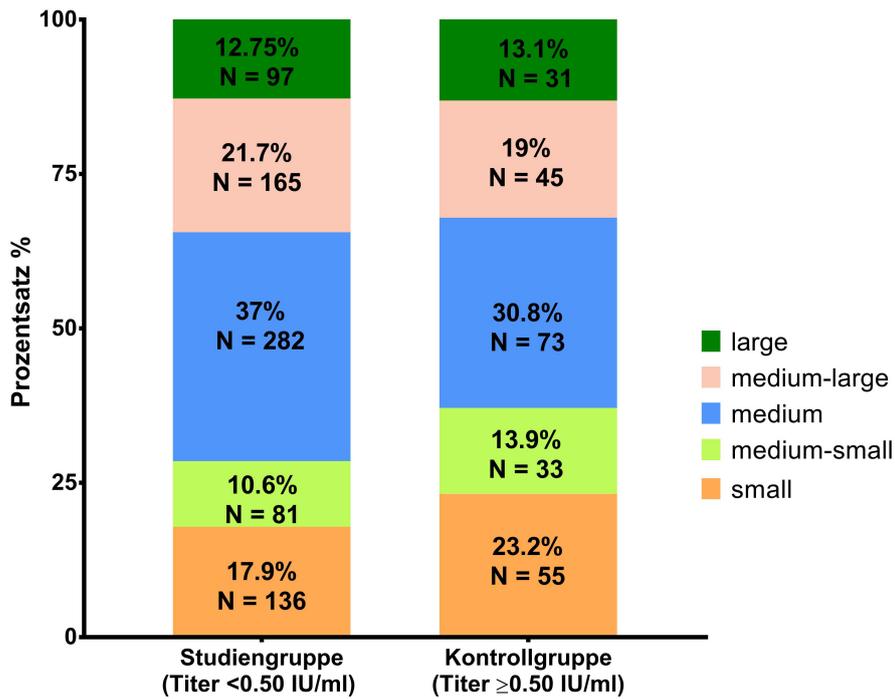


Abbildung 3.8.: Einteilung der Hunderassen nach Größenklasse und Übersicht über die Verteilung in der Studien- und Kontrollgruppe

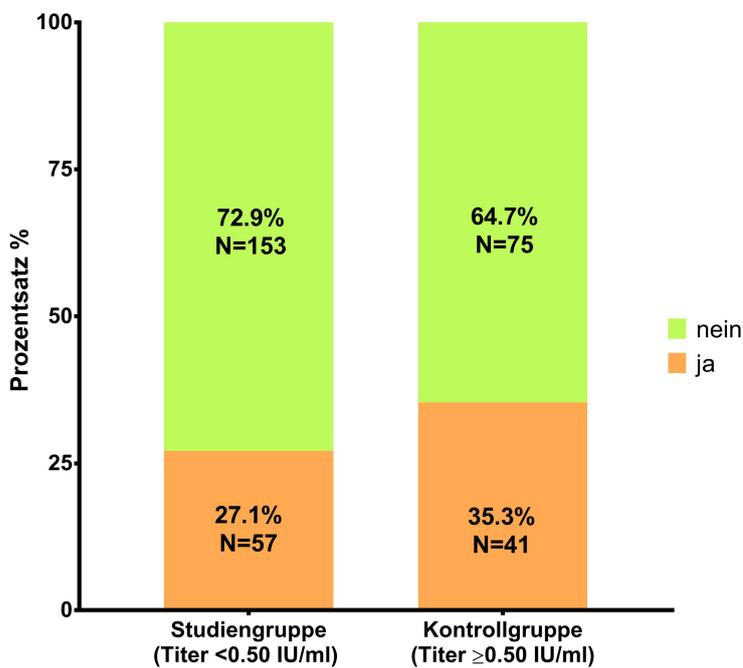


Abbildung 3.9.: Kastration (ja/nein) bei Hunden und Verteilung in der Studien- und Kontrollgruppe

Tabelle 3.13.: Risiko für einen Titer unterhalb des Grenzwertes in Abhängigkeit von der zeitgleichen Anwendung anderer Arzneimittel bei Hunden. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen der Studien- und der Kontrollgruppe beobachtet.

Arzneimittelgruppe	<0.5 IU/ml (Studiengruppe)	≥0.5 IU/ml (Kontrollgruppe)	Σ	p-Wert
<b>keine anderen AM</b>	1121	384	1505	
Corticosteroide	8	5	13	0.2936
Antibiotika	17	8	25	0.4515
Schilddrüsenhormone	5	3	8	0.4438
Antiparasitika	122	49	171	0.3744
Paramunitätsinducer	5	1	6	0.6247
andere Impfstoffe	59	27	86	0.2269
Narkose	6	5	11	0.1437

### 3. Ergebnisse

#### 3.1.2. Katzen

##### Einflussfaktoren

Bei den Katzen entfielen 17 Fragebögen auf die Studien- und 74 auf die Kontrollgruppe. Aufgrund der geringen Fallzahl sind die Schätzungen bei den Katzen mit einer relativ großen Unsicherheit behaftet, was sich aus den breiten Konfidenzintervallen ablesen lässt. Im Vergleich zu den Hunden war das Risiko für Katzen, einen Titer unterhalb des Grenzwertes aufzuweisen, signifikant geringer ( $p < 0.0001$ , OR 12.285, 95%-KI 7.179 - 21.023). Das Geschlechterverhältnis war mit 39 Katzen zu 48 Katzen (42,9 : 52,8%) leicht zu Gunsten der männlichen Tiere verschoben (s. Tab. 3.14). Bei 2 Tieren war das Geschlecht nicht bekannt. Laut Angaben der Tierärzte waren alle Katzen subkutan geimpft worden. Eine Übersicht über die Reiseziele bei Katzen gibt Abbildung 3.10.

Tabelle 3.14.: Übersicht über die Verteilung der Katzen nach Geschlecht und Reproduktionsstatus in der Studien- und Kontrollgruppe

Geschlecht	kastriert	<0.5 IU/ml (Studiengruppe)	≥0.5 IU/ml (Kontrollgruppe)	Σ
<b>weiblich</b>	ja	1	22	<b>23</b>
	nein	5	11	<b>16</b>
Σ		<b>6</b>	<b>33</b>	<b>39</b>
<b>männlich</b>	ja	6	25	<b>31</b>
	nein	5	12	<b>17</b>
Σ		<b>11</b>	<b>37</b>	<b>48</b>
<b>k.A.</b>		0	2	<b>2</b>

Anhand einer schrittweisen logistischen Regression konnte gezeigt werden, dass der zeitliche Abstand zwischen Impfung und Blutentnahme bei Katzen signifikanten Einfluss auf das Testergebnis hatte ( $p = 0.0198$ ). Je mehr Zeit zwischen der Impfung und der Blutentnahme vergangen war, desto höher war das Risiko für einen nicht ausreichenden Titer. Zudem erwies sich die Anzahl der vor der Blutentnahme verabreichten Impfungen gegen Tollwut als Risikofaktor: Katzen nach der Erstimpfung hatten ein signifikant höheres Risiko für einen nicht ausreichenden Titer ( $p = 0.0068$ ) im Vergleich zu Katzen, die bereits mehr als ein Mal gegen Tollwut geimpft worden waren. Keine Katze mit nicht ausreichendem Titer war mehr als 2 Mal geimpft worden, während sich in der Kontrollgruppe 16 Katzen befanden, die mindestens 3 Mal geimpft worden waren (s. Abb. 3.11).

In das komplette Modell der schrittweisen logistischen Regression können nur die Tiere einbezogen werden, die keine fehlenden Werte hinsichtlich der eingeschlossenen Einflussgrößen aufweisen. Dadurch ergaben sich zum Teil abweichende Ergebnisse hinsichtlich der statistischen Signifikanz einzelner Faktoren im Vergleich zu univariater Analyse. So wurde anhand des Paarvergleichs zusätzlich das Alter der Katzen als

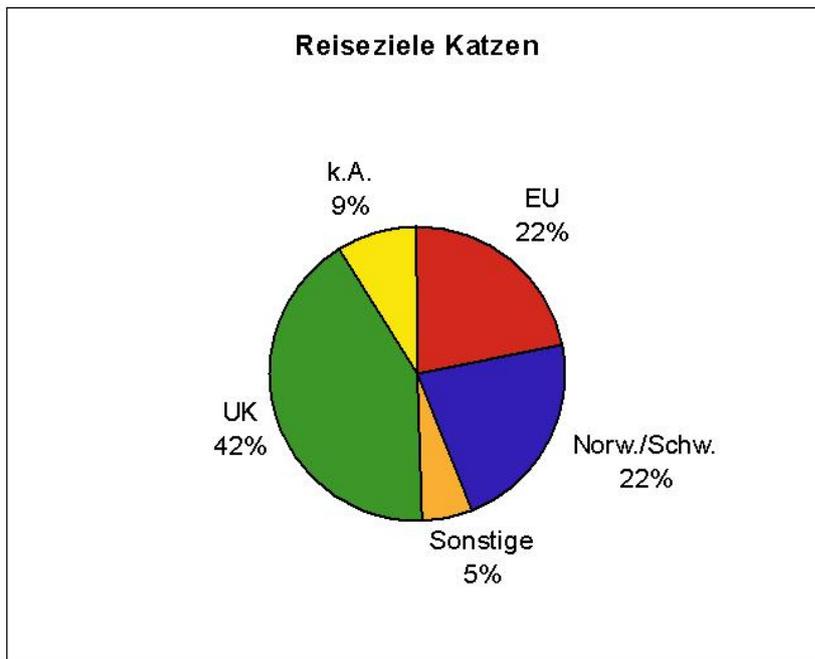


Abbildung 3.10.: Reiseziele bei Katzen, N=91

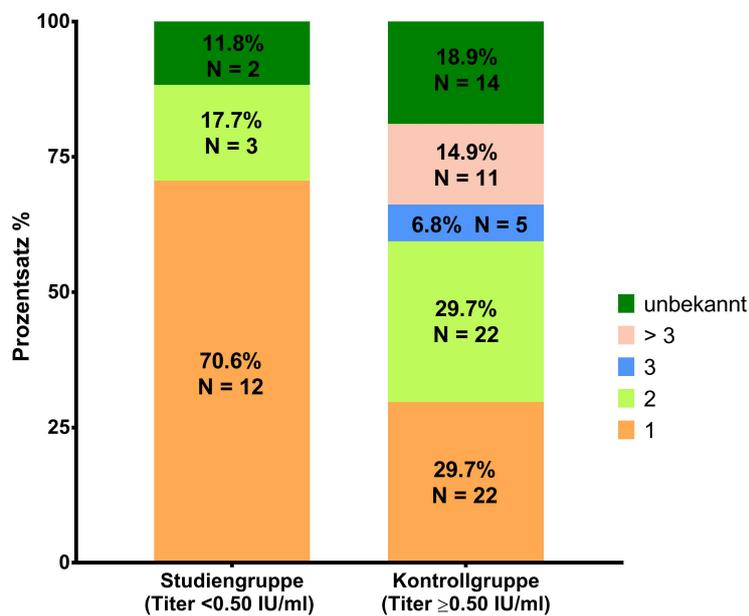


Abbildung 3.11.: Anzahl der bis zur Blutentnahme verabreichten Impfungen in der Studien- und Kontrollgruppe bei Katzen

### 3. Ergebnisse

Risikofaktor identifiziert: junge Katzen im Alter bis zu einem Jahr hatten ein signifikant höheres Risiko, einen Titer  $<0.5$  IU/ml aufzuweisen als Tiere im Alter zwischen 3 und 8 Jahren ( $p=0.0267$ , s. Abb. 3.12 und Tab. 3.15). Teilt man die Katzen in die beiden Altersgruppen  $<1$  Jahr und  $\geq 1$  Jahr ein, ergibt sich ein Risikoverhältnis (OR) für die Jungtiere von 5 (95% KI 1.581 - 15.808,  $p=0.0061$ ).

Beim Vergleich von monovalenten und polyvalenten Impfstoffen ließ sich kein Unterschied nachweisen (OR: 1.029, 95%-KI (0.345, 3.064);  $p=0.9597$ , s. Tab. 3.16). Für eine eingehende Untersuchung des Einflusses des verwendeten Impfstoffs waren die Fallzahlen nicht ausreichend.

35 Katzen (38,46%) erhielten zeitgleich zur Impfung andere Impfstoffe oder Arzneimittel verabreicht. Ein Einfluss der zeitgleichen Verabreichung anderer Impfstoffe und Arzneimittel auf die Wahrscheinlichkeit, dass ein Titer  $<0.5$  IU/ml gemessen wurde, ließ sich nicht feststellen.

Von 17 Katzen mit einem Titer  $<0.5$  IU/ml wurden 10 Tiere erneut untersucht. Alle Katzen wiesen nach erneuter Impfung bei der Wiederholungsuntersuchung einen Titer  $\geq 0.5$  IU/ml auf. 2 Katzen der Kontrollgruppe waren vorher bereits einmal untersucht worden. Lediglich eine Katze wurde insgesamt 3 Mal untersucht. Bei diesem Tier erfolgte zwischen der ersten und zweiten Untersuchung keine erneute Impfung.

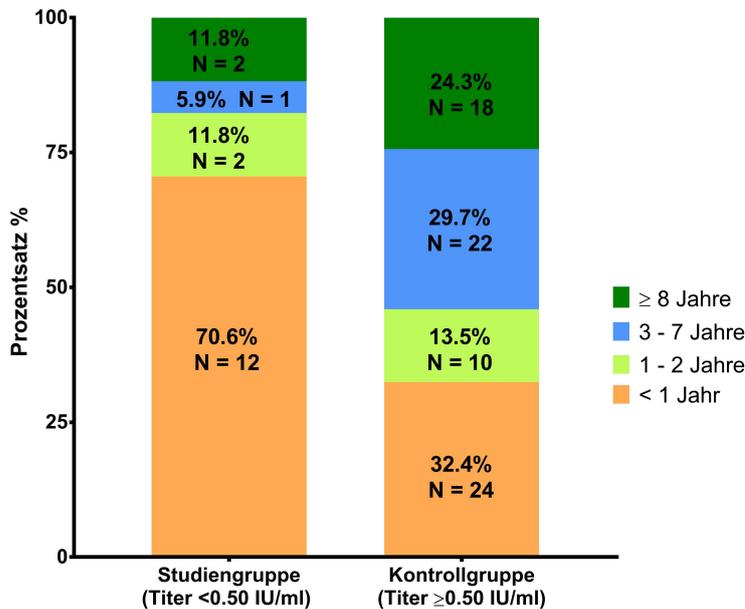


Abbildung 3.12.: Prozentualer Anteil der Altersgruppen in der Studien- und Kontrollgruppe bei Katzen

Tabelle 3.15.: Risikoverhältnis (Odds Ratio - OR) für einen Titer &lt;0.5 IU/ml bei Katzen in Abhängigkeit vom Alter

Vergleich		OR	95%-KI		p-Wert*
<1 Jahr	3 - 7 Jahre	10.989	1.319	90.909	<b>0.0267</b>
1 - 2 Jahre	3 - 7 Jahre	4.400	0.356	54.364	0.2481
≥8 Jahre	3 - 7 Jahre	2.445	0.205	29.412	0.4800

Tabelle 3.16.: Anteil mono- und polyvalenter Impfstoffe gegen Tollwut bei Katzen in der Studien- und Kontrollgruppe.

	<0.5 IU/ml (Studiengruppe)		≥0.5 IU/ml (Kontrollgruppe)	
	N	%	N	%
monovalent	9	52.9%	40	54.8%
polyvalent	7	41.1%	32	43.8%

### 3.1.3. Compliance

Gemäß den Angaben auf dem Einsendeformular und dem Fragebogen wurden bei 1554 Tieren die Reisebestimmungen des jeweiligen Ziellandes erfüllt, während bei 339 Tieren (17,5%) die Bestimmungen eindeutig nicht erfüllt waren. Nachprüfbar Gründe für die Nichterfüllung der Reisebedingungen waren das Nichteinhalten der vorgeschriebenen Fristen zwischen letzter Impfung und der Blutentnahme bei vorgesehener Reise nach Skandinavien von mindestens 120 Tagen (200 Tiere, davon erfolgte bei 28 Tieren die Blutentnahme nach 118 oder 119 Tagen) bzw. 30 Tagen für den Import in die EU (26 Tiere), die Impfung vor Erreichen des Mindestimpfalters von 12 Wochen (122 Tiere) und das Überschreiten der Gültigkeitsfrist der vorangegangenen Impfung von einem Jahr (40 Tiere). Bei 522 (26,9%) Fragebögen wurden Unstimmigkeiten zwischen den Angaben auf dem Untersuchungsantrag und den Angaben im Fragebogen oder anderweitige Unregelmäßigkeiten bei der Dokumentation festgestellt. Betroffen waren überwiegend Impfstoff und Impfstoffcharge, seltener das Impfdatum oder das Datum der Blutentnahme, das Geburtsdatum oder das Geschlecht des Tieres. Bei 18 Tieren wurde eine Impfung, obwohl im Hinblick auf die Reisebestimmungen relevant, nur im retrospektiv ausgefüllten Fragebogen erwähnt und nicht im Untersuchungsantrag.

Zahlreiche Unregelmäßigkeiten bezogen sich auf die Chargennummern der Impfstoffe. So waren 5,4% der angeblich eingesetzten Impfstoffchargen zum Zeitpunkt der Impfung noch nicht freigegeben und nicht auf dem Markt verfügbar. 2,1% der Chargen waren zum Impftermin bereits abgelaufen. Bei 18 Tieren (0,9%) betrafen die Unregelmäßigkeiten die Identifizierung des Tieres (Mikrochipnummer, Tätowierung).

### Titer (austitriert) der hochtitrigen Seren des Jahres 2006

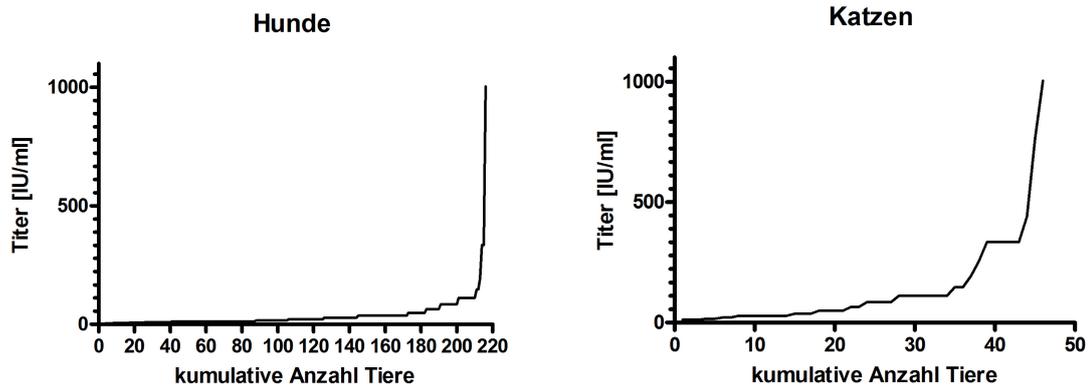


Abbildung 3.13.: Austitrierte Titerwerte der hochtitrigen Seren aus der Routinediagnostik, für die Informationen aus dem Fragebogen vorlagen.

## 3.2. Austitration von Seren aus der Routinediagnostik

Insgesamt konnten 262 Seren aus den Rückstellproben identifiziert und austitriert werden. 165 wurden der Originaleinsendung des Fragebogens aus dem betreffenden Zeitabschnitt (Januar bis September 2006) zugeordnet, die übrigen bezogen sich auf Folgeuntersuchungen von Tieren, die vorher ein nicht ausreichendes Titerergebnis aufgewiesen hatten.

Die austitrierten Titerwerte für Hunde und Katzen sind in Abb. 3.13 dargestellt.

Hunde hatten insgesamt niedrigere Titer als Katzen. Lediglich bei 16 von 216 Hunden (7,5%) wurden Werte  $>100$  IU/ml gemessen, während bei den Katzen entsprechende Werte bei 19 von 46 Tieren (43,3%) gemessen wurden. Ferner war zu beobachten, dass bei den Hundeseren auch Werte unterhalb des ursprünglichen Ergebnisses gemessen wurden, was bei den Katzen nicht der Fall war. Der Unterschied zum ursprünglichen Ergebnis lag bei 3 Hunden bei mehr als einer Verdünnungsstufe.

Wurden alle Titerergebnisse der Kontrollgruppe des Jahres 2006 betrachtet, stieg bei Hunden der durchschnittliche Titer nach zwei Impfungen im Vergleich zu einfach geimpften Tieren deutlich an (s. Abb. 3.14). Weitere Impfungen führten zu keiner weiteren Steigerung des durchschnittlichen Titers.

Bei den Hunden zeigte sich, dass der durchschnittliche Titer bei den hochtitrigen Seren unabhängig von der Anzahl vorheriger Impfungen ähnliche Werte aufwies (s. Abb. 3.15a). Häufigere Impfungen führten tendenziell zu einer Abnahme des Titers. Ein ähnliches Bild ergab sich bei ausschließlicher Betrachtung der im entsprechenden Zeitraum erstmalig untersuchten Tiere (s. Abb. 3.15b).

### 3.2. Austitration von Seren aus der Routinediagnostik

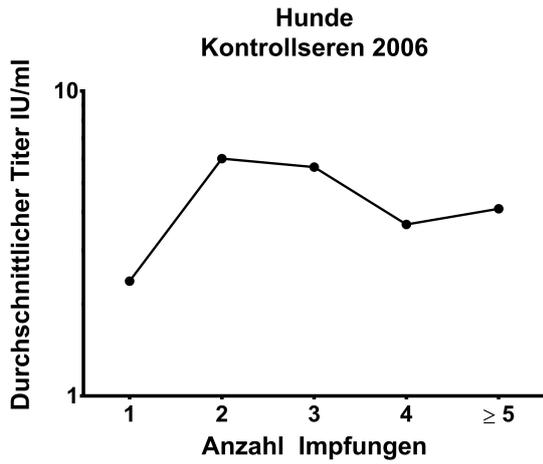


Abbildung 3.14.: Durchschnittstiter aller Kontrollseren von Hunden unter Berücksichtigung der Impfhistorie der Tiere.

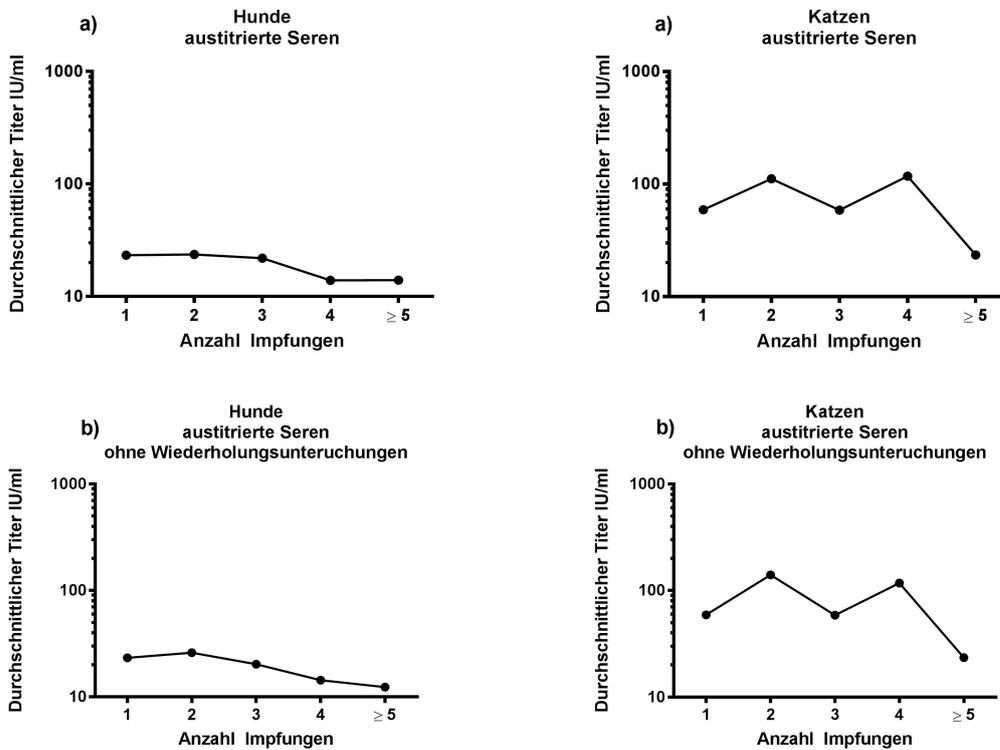


Abbildung 3.15.: Durchschnittlicher Titer der hohtitrigen Diagnostikseren in Abhängigkeit von der Impfgeschichte. In Reihe a) sind die Ergebnisse bei Berücksichtigung aller untersuchten Seren dargestellt. In Reihe b) sind die Seren von Wiederholungsuntersuchungen ausgenommen.

### 3.3. Auswertung der Access-Datenbank des Diagnostischen Labors

Die Verteilung nach Tierarten ist aus Abb. 3.16 ersichtlich. Die meisten Tiere wurden für Reisezwecke untersucht (s. Abb. 3.17). Der Anteil nicht ausreichender Titer bei den einzelnen Tierarten ist in Abb. 3.18 dargestellt. Bei 0,38% der in der Datenbank angelegten Untersuchungen war kein Titerwert eingetragen.

Bei Kontrolluntersuchungen wurde signifikant häufiger ein Titer  $<0.5$  IU/ml gemessen als bei Untersuchungen zu Reisezwecken ( $p < 0.0001$ ). Die Häufigkeitsverteilung der gemessenen Titer bei Tieren, die für Reisezwecke untersucht worden sind, ist in Abb. 3.19 für Hunde und in Abb. 3.20 für Katzen gezeigt. Die Abbildungen machen deutlich, dass der Anteil Tiere mit hohem Titer bei den Katzen deutlich größer ist als bei den Hunden, während deutlich weniger Katzen niedrige Titer aufweisen. So wurde bei 74,66% der Katzen ein Titer oberhalb der höchsten Verdünnung gemessen im Vergleich zu 34,22% bei Hunden. 10,92% der Hunde und 2,84% der Katzen wiesen einen Titer zwischen 0.1 und 0.5 IU/ml auf.

Als Risikofaktor für einen Titer unterhalb des Grenzwertes wurde das Alter des untersuchten Tieres identifiziert: das Risiko für einen unzureichenden Titer war bei Tieren unter 1 Jahr signifikant höher als bei den Tieren im Alter von über 3 Jahren ( $p < 0.0001$ ). Für Hunde wurde das relative Risiko analog zu unseren Ergebnissen aus dem Fragebogen als 5-fach so groß eingeschätzt; bei den Katzen war das Risiko für junge Tiere 6-fach so groß und damit etwas niedriger als durch den Fragebogen ermittelt. Dieses erhöhte Risiko bestand generell für Jungtiere und war unabhängig vom Herkunftsland. Allerdings war auffällig, dass in der Altersklasse  $<1$  Jahr der Anteil nicht ausreichender Titerergebnisse bei Hunden aus Deutschland 32% betrug, während dieser bei Hunden aus den übrigen Ländern zwischen 11% und 23% lag.

Anhand der Auswertung wird die Vermutung gestützt, dass der Anteil nicht ausreichender Titerergebnisse bei Hunden aus Deutschland erheblich höher ist als in anderen europäischen Ländern: Hunde, bei denen die Blutentnahme bei einem in Deutschland niedergelassenen Tierarzt erfolgte, hatten ein signifikant höheres Risiko für einen nicht ausreichenden Titer als Hunde, bei denen die Blutentnahme im Ausland erfolgt war ( $p < 0.0001$ ). Im Vergleich zu Hunden, deren Tierarzt in den Niederlanden niedergelassen war, war das Risiko für einen nicht ausreichenden Titer für einen Hund in Deutschland doppelt so hoch und 3 Mal so hoch wie in UK. Die prozentualen Anteile von Tieren mit nicht ausreichendem Titer sind nach Herkunftsland in Tabelle 3.17 aufgeschlüsselt.

Bei den Katzen ließen sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Ursprungslandes feststellen.

Anhand der Postleitzahlen ließ sich zeigen, dass das Diagnostische Labor Proben aus ganz Deutschland mit Schwerpunkt im Nordwesten erhielt (s. Abb. 3.21). Bei den Proben aus dem Ausland machten Einsendungen aus den Niederlanden, der Türkei, Finnland, Spanien und Bulgarien den größten Anteil aus. 8% der Einsendungen von Hunden bzw. 14% von Katzen kamen aus sonstigen Staaten.

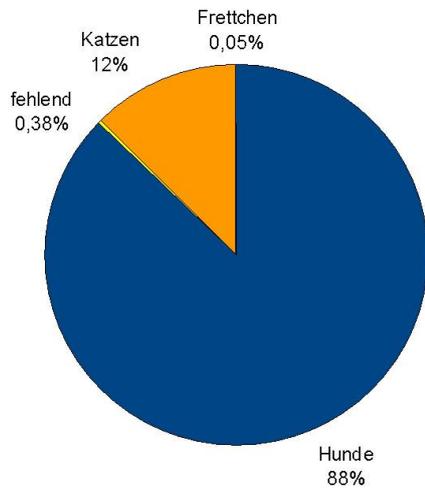


Abbildung 3.16.: Prozentualer Anteil der Einsendungen nach Tierarten

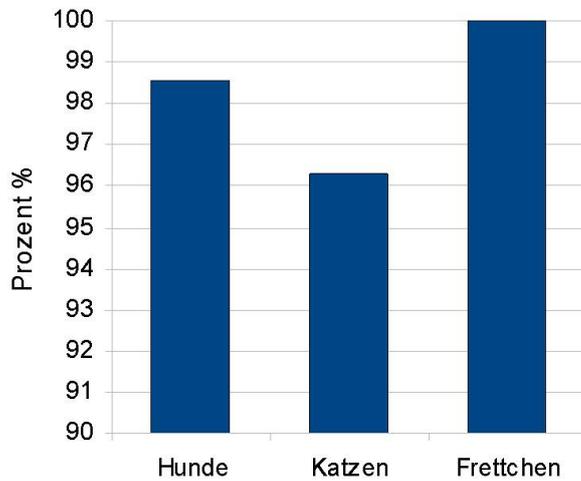


Abbildung 3.17.: Prozentualer Anteil der Untersuchungen zu Reisezwecken bei den einzelnen Tierarten

### 3. Ergebnisse

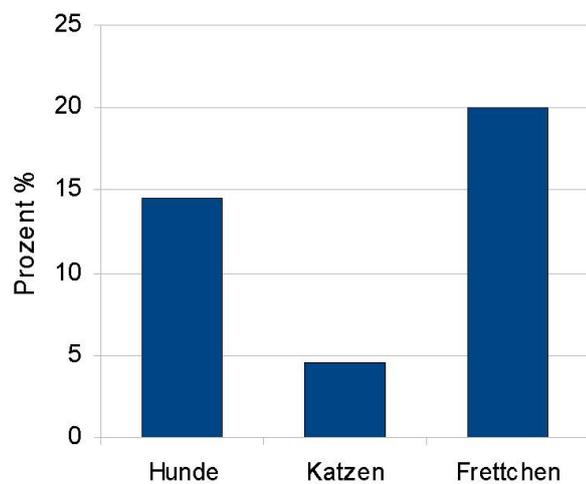


Abbildung 3.18.: Prozentualer Anteil von Tieren mit Titer  $< 0.5 \text{ IU/ml}$  bei den einzelnen Tierarten

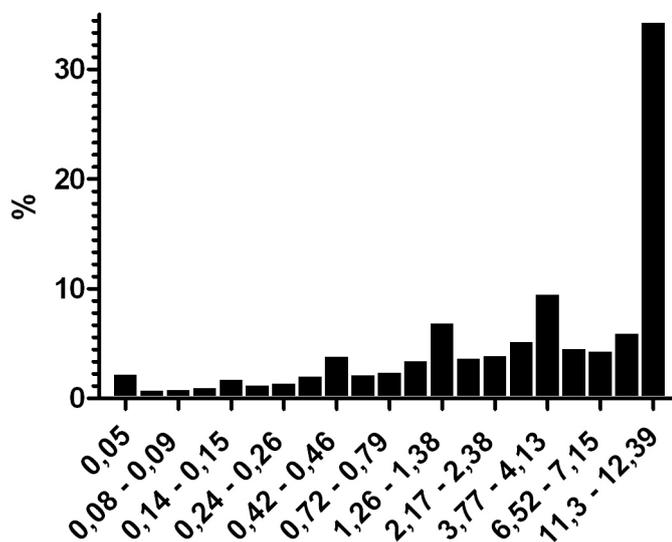


Abbildung 3.19.: Häufigkeitsverteilung der Titer bei Hunden, die für Reisezwecke untersucht worden sind.

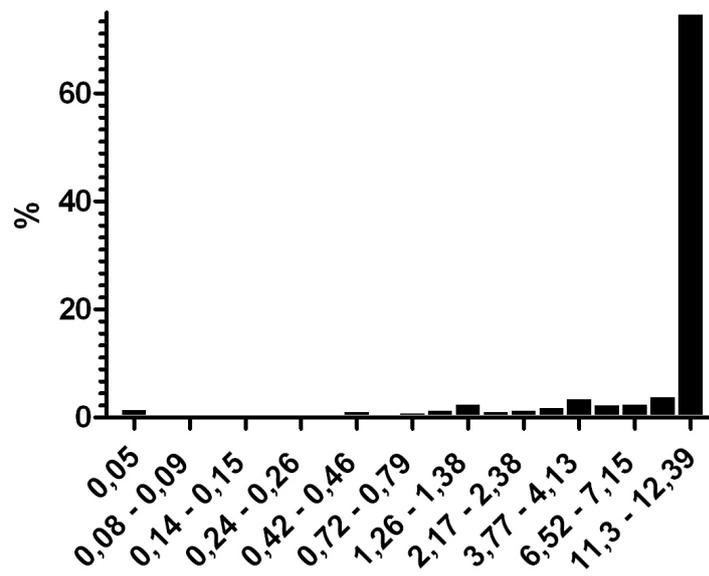


Abbildung 3.20.: Häufigkeitsverteilung der Titer bei Katzen, die zu Reisezwecken untersucht worden sind.

Tabelle 3.17.: Titer bei Hunden in Abhängigkeit vom Herkunftsland, nur Reiseuntersuchungen

Herkunftsland	% der Einsendungen	<0.5 IU/ml	≥0.5 IU/ml
Deutschland	71,4	15.52 %	84.48 %
Bulgarien	1,7	9.96 %	90.04 %
Finnland	4,4	9.56 %	90.44 %
Grossbritannien	0,3	9.56 %	94.44 %
Niederlande	7,3	8.71 %	91.29 %
Spanien	3,8	7.54 %	92.46 %
Türkei	3,4	15.63 %	84.37 %
sonstiges Ausland	7,8	11.53 %	88.47 %

### 3. Ergebnisse

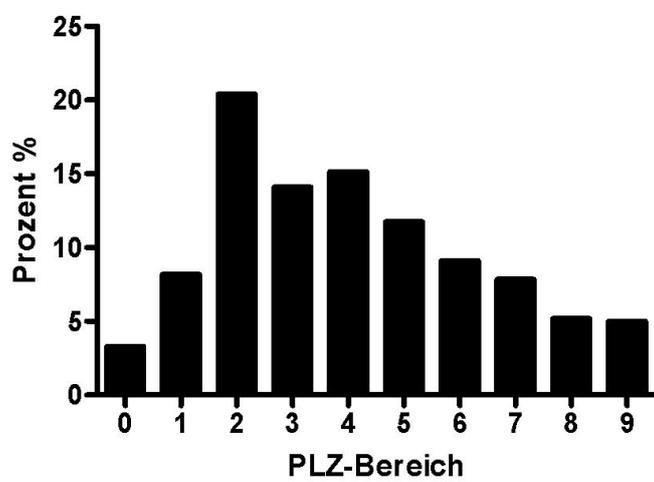


Abbildung 3.21.: Herkunft der zur Tollwutantikörperbestimmung eingesendeten Proben aus Deutschland anhand der Postleitzahl des einsendenden Tierarztes

### 3.4. Impfversuche Katzen

Alle geimpften Katzen zeigten 5 Wochen p.vacc. einen deutlichen Titeranstieg (s. Abb. 3.22). Bei fast allen Tieren wurde 5 bzw. 11 Wochen nach der Impfung der höchste Wert gemessen und der Titer fiel anschließend langsam ab. Lediglich bei einer mit Impfstoff H geimpften Katze wurde der höchste Titer 6 Monate p.vacc. festgestellt. Bei allen geimpften Katzen konnte an mindestens einem Zeitpunkt ein Titer  $\geq 0.5$  IU/ml gemessen werden. Die Kontrolltiere serokonvertierten zu keinem Zeitpunkt.

Bei den mit Impfstoffen E, G und H geimpften Tieren verblieb der Titer im Median über einen Zeitraum von 3 Jahren oberhalb des Grenzwertes, während von den mit Impfstoff A geimpften Tieren mehr als die Hälfte ab 10 Monate nach der Impfung dauerhaft einen Titer unter dem Grenzwert aufwiesen. Bei keiner der mit Impfstoff E geimpften Katzen wurde bis 3 Jahre nach der Impfung ein Wert  $< 0.5$  IU/ml gemessen. Bei 1 von 6 bzw. 1 von 5 der mit den adjuvansfreien Impfstoffen G und H geimpften Katzen lag der Titer 2,5 bzw. 3 Jahre nach der Erstimpfung unterhalb des Grenzwertes.

Im Verlauf des Versuchs fiel bei 6 Tieren (21%) der Titer vor der Wiederholungsimpfung dauerhaft unter den als schützend angenommenen Titer von  $< 0.5$  IU/ml. Bei 4 Tieren wurden vereinzelt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten Titer knapp unter diesem Wert gemessen, wobei bei allen diesen Tieren der Titer unmittelbar vor der Wiederholungsimpfung nach 2,5 bis 3 Jahren ausreichend war.

Der Effekt der Erstimpfung wurde mit einem gemischt-linearen Varianzanalysemodell für wiederholte Messungen untersucht. Zwischen den Medianen der Titerwerte der einzelnen Gruppen zeigten sich deutliche Unterschiede. Der adjuvanshaltige Impfstoff E rief signifikant höhere Titer als die übrigen 3 Impfstoffe hervor (s. Tab. 3.18). Der ebenfalls adjuvanshaltige Impfstoff A schnitt dagegen signifikant schlechter ab als der auf Basis des gleichen Virusstammes hergestellte, adjuvansfreie Impfstoff G. Zwischen den beiden adjuvansfreien Impfstoffen G und H konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Tabelle 3.18.: 1. Impfversuch mit Katzen, Vergleich der Impfstoffgruppen nach einfacher Impfung.

Vergleich	p-Wert*
A mit G	<b>0,0390</b>
A mit E	<b>&lt;0,0001</b>
A mit H	0,2246
G mit E	<b>0,0003</b>
G mit H	1
E mit H	<b>&lt;0,0001</b>

### 3. Ergebnisse

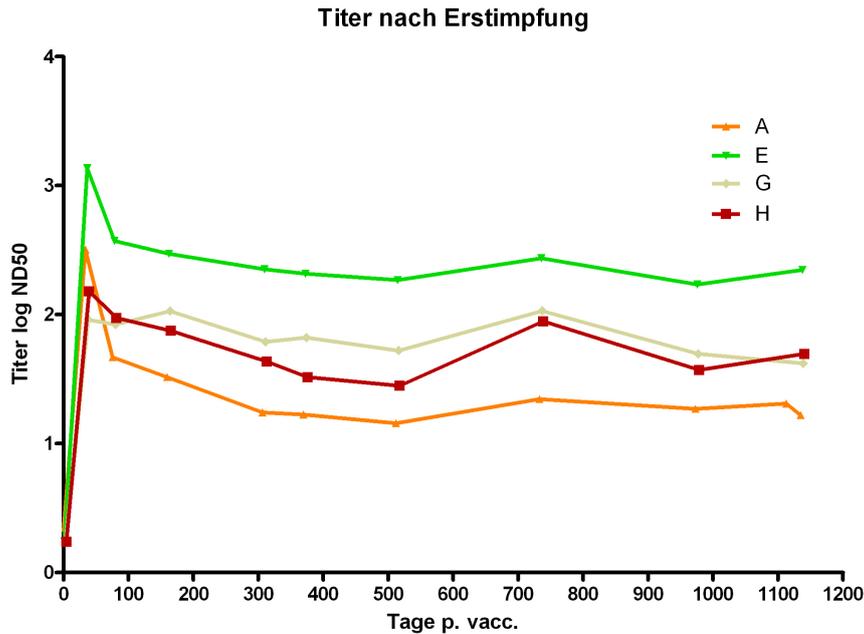


Abbildung 3.22.: Titerverlauf bei Katzen nach der Erstimpfung. Gezeigt ist der geometrische Mittelwert. Für die statistische und graphische Auswertung wurden die Titer in  $\log_{10}ND_{50}$  dargestellt.

Nach Verabreichung der Boosterimpfung nach 2,5 bis 3 Jahren stieg bei allen Katzen der Titer unabhängig vom verwendeten Impfstoff und dem unmittelbar vor der Impfung gemessenen Titer deutlich an. Die erreichten Titerwerte überstiegen bei allen Katzen deutlich die nach Erstimpfung gemessenen Titer. 4 Wochen nach der zweiten Impfung konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den eingesetzten Impfstoffen beobachtet werden (s. Abb. 3.23).

Im 2. Impfversuch stieg bei allen geimpften Tieren der Titer innerhalb von 4 Wochen nach der Erstimpfung deutlich an (s. Abb. 3.24). 4 Wochen nach Verabreichung der 2. Dosis war bei 4 von 8 Tieren der Gruppe 1 ein leichter Titeranstieg nachweisbar. Bei den anderen 4 Tieren der Gruppe 1 lag der Titer zu diesem Zeitpunkt geringfügig niedriger als 4 Wochen nach der ersten Impfung.

Im Hinblick auf die Höhe der gemessenen Titer 4 Wochen, 6 Monate und ein Jahr nach der Erstimpfung konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Dennoch fiel auf, dass in der Gruppe der einmalig geimpften Katzen bei 2 Tieren der Titer nach einem Jahr unter dem als schützend angenommenen Grenzwert lag, während dies bei keiner der zweimalig geimpften Katzen der Fall war. Die Titer der übrigen Katzen lagen unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit auf gleichem Niveau.

Die einmalig geimpfte Gruppe des 2. Versuchs wurde in einem weiteren Vergleich in die Auswertung des 1. Versuchs einbezogen. Aufgrund der Vergleichbarkeit der Versuchsbedingungen ist dieses Vorgehen möglich und erlaubt den direkten Ver-

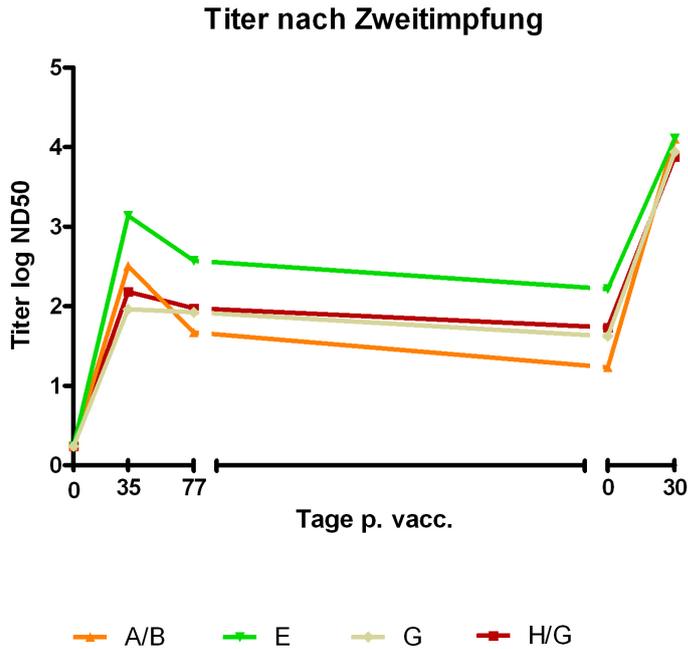


Abbildung 3.23.: Titerverlauf bei Katzen nach der 2. Impfung. Gezeigt ist der geometrische Mittelwert. Die zweite Impfung erfolgte 2,5 bis 3 Jahre nach der Erstimpfung.

gleich der beiden Impfstoffe A und B (s. Abschnitt 2.4.1). Nachdem Impfstoff A auf dem Markt nicht mehr verfügbar war, wurde Impfstoff B als Ersatz in den Versuchen verwendet. Die durchschnittlich bei Katzen nach der Erstimpfung mit den beiden Impfstoffen hervorgerufenen Titer unterschieden sich nur geringgradig. Ein signifikanter Unterschied konnte nicht nachgewiesen werden ( $p=1.000$ , s. Tab. 3.19). Hinsichtlich signifikanter Unterschiede zu den übrigen Impfstoffen waren die Impfstoffe A und B ebenfalls vergleichbar.

### 3.5. Impfversuch Frettchen

Keins der 64 Frettchen wies zu Beginn des Versuchs Antikörper gegen das Tollwut- oder das Staupevirus auf. Nach der Impfung konnte bei allen 57 gegen Tollwut geimpften Frettchen ein deutlicher Anstieg des Antikörpertiters gegen Tollwutvirus nachgewiesen werden (s. Abb. 3.25, 3.26 und 3.27). Nachdem bei den meisten Tieren der höchste Titer 4 Wochen p.vacc. gemessen wurde, fiel er anschließend langsam wieder ab. Bei 2 Tieren wurde zu keinem untersuchten Zeitpunkt ein Titer  $\geq 0.5$  IU/ml gemessen.

Zwischen den Medianen der Titerwerte der einzelnen Gruppen zeigten sich deutliche Unterschiede. Im Vergleich mit der ungeimpften Kontrollgruppe stieg in allen geimpften Gruppen der Titer signifikant an. Analog zu den Ergebnissen des ersten

### 3. Ergebnisse

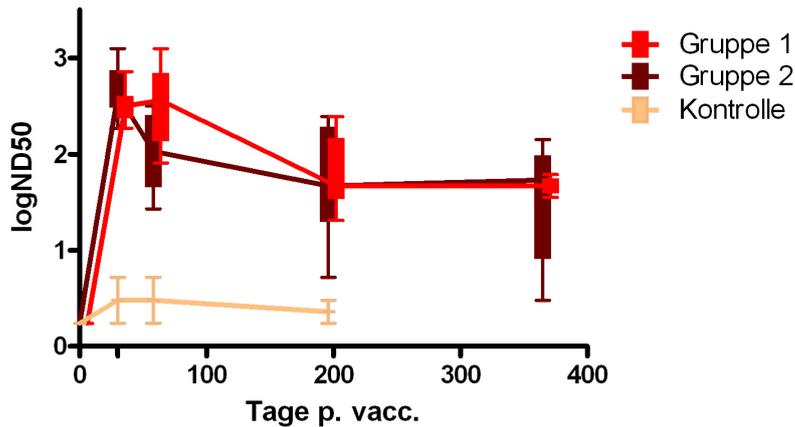


Abbildung 3.24.: Titerverlauf im 2. Impfversuch mit Katzen.

Tabelle 3.19.: Kombinierte Auswertung der Impfversuche mit Katzen, Vergleich der Impfstoffgruppen nach einfacher Impfung.

Vergleich	p-Wert*
<b>B mit A</b>	<b>1</b>
B mit G	0.6428
B mit E	0.0007
B mit H	1
A mit G	0.0692
A mit E	<0.0001
A mit H	0.3968
G mit E	0.0002
G mit H	1
E mit H	<0.0001

Katzenversuchs waren die Titer der mit Impfstoff E geimpften Tiere signifikant höher als die Titer aller übrigen Gruppen. Dieser adjuvanshaltige Impfstoff rief signifikant höhere Titer hervor als der mit einem nahe verwandten Impfstamm hergestellte, adjuvansfreie Impfstoff H. Im Gegensatz dazu schnitt der adjuvanshaltige Impfstoff D signifikant schlechter ab als der adjuvansfreie, unter Verwendung des gleichen Impfstammes hergestellte Impfstoff G.

Kein signifikanter Unterschied konnte zwischen den beiden mit Impfstoff C geimpften Gruppen („C“ bzw. „C + 4 Wo“) beobachtet werden.

Der Titer gegen das Staupevirus (CDV) stieg bei allen 64 Tieren nach der Impfung deutlich an (s. Abb. 3.28 und 3.29). Lediglich 2 Tiere zeigten 4 Wochen nach der Impfung einen Titer <1:2 log<sub>10</sub>ND<sub>50</sub>. Der Titer gegen CDV verblieb bei allen Tieren bis zur Wiederholungsimpfung auf hohem Niveau. Die Boosterimpfung nach 8 Monaten beeinflusste die Höhe der gemessenen Titer nur geringgradig.

Nach Verabreichung der Wiederholungsimpfung stieg bei allen Frettchen der Antikörpertiter gegen Tollwutvirus innerhalb von vier Wochen deutlich an (s. Abb. 3.25 und 3.26). Die von Impfstoff D hervorgerufenen Titer waren signifikant niedriger als die von den Impfstoffen C bzw. E hervorgerufenen Titer. Die Antikörpertiter gegen CDV zeigten auch nach der dritten Impfung lediglich einen geringgradigen Anstieg.

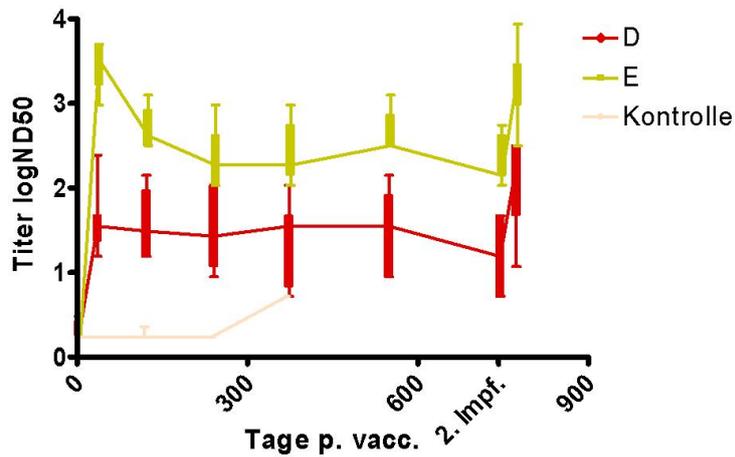


Abbildung 3.25.: Titerverlauf bei Frettchen nach der Impfung mit den adjuvanshaltigen Tollwutimpfstoffen D und E

### 3. Ergebnisse

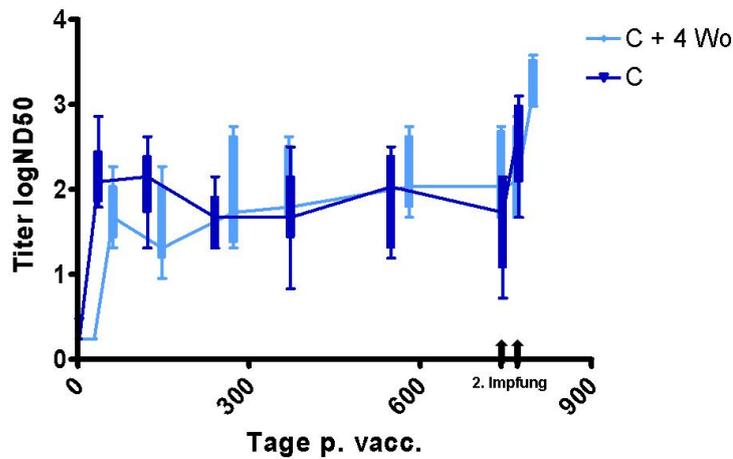


Abbildung 3.26.: Titerverlauf bei Frettchen nach der Impfung mit dem adjuvanshaltigen Tollwutimpfstoff C. Die Frettchen der Gruppe C wurden an Tag 0 sowohl gegen Staupe als auch gegen Tollwut geimpft. In der Gruppe „C + 4 Wo“ erfolgte die Impfung gegen Tollwut an Tag 30.

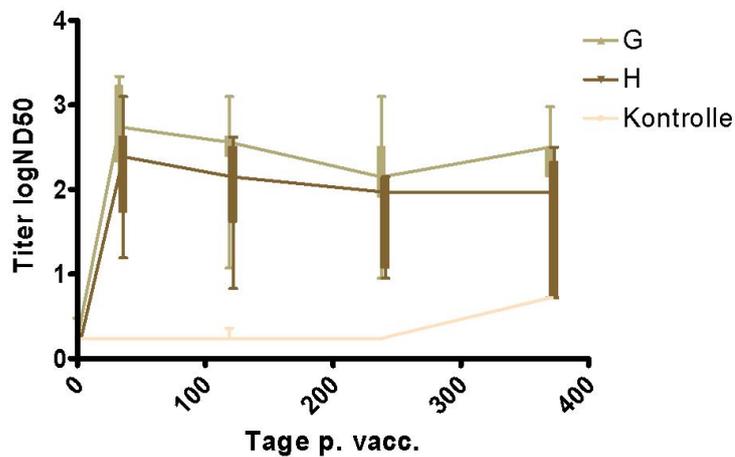


Abbildung 3.27.: Titerverlauf bei Frettchen nach der Impfung mit den adjuvansfreien Tollwutimpfstoffen G und H

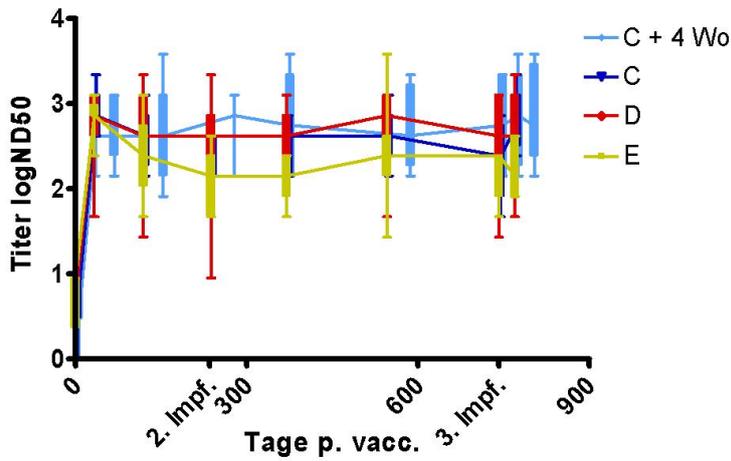


Abbildung 3.28.: Verlauf der durchschnittlich gemessenen Antikörpertiter gegen Staupevirus bei den Frettchen, die mit adjuvanshaltigen Tollwutimpfstoffen geimpft wurden. Die Impfungen gegen Staupe erfolgten an Tag 0, nach 8 Monaten und nach 2 Jahren.

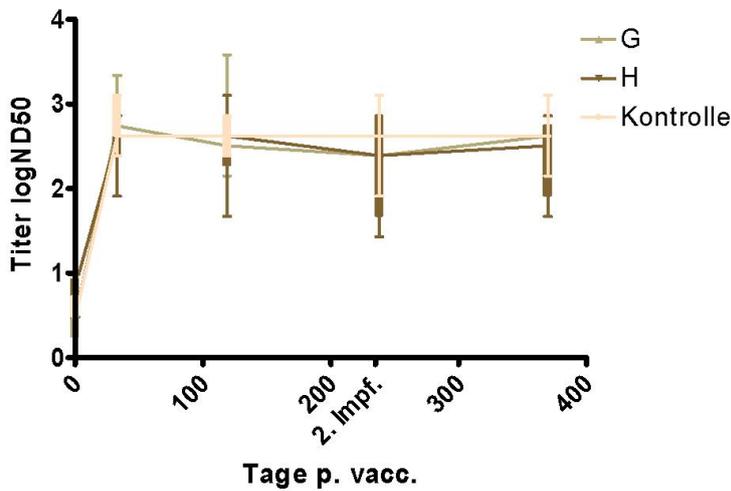


Abbildung 3.29.: Verlauf der durchschnittlich gemessenen Antikörpertiter gegen Staupevirus bei Frettchen bei den mit adjuvansfreien Tollwutimpfstoffen geimpften Gruppen und bei der Kontrollgruppe. Die Impfungen gegen Staupe erfolgten an Tag 0 und nach 8 Monaten.

### 3.6. Impfversuch Hunde

Zwischen den beiden Impfstoffen E (Gruppe 1) und B (Gruppe 2) und den Impfschemata (a und b) konnten signifikante Unterschiede nachgewiesen werden (s. Abb. 3.30). Zunächst wurde der Effekt der ersten Impfung mit einem gemischt-linearen Varianzanalysemodell für wiederholte Messungen mit dem festen Faktor Gruppe und dem Titer vor der ersten Impfung als Kovariable untersucht. Betrachtet wurde nur der erste Entnahmezeitpunkt nach der Erstimpfung. Dieser war bei den Gruppen 1a und 2a der Tag 30 p.vacc. und bei den Gruppen 1b und 2b der Tag 120 p.vacc. Der Impfstoff des Herstellers E führte zu signifikant höheren Titern als der Impfstoff des Herstellers B (s. Tab. 3.20). Tendenziell lagen die Titer 120 Tage nach der Impfung niedriger als 30 Tage p.vacc. 4 von 16 Tieren (25%), die die Zweitimpfung 120 Tage nach der Erstimpfung erhielten, wiesen zu diesem Zeitpunkt einen Titer unterhalb des Grenzwertes auf. Im Gegensatz dazu wurde bei allen Tieren, die nach 30 Tagen die Zweitimpfung erhielten, zu diesem Zeitpunkt ein Titer  $\geq 0.5$  IU/ml (N=18) gemessen (Einzelergebnisse nicht gezeigt).

Im nächsten Schritt wurde der Effekt der 2. Impfung mit einem gemischt-linearen Modell für wiederholte Messungen je Tier untersucht. Betrachtet wurde der Titer zu den Zeitpunkten 30 und 120 Tage nach der zweiten Impfung mit den Faktoren Gruppe, zeitlicher Abstand zur 2. Impfung (Tag) und Wechselwirkung von Gruppe und Tag. Der Titer vor der ersten Impfung fand als Kovariable Berücksichtigung. Der Effekt der 2. Impfung war bei den b-Gruppen besser und nachhaltiger: 30 Tage und auch noch 120 Tage nach der 2. Impfung lagen die Titer in den b-Gruppen jeweils höher als in den a-Gruppen. Der Grenzwert wurde bei den Tieren, die die Boosterimpfung im Alter von 7 Monaten erhalten hatten, nicht mehr unterschritten, was bei 2 Tieren der Gruppe 2a 120 Tage nach der Boosterimpfung der Fall war. Der Unterschied zwischen den Gruppen 2a und 2b ist signifikant ( $p < 0.05$ ). Die Gruppen 1a und 2a unterscheiden sich ebenfalls signifikant voneinander (s. Tab. 3.21).

Aufgrund der geringen Anzahl der Messwerte nach der Wiederholungsimpfung nach einem Jahr werden diese Ergebnisse rein deskriptiv dargestellt. In den Gruppen 1a und 1b lagen die Titerwerte nach einem Jahr bei den getesteten Tieren auf einem ähnlich hohen Niveau wie 120 Tage nach der zweiten Impfung und der Titer änderte sich bei diesen Tieren durch die erneute Impfung nicht. In der Gruppe 2a war der Titer bei den meisten Tieren deutlich gesunken und stieg durch die Wiederholungsimpfung signifikant an. In der Gruppe 2b standen die Daten von 2 Tieren zur Verfügung. Der Titer änderte sich bei diesen Tieren nach der Wiederholungsimpfung nur geringfügig.

### 3.7. Einfluss des Testvirus (FAVN-Test)

Die eingesetzte Virusmenge bei den Virusgebrauchsverdünnungen reichte von  $2,26 \log_{10} \text{TCID}_{50}$  bis  $3,31 \log_{10} \text{TCID}_{50}$  pro  $150 \mu\text{l}$ . Dieses entspricht einer Virusmenge von  $1,78 \log_{10}$  (=60,67)  $\text{TCID}_{50}$  bis  $2,83 \log_{10}$  (=680,67)  $\text{TCID}_{50}$  pro Kavität. Die

### 3.7. Einfluss des Testvirus (FAVN-Test)

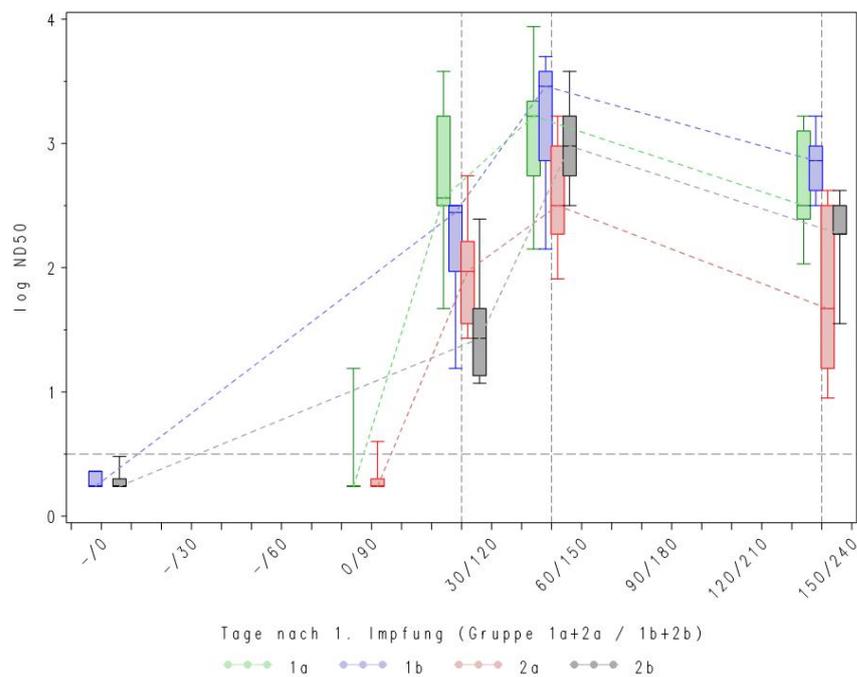


Abbildung 3.30.: Titerverlauf in den 4 Gruppen. Die Gruppen 1a und 1b wurden mit den Impfstoffen des Herstellers E geimpft und die Gruppen 2a und 2b mit den Impfstoffen des Herstellers B. In den Gruppen 1a und 2a erfolgte die zweite Impfung 30 Tage und in den Gruppen 1b und 2b 120 Tage nach der Erstimpfung. In der Abbildung wird der Tag 30 der Gruppen a und der Tag 120 der Gruppen b (Zeitpunkt der zweiten Impfung) als gemeinsamer Referenzzeitpunkt dargestellt. Dadurch lassen sich der Effekt der Boosterimpfung zu den unterschiedlichen Zeitpunkten sowie der Einfluss des zeitlichen Abstands bis zur Blutentnahme nach der Erstimpfung graphisch darstellen.

Tabelle 3.20.: Impfversuch Hunde, Vergleich der Impfstoffgruppen nach der ersten Impfung

Vergleich	p-Wert*
1a mit 2a	<b>0.0079</b>
1b mit 2b	0.0351
1a mit 1b	0.0901
2a mit 2b	0.2856

\*p-Werte adjustiert für multiple Vergleiche nach Bonferroni

### 3. Ergebnisse

Tabelle 3.21.: Impfversuch Hunde, Vergleich der Impfstoffgruppen nach der zweiten Impfung

Vergleich	p-Wert*
1a mit 2a	<b>0.0012</b>
1b mit 2b	0.1470
1a mit 1b	0.8275
2a mit 2b	<b>0.0475</b>

\*p-Werte adjustiert für multiple Vergleiche nach Bonferroni

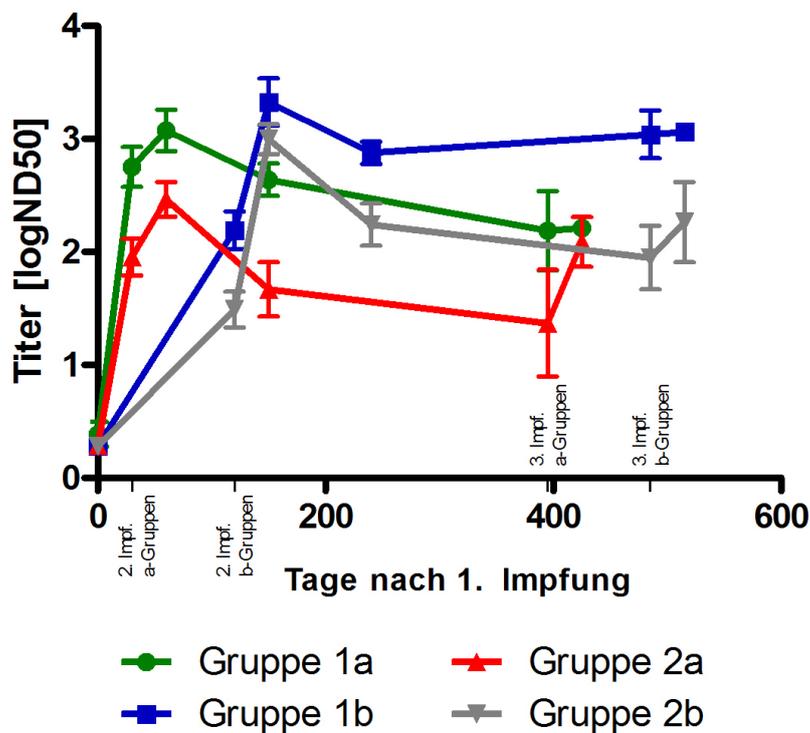


Abbildung 3.31.: Impfversuch Hunde

Titerverlauf in den 4 Gruppen einschließlich der Werte nach der Wiederholungsimpfung ein Jahr nach der Boosterimpfung. Die Werte der letzten beiden Blutentnahmetermine (Tag 395/425 in den Gruppen 1a und 2a bzw. 485/515 in den Gruppen 1b und 2b) basieren auf wenigen Werten, so dass sie lediglich deskriptiv dargestellt werden.

maximal eingesetzte Virusmenge pro Kavität lag damit oberhalb der laut Arbeitsanweisung (SOP) erlaubten Virusmenge von 300 TCID<sub>50</sub>.

Bei der Auswertung der Ergebnisse wurde zunächst eine dreifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen mit den Faktoren Testdurchgang, Impfstoffgruppe und Testvirus durchgeführt. Dabei konnten signifikante Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Testdurchgängen und dem Testvirus ( $p=0.0034$ ) sowie zwischen der Impfstoffgruppe und dem Testvirus ( $p<0.0001$ ) beobachtet werden. Zwischen allen drei Faktoren wurden keine signifikanten Wechselwirkungen beobachtet ( $p=0.3954$ ).

In einem zweiten Schritt erfolgte eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen mit den Faktoren Testdurchgang und Testvirus getrennt nach Impfstoffgruppen. In den Impfstoffgruppen C und E konnte dabei ein signifikanter Einfluss des eingesetzten Testvirus auf das Testergebnis beobachtet werden ( $p<0.0001$ ). In der Impfstoffgruppe C konnte zudem ein signifikanter Einfluss des Testdurchgangs festgestellt werden ( $p=0.0034$ ). In der Impfstoffgruppe D wurde für beide Faktoren keine Wechselwirkung beobachtet. Die Ergebnisse wurden mit dem nicht-parametrischen Friedman-Test abgesichert.

Anschließend wurden für jede Gruppe die Gruppenmittelwerte gegen den Referenzvirusstamm CVS nach Dunnett verglichen und der Mittelwert und das 95%-Konfidenzintervall anhand der Standardabweichung der Differenzen zu CVS berechnet. Der Testdurchgang wurde bei diesem Schritt nicht berücksichtigt. In den Impfstoffgruppen C und E konnten signifikante Unterschiede zwischen CVS und den übrigen Testviren beobachtet werden. Eine graphische Darstellung der gemessenen Titerdifferenzen für jedes Serum zwischen homologem und heterologem Virusstamm zeigt Abbildung 3.32.

Der homologe Testvirusstamm führte in Impfstoffgruppe C zu signifikant höheren Titern als CVS, während in der Impfstoffgruppe E mit dem homologen Testvirusstamm niedrigere Titer als mit CVS gemessen wurden. Mit den übrigen beiden heterologen Virusstämmen wurden in beiden Impfstoffgruppen jeweils niedrigere Titer gemessen. In der Impfstoffgruppe D konnten keine signifikanten Wechselwirkungen beobachtet und so das Ergebnis aus dem zweiten Schritt bestätigt werden.

Die Relevanz der beobachteten, signifikanten Unterschiede für das Testergebnis ließ sich anhand des 95%-Konfidenzintervalls abschätzen. Der durch das eingesetzte Testvirus bedingte Unterschied beträgt nach unseren Ergebnissen weniger als eine Titerstufe. Ein relevanter Einfluss auf das Ergebnis ist somit ausschließlich bei Tieren zu erwarten, deren Titer knapp unterhalb des Grenzwertes liegt. Von Tieren der Studiengruppe, die mit Impfstoff C geimpft worden waren, lag der Titer bei 50 von 202 knapp unterhalb des Grenzwertes, was einem Anteil von 24,75% entspricht. Dabei handelte es sich ausschließlich um Hunde. Im Hinblick auf die Gesamtzahl Hunde entspricht dies 2,7%.

### 3. Ergebnisse

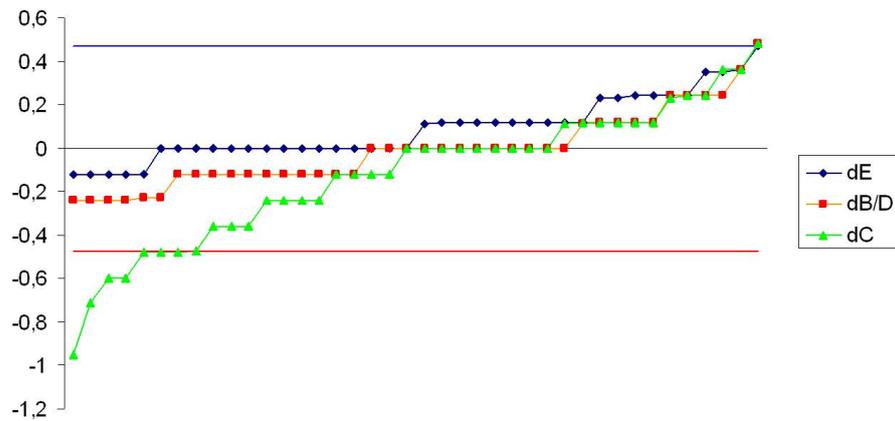


Abbildung 3.32.: Titerdifferenz zwischen homologem und heterologem Virusstamm [logND50]. Die berechnete Differenz wurde für jede Gruppe in aufsteigender Reihenfolge dargestellt. Jeder Punkt steht für ein Serum. Ein negativer Wert bedeutet, dass im homologen Testsystem ein höherer Titer als im heterologen Testsystem gemessen worden ist. Die zu erwartende Standardabweichung bei Serumneutralisationstests von bis zu einer Verdünnungsstufe ist als rote bzw. blaue Linie eingezeichnet.

## 4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit enthält eine umfassende Erhebung zum Verlauf des Antikörpertiters nach der Tollwutimpfung bei Hunden, Katzen und Frettchen. Anhand des Antikörpertiters kann mit ausreichender Sicherheit eine Aussage zu der Wahrscheinlichkeit getroffen werden, ob ein Tier im Falle einer Infektion gegen die Tollwutkrankung geschützt ist. Hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen Antikörpertiter und Schutz bei Belastungsinfektionen zog Aubert [9] aus Belastungsversuchen folgende Schlüsse:

1. Ein Hund mit messbarem Antikörpertiter unmittelbar vor dem Belastungsversuch hat die höchste Wahrscheinlichkeit, eine schwerwiegende Belastungsinfektion zu überleben.
2. Ein Hund ohne messbaren Antikörpertiter unmittelbar vor dem Belastungsversuch hat eine hohe Wahrscheinlichkeit, eine schwerwiegende Belastungsinfektion zu überleben, wenn nach der Impfung eine Serokonversion erfolgte.
3. Einige Hunde werden eine schwerwiegende Belastungsinfektion nicht überleben, selbst wenn sie über messbare neutralisierende Antikörper vor dem Belastungsversuch verfügen; in der Regel sind die Titer dieser Tiere die niedrigsten der Gruppe.

Die Grenze zu unspezifischen Reaktionen liegt bei den von der OIE anerkannten Methoden bei einem Messwert von 0.1 IU/ml. Bei höheren Werten kann davon ausgegangen werden, dass eine Serokonversion erfolgt ist [9]. Ein Titer von mindestens 0.5 IU/ml nach der Impfung wird beim Menschen als hoher Titer angesehen, der mit einem sicheren Schutz vor der Erkrankung korreliert [109]. Dieser Wert fand Eingang in die rechtlichen Bestimmungen zum grenzüberschreitenden Verkehr von Heimtieren und ist auch für Tiere international anerkannt als Marker für vorhandene Immunität [78]. Die Untersuchungen von Aubert [9] zur Korrelation zwischen Antikörperspiegel und Immunität belegen, dass die Forderung nach einem hohen Titer gerechtfertigt ist, um mit ausreichender Sicherheit von einem Schutz ausgehen zu können. Verbunden mit dem hohen Sicherheitsniveau ist ein relativ hoher Anteil Tiere, die trotz regelhafter Impfung und wahrscheinlich bestehendem Schutz den rechtlichen Grenzwert unterschreiten und aus diesem Grund nicht grenzüberschreitend reisen dürfen. Diese Tiere müssen ggf. erneut geimpft und untersucht werden. Im Hinblick auf die hohe Letalität der Tollwut und die im Falle eines Impfdurchbruchs entstehenden Folgekosten ist dieses hohe Schutzniveau jedoch angezeigt.

In den beschriebenen Untersuchungen wurden neben der retrospektiven Datenerfassung und -auswertung von geimpften und überwiegend zu Reisezwecken unter-

#### 4. Diskussion

suchten Tieren eigene Impfversuche über mehrere Jahre bei Hunden, Katzen und Frettchen durchgeführt, sowie der Einfluss des vorgeschriebenen Labortests zur Bestimmung des Tollwutantikörpertiters auf das Testergebnis untersucht.

Die Daten aus der epidemiologischen Erhebung mit Fragebogen können als qualitativ hochwertig angesehen werden. Die Tierärzte wurden zu zwei in der Regel mehrere Wochen auseinander liegenden Zeitpunkten von zwei verschiedenen Instituten gebeten, Daten zur Impfgeschichte eines Tieres anzugeben: zunächst bei Einsendung der Blutprobe zur Antikörperbestimmung vom Diagnostischen Labor des Instituts für Virologie der Universität Gießen sowie nach Vorliegen des Untersuchungsergebnisses vom Paul-Ehrlich-Institut zu Zwecken der Pharmakovigilanz. Durch den Abgleich der Daten konnten diese verifiziert werden. Inkomplette Angaben wurden vervollständigt bzw. widersprüchliche Angaben identifiziert und ggf. korrigiert. Erwartungsgemäß war der Rücklauf von Fragebögen für die Kontrollgruppe deutlich geringer als für Tiere mit nicht ausreichendem Titer.

Ergänzend zu der Datenerhebung mit Fragebogen wurden die Daten aller im Studienzeitraum untersuchten Tiere ausgewertet. Diese Daten enthielten keine Angaben zur Impfhistorie, sodass keine Auswertung im Hinblick auf länderspezifische Unterschiede hinsichtlich eingesetzter Impfstoffe, Alter bei Impfung und zeitlichem Abstand zwischen Impfung und Blutentnahme erfolgen konnte.

Anhand der erhobenen Daten wurden Risikofaktoren für einen nicht ausreichenden Titer ermittelt. Die Datenerhebung erfolgte nach Gruppen getrennt für Tiere mit ausreichendem Titer (Titer  $\geq 0.5$  IU/ml, Kontrollgruppe) bzw. mit nicht ausreichendem Titer (Titer  $< 0.5$  IU/ml, Studiengruppe). Über die Berechnung des Risikoverhältnisses, der Odds Ratio, wurde die Verteilung der interessierenden Parameter in den beiden Gruppen miteinander verglichen.

### 4.1. Ergebnisse bei Hunden

Übereinstimmend mit Arbeiten aus Frankreich, England und Schweden [25][64][12] wurde sowohl anhand des Fragebogens als auch anhand der Auswertung der Accessdatenbank ein junges Alter des Hundes als ein wichtiger Risikofaktor identifiziert. Je jünger ein Tier, desto höher war die Wahrscheinlichkeit, einen Titer unter 0.5 IU/ml aufzuweisen. Das höchste Risiko für einen nicht ausreichenden Titer wiesen Hunde auf, die vor dem gesetzlich vorgegebenen Alter von 12 Wochen geimpft worden waren. Dieses traf immerhin auf jeden 15. Hund zu. Es ist bekannt, dass bei der Impfung von Jungtieren Interferenz mit passiv über das Kolostrum erworbenen, maternalen Antikörpern auftritt und die aktive Immunisierung gehemmt werden kann [7]. Unsere Daten stützen diese Beobachtung. Wegen der hohen Impfquoten in Deutschland und der Empfehlung, Hündinnen vor dem Decken zu impfen, ist davon auszugehen, dass die meisten Welpen kolostrale Antikörper erhalten hatten. Zudem wiesen 40% der vor dem Mindestalter geimpften Hunde Werte  $< 0.1$  IU/ml auf, welcher als Grenze zu unspezifischen Reaktionen gilt (s.o.). Aussagen hinsichtlich der Schutzwirkung der Impfung lassen sich aus diesen Daten jedoch nicht zuverlässig ab-

leiten. Da keine aktive Immunisierung nachgewiesen werden konnte, ist ein Schutz bei Werten  $<0.1$  IU/ml zumindest als fraglich einzustufen.

Unsere Zahlen lassen aufgrund der gewählten Methodik keine gesicherten Rückschlüsse zu, wie hoch der Prozentsatz ausreichender Titer in einer Altersgruppe nach einfacher Impfung ausfällt. Da für junge Hunde das höchste Risiko für einen nicht ausreichenden Titer identifiziert werden konnte, kann anhand der Auswertung der Accessdatenbank eine Abschätzung vorgenommen werden. Etwa ein Drittel der Hunde im Alter von bis zu 1 Jahr wiesen einen nicht ausreichenden Titer auf. Da ein Teil dieser Tiere gemäß Empfehlungen mehr als einmal gegen Tollwut geimpft wurde, ist davon auszugehen, dass der Anteil nicht ausreichender Titerergebnisse nach einfacher Tollwutimpfung ab der 13. Lebenswoche im ersten Lebensjahr noch über diesem Wert von einem Drittel liegt.

Im Gegensatz zu Befunden aus anderen europäischen Ländern konnten wir jedoch eine Verringerung des Risikos für nicht ausreichende Titer bei steigendem Alter der Tiere nachweisen. In Deutschland wird die Impfung gegen Tollwut zu den Core-Impfungen gezählt und die Anzahl verabreichter Impfungen stieg mit dem Alter der Tiere an. Im Gegensatz dazu besteht in Frankreich, UK und Schweden keine allgemeine Impfeempfehlung und die Impfung gegen Tollwut wird überwiegend als Indikationsimpfung, z.B. bei geplanter Auslandsreise, angewendet. Dass die Tollwutimpfung in Deutschland zur Welpenimpfung gezählt wird, kann an unseren Daten abgelesen werden. Fast 90% der Tiere, die nach der Erstimpfung untersucht wurden, hatten diese bis zum Alter von 6 Monaten erhalten. Die Auslandsreise als Indikation für die Tollwutimpfung scheint im Gegensatz zur Situation in UK und Frankreich eine Ausnahme zu sein. Vor dem Hintergrund der Tollwutfreiheit Deutschlands könnte sich dies in Zukunft ändern. Interessanterweise wurde umso seltener die Erstimpfung bis zum Alter von 6 Monaten berichtet, je häufiger ein Tier bereits geimpft worden war. Bei Tieren, die mehr als 3 Tollwutimpfungen in ihrem Leben erhalten hatten, wurde nur noch bei 25% der Tiere berichtet, dass sie die erste Tollwutimpfung bis zum Alter von 6 Monaten erhalten hatten. Es ist anzunehmen, dass die meisten Tierärzte zum Zeitpunkt der Befragung die komplette Impfgeschichte des Tieres nicht vorliegen hatten. Ferner wurde auf dem Fragebogen nicht explizit darum gebeten, alle bekannten Tollwutimpfungen aufzuführen. Die Aussage zur Anzahl der verabreichten Impfungen weist insofern eine größere Unsicherheit auf, je mehr Impfungen für ein Tier berichtet wurden. Die Empfehlung, Hunde mit 3 Monaten und danach jährlich gegen Tollwut zu impfen, hatte sich im Zeitraum der Datenerhebung nicht geändert.

In der Studiengruppe machten Hunde im Alter von mehr als 3 Jahren einen Anteil von 19,5% aus. Dieser hohe Anteil zeigt, dass bei Hunden unabhängig vom Alter ein Risiko für einen nicht ausreichenden Titer besteht. Das durchschnittliche Alter der Tiere mit nicht ausreichendem Titer war geringer als das der Tiere mit ausreichendem Titer. Aus dem durchschnittlichen Zeitabstand zwischen der Impfung und der Blutentnahme lässt sich schließen, dass fast alle diese Tiere nach Skandinavien reisen sollten. Die bei jungen Tieren identifizierten Risikofaktoren scheinen mit Ausnahme

#### 4. Diskussion

der Anzahl der Impfungen bei älteren Tieren ähnliche Bedeutung zu haben.

Die Anzahl der Impfungen, die ein Hund bis zur Blutentnahme erhalten hatte, wurde in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Autoren als wichtiger Risikofaktor identifiziert [114][106]. Zweifach geimpfte Hunde hatten im Vergleich zu einmal geimpften Tieren ein signifikant niedrigeres Risiko für einen nicht ausreichenden Titer und die dritte Impfung reduzierte das Risiko tendenziell weiter. In der Studiengruppe stieg der durchschnittlich erreichte Titer mit jeder zusätzlichen Impfung an. In der Kontrollgruppe lag der durchschnittliche Titer nach zweifacher Impfung ebenfalls deutlich höher als nach der Erstimpfung, stieg jedoch nach weiteren Impfungen nicht weiter an. Unsere Daten legen nahe, dass mit steigender Anzahl Impfungen die Unsicherheit der Impfgeschichte ansteigt. Effekte von Wiederholungsimpfungen könnten somit von der steigenden Unsicherheit der Impfgeschichte in Abhängigkeit von der berichteten Anzahl Impfungen überlagert worden sein.

Tendenziell fiel der durchschnittliche Titer nach weiteren Impfungen sogar wieder ab. Unabhängig von der steigenden Unsicherheit der Impfgeschichte könnte dies ein Hinweis sein, dass bei bereits mehrfach geimpften Hunden häufiger eine Impfung vor der Blutentnahme z.B. im Rahmen einer geplanten Auslandsreise unterbleibt und sich daher ein längerer zeitlicher Abstand zwischen der letzten Impfung und der Blutentnahme ergibt. Unsere Daten bei mehrfach geimpften Hunden weisen auf einen solchen Grund hin. Tiere, die trotz mehrfacher Impfungen einen nicht ausreichenden Titer aufwiesen, hatten einen signifikant längeren zeitlichen Abstand zwischen der Impfung und der Blutentnahme als Tiere mit ausreichendem Titer. Der zeitliche Abstand zwischen der letzten Impfung und der Blutentnahme stellt einen wichtigen Risikofaktor dar [106]. Hunde, bei denen die Blutentnahme nicht innerhalb von 4 Monaten erfolgte, hatten ein signifikant höheres Risiko für einen nicht ausreichenden Titer als Tiere mit früherer Blutentnahme. Dieser Effekt war nach der Erstimpfung deutlicher ausgeprägt als nach Boosterimpfungen. Es ist bekannt, dass nach einer Erstimpfung insgesamt niedrigere Titer erreicht werden und der Titerabfall schneller und steiler ist als nach Boosterimpfungen. Dieses konnten wir in unserem Impfversuch bestätigen. Bei einmalig geimpften Junghunden wurde der Grenzwert zunächst über-, nach wenigen Monaten aber wieder unterschritten. Im Rahmen des *PETS* wurde explizit empfohlen, die Blutentnahme etwa 30 Tage nach der Impfung durchzuführen. Zu diesem Zeitpunkt soll der zu erwartende Anteil nicht ausreichender Ergebnisse mit etwa 2% am geringsten sein [56]. Jüngste Daten aus den USA zeigen ebenfalls, dass bereits wenige Tage nach der Impfung die höchsten Titerwerte erreicht werden [106]. Die hier vorgestellten Daten unterstützen diese Aussagen: 30 Tage nach der Impfung wiesen alle untersuchten Tiere einen ausreichenden Titer auf, während 120 Tage nach der Erstimpfung bei jedem 4. Hund ein Titer unterhalb des Grenzwertes gemessen wurde. Da es sich um unterschiedliche Individuen handelte, kann jedoch nicht mit Sicherheit gefolgert werden, dass bei jedem Tier zu einem früheren Zeitpunkt ein ausreichender Titer vorgelegen hatte. Eine Blutentnahme 30 Tage nach der Erstimpfung war in den nach Impfschema b geimpften Gruppen nicht vorgesehen worden, um die mit der Studie verbundenen

Belastungen für das Tier und seinen Halter gering zu halten.

120 Tage nach der zweiten Impfung waren die Titer bei allen Tieren gleich hoch oder höher als 120 Tage nach der Erstimpfung. Dieses bestätigt den Befund, dass nach Boosterimpfungen höhere Titer erreicht werden und somit das Risiko für nicht ausreichende Titer geringer ist als nach einer Erstimpfung. Allerdings scheint auch das Alter des Tieres zum Zeitpunkt einer Wiederholungsimpfung einen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit eines nicht ausreichenden Titers zu haben. Bei den Tieren, die die Boosterimpfung im Alter von 7 Monaten erhalten hatten, wurde der Grenzwert nicht mehr unterschritten und es wurden insgesamt höhere Titer als nach der Revakzinierung mit 4 Monaten beobachtet.

Hunde, die mindestens 3 Mal in ihrem Leben gegen Tollwut geimpft worden waren, machten in der Studiengruppe einen Anteil von 17,8% aus. Der lange zeitliche Abstand von im Durchschnitt 200 Tagen zwischen der Impfung und der Blutentnahme bei diesen Tieren zeigt, dass auch nach mehrfacher Impfung der Antikörpertiter innerhalb eines Jahres unter den Grenzwert fallen kann. Bis zur Änderung der „Verordnung zum Schutz gegen die Tollwut“ (Tollwutverordnung) Ende des Jahres 2005 [2] war die Gültigkeit einer Tollwutimpfung bei allen Impfstoffen auf ein Jahr begrenzt. Für die übrigen Komponenten lagen Daten zu einer längeren Dauer der Immunität nicht vor und eine jährliche Wiederholungsimpfung wurde von den Herstellern empfohlen. Seit der Änderung können längere Impfintervalle vom Hersteller in der Gebrauchsinformation angegeben werden. Die meisten Hersteller machten im Laufe des Jahres 2006 von dieser Regelung Gebrauch. Sie reichten die entsprechenden Unterlagen beim Paul-Ehrlich-Institut ein und beantragten für ihre Tollwutimpfstoffe Impfintervalle von bis zu 3 Jahren bei Hunden und 4 Jahren bei Katzen. Da die Datenerhebung mit dem Fragebogen im Rahmen dieser Studie im September 2006 endete, mussten die verlängerten Impfintervalle noch nicht berücksichtigt werden und es konnte von einer Gültigkeit von höchstens einem Jahr für die Tollwutimpfung ausgegangen werden.

Als weiterer Risikofaktor für nicht ausreichende Titer wurde der eingesetzte Impfstoff identifiziert. Wir konnten sowohl in den retrospektiven als auch in den prospektiven Untersuchungen zeigen, dass sowohl nach einfacher als auch nach mehrfacher Impfung ein signifikant unterschiedliches Risiko für einen nicht ausreichenden Titer in Abhängigkeit vom eingesetzten Impfstoff besteht. Dieses Ergebnis stützt die Ergebnisse anderer Studien, in denen ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen Impfstoffen gefunden wurden [64][56][67][12][83]. Wir konnten erstmals zeigen, dass dieser signifikante Unterschied auch nach Wiederholungsimpfungen bestehen bleibt. Die verschiedenen Impfstoffe scheinen die humorale Immunantwort unterschiedlich stark zu stimulieren. Mögliche Ursachen dafür können neben den Inhaltsstoffen (Virusstamm, Dosis, Lösungsmittel, Adjuvans) auch im Herstellungsprozess (Zellsystem, Inaktivierung, Antigenpräparation, Reinigungsschritte, Interaktion Antigen-Adjuvans) begründet sein.

Gegenstand unserer Studien war die über neutralisierende Antikörper messbare humorale Immunantwort. Unterschiede hinsichtlich der zellulären Immunantwort

#### 4. Diskussion

und hinsichtlich der protektiven Wirkung der Impfung sind nicht untersucht worden. Aus diesem Grund sind unsere Daten nicht geeignet, um grundsätzliche Aussagen zur Schutzwirkung der Impfstoffe gegen Erkrankung abzuleiten. Die Wirksamkeit von Tollwutimpfstoffen für Hunde und Katzen wird anhand von Belastungsversuchen gemäß den Anforderungen des Europäischen Arzneibuchs [32] überprüft. Studien zu Entwicklung und Verlauf des Antikörpertiters werden für die Zulassung von Tollwutimpfstoffen für Hunde und Katzen nicht explizit gefordert.

Während bei Belastungsstudien das Zusammenwirken von zellulärer und humoraler Immunantwort hinsichtlich Schutz vor Erkrankung untersucht wird, erfordern die Regeln der Reisebestimmungen ausschließlich die Messung der humoralen Immunantwort. Somit stellt die Induktion eines bestimmten Antikörpertiters über einen bestimmten Zeitraum streng genommen eine eigene Indikation dar, die in dieser Form für die meisten Impfstoffe nicht zugesichert wird. Wenn nach der Impfung eine Serokonversion erfolgt ist, ist das Tier mit hoher Wahrscheinlichkeit auch bei einem Titer  $<0.5$  IU/ml gegen Erkrankung geschützt [9]. Veröffentlichungen aus den letzten Jahren zeigen jedoch auch, dass es selbst bei nachweislich mehrfach geimpften Hunden mit bestätigtem, hohen Antikörpertiter zu Impfdurchbrüchen kommen kann [29][27].

Retrospektiv betrachtet wurde die Frage nach dem Reproduktionsstatus (kastriert ja/nein) im Fragebogen nicht spezifisch genug gestellt, um zuverlässige Angaben zu erhalten. Der Fragebogen wurde von den Tierärzten nach erfolgter Blutuntersuchung ausgefüllt und die Frage nach Kastration auf diesen Zeitpunkt bezogen. Um den Einfluss des Reproduktionsstatus auf das Ergebnis der Titeruntersuchung abzuschätzen, ist jedoch der Zeitpunkt der Impfung ausschlaggebend. Zum Zeitpunkt der Erstimpfung waren fast 90% der Hunde jünger als 180 Tage. In diesem Alter sind Hunde in der Regel noch nicht kastriert. Selbst bei der Frühkastration von Hündinnen frühreifer Rassen erfolgt diese nicht vor dem 5. Lebensmonat. Es kann also davon ausgegangen werden, dass bei den aktuellen Gegebenheiten in Deutschland der Einfluss der Kastration auf den Impferfolg nach der Erstimpfung vernachlässigt werden kann.

Der Zeitpunkt für eine Kastration ist von vielen Faktoren abhängig. Neben der Rasse spielt der vorgesehene Verwendungszweck des Tieres eine große Rolle. Bei den meisten Gebrauchshunden kann angenommen werden, dass eine Kastration um den Zeitraum des ersten Geburtstages erfolgt ist. Bei der Plausibilitätsprüfung der Daten wurde daher generell davon ausgegangen, dass Hunde bis zum vollendeten 6. Lebensmonat nicht kastriert waren. Bei Impfung im Alter zwischen 6 Monaten und einem Jahr konnte der Reproduktionsstatus zum Zeitpunkt der Impfung nicht verifiziert werden. Bei Impfungen ab einem Alter von einem Jahr wurde angenommen, dass die Angabe des Tierarztes dem Zustand zum Zeitpunkt der Impfung entsprach. Grundsätzlich ist jedoch davon auszugehen, dass in unserer Auswertung der Anteil der zum Zeitpunkt der Impfung kastrierten Tiere leicht überschätzt wird.

Einen signifikanten Einfluss der Kastration auf die Wahrscheinlichkeit für einen nicht ausreichenden Titer konnten wir anhand unserer Daten nicht nachweisen, was

im Einklang mit Befunden aus UK und Schweden steht [64][12].

Eine Untersuchung aus Frankreich hatte eine Überlegenheit monovalenter Tollwutimpfstoffe gegenüber polyvalenten Impfstoffen gezeigt [25]. Dieser Befund kann anhand unserer Ergebnisse nicht bestätigt werden. Es zeigte sich lediglich die Tendenz, dass nach der Impfung mit monovalenten Impfstoffen das Risiko für einen Titer unterhalb des Grenzwertes geringer ist. Ein eindeutiger Nachteil von polyvalenten Impfstoffen kann aus unseren Untersuchungen nicht abgeleitet werden.

Polyvalente Impfstoffe für Hunde enthalten neben Tollwutvirus in unterschiedlichen Kombinationen das canine Staupevirus (CDV), das canine Adenovirus 2 (CAV-2), das canine Parvovirus (CPV), das Parainfluenzavirus (CPiV) und verschiedene Leptospirenserovare. Monovalente Tollwutimpfstoffe können laut Fachinformationen zeitgleich aber ortsgetrennt mit anderen Hundeimpfstoffen des selben Herstellers verabreicht werden.

Unsere Daten belegen, dass die zeitgleiche Impfung gegen verschiedene Erreger und der Einsatz von polyvalenten Impfstoffen bei Hunden in Deutschland Standard ist, während die monovalente Tollwutimpfung ohne zeitgleiche Verabreichung weiterer Impfstoffe keine größere Rolle spielt. Der geringe durchschnittliche zeitliche Abstand einer monovalenten Tollwutimpfung zu der vorhergehenden Tollwutimpfung lässt vermuten, dass der singuläre Einsatz monovalenter Tollwutimpfstoffe auf zusätzliche oder „außerplanmäßige“ Impfungen, z.B. zur Boosterimpfung 3 bis 4 Wochen nach der Erstimpfung, vor Reisen in Endemiegebiete oder vor einer Blutentnahme zur Bestimmung des Antikörpertiters zu Reisezwecken, beschränkt ist. Die zusätzliche Impfung und der ggf. kürzere zeitliche Abstand zur Blutentnahme reduzieren das Risiko für einen nicht ausreichenden Titer. Daher ist das tendenziell geringere Risiko für nicht ausreichende Titer nach der Verabreichung von monovalenten Impfstoffen bei der Situation in Deutschland wahrscheinlich weniger auf die Abwesenheit anderer Impfvallenzen als auf die Begleitumstände der monovalenten Impfung zurückzuführen.

Während in einer Untersuchung aus UK [56] ein signifikanter Einfluss der Rasse festgestellt wurde, der in anderen Studien bestätigt werden konnte [12][83][106], zeigte dieser Faktor in unseren Daten keinen signifikanten Einfluss. In der zitierten Untersuchung aus UK wurden die Daten aller innerhalb eines Jahres untersuchten Tiere ausgewertet; die Berechnungen stützen sich auf mehr als 10000 Datensätze. In unserer Untersuchung erfolgte die Datenerhebung retrospektiv an einem geringen Prozentsatz aller untersuchten Tiere in einer Studien- und Kontrollgruppe mit Berechnung der Odds Ratio; ein eventuell vorhandener geringer Effekt könnte bei dieser Methodik mit den vorliegenden Fallzahlen nicht detektierbar sein. In der Untersuchung aus Schweden wurde gezeigt, dass der Einfluss der Rasse durch zweifaches Impfen abgeschwächt werden konnte. Dieses steht in Einklang mit unseren Ergebnissen, wonach die Anzahl der Impfungen einen größeren Einfluss auf den Impferfolg hat als die Rasse des Tieres.

Zusammenfassend konnten bei Hunden das Alter, die Anzahl vorheriger Impfungen, der zeitliche Abstand zwischen der Impfung und der Blutentnahme sowie der

#### 4. Diskussion

eingesetzte Impfstoff als Risikofaktoren identifiziert werden. Ein schwacher Einfluss wurde für den Reproduktionsstatus sowie für poly- im Vergleich zu monovalenten Impfstoffen nachgewiesen. Keine Einflüsse wurden für die Rasse und Begleitbehandlungen festgestellt.

Der auffällige Befund, wonach Hunde in Deutschland ein höheres Risiko für einen nicht ausreichenden Titer aufweisen als Hunde in UK, Frankreich, Italien, Schweden oder USA, konnte in unserer Untersuchung bestätigt werden. Während alle bisherigen Untersuchungen bei weniger als 10% der Tiere nicht ausreichende Titer feststellten, lag in unserer Untersuchung der Anteil von Tieren aus Deutschland bei über 15%. Die detaillierte Auswertung nach Alter der Tiere zeigte, dass bei Hunden bis zu 1 Jahr gut jeder 3. Hund kein ausreichendes Ergebnis aufwies.

Da sich unsere epidemiologische Datenerhebung auf Deutschland beschränkte, liegen für Einsendungen aus dem Ausland keine Vergleichsdaten im Hinblick auf das Reiseland, die verwendeten Impfstoffe, die Impfhistorie und die Blutentnahme vor. Bei einigen Ländern muss die Möglichkeit von Verzerrungen bedacht werden, wenn die Mehrzahl der Proben auf wenigen einzelnen Einsendern, z.B. Labors oder Tierärzten aus Urlaubsregionen, beruht. Über die Gründe für die beobachteten Unterschiede können daher keine endgültigen Aussagen getroffen werden.

Aus dem Vergleich mit den Untersuchungen in UK, Frankreich und Schweden lassen sich jedoch Hinweise für mögliche Gründe ableiten. Die Untersuchung aus UK stellte fest, dass bereits 8 Wochen, d.h. 56 Tage nach der Impfung das Risiko für nicht ausreichende Titer signifikant anstieg [64]. In unserer Untersuchung sollten fast 2/3 der Tiere nach Skandinavien verbracht werden und wiesen daher einen zeitlichen Abstand zwischen der Impfung und der Blutentnahme von mindestens 120 Tagen auf. In der Untersuchung aus Schweden [12] betrug wiederum der längste zeitliche Abstand 180 Tage. In unserer Untersuchung erfolgte dahingegen die Blutentnahme in der Kontrollgruppe bei 12% der einmalig bzw. 21% der mehrfach geimpften Tiere nach mehr als 240 Tagen. Das Risiko für einen nicht ausreichenden Titer war bei diesem zeitlichen Abstand unabhängig von der Impfhistorie etwa 3 Mal so hoch im Vergleich zu einem zeitlichen Abstand von maximal 120 Tagen.

Eine wichtige Rolle könnte ferner der Impfstoff spielen. In der schwedischen Studie wurde das Abschneiden von 2 monovalenten Impfstoffen miteinander verglichen, in der Veröffentlichung aus UK werden 3 Impfstoffe genannt [12][64]. Diese Zahlen deuten darauf hin, dass in beiden Ländern weniger Tollwutimpfstoffe als in Deutschland zugelassen sind bzw. eingesetzt werden. Von unterschiedlichen Marktanteilen der Impfstoffhersteller in verschiedenen Ländern kann also ausgegangen werden. Es ist anzunehmen, dass ein höherer Marktanteil von Impfstoffen, die tendenziell eine schlechtere humorale Immunität hervorrufen, mit einem höheren Anteil nicht ausreichender Titerergebnisse einhergeht. Anhand unserer Daten können eingeschränkte Rückschlüsse auf die Marktanteile der einzelnen Impfstoffe in Deutschland gezogen werden, während für andere Länder keine Vergleichsdaten vorliegen. Eine genauere Analyse dieser Frage kann daher nicht vorgenommen werden.

In unserer Auswertung wurden die Impfstoffe aufgrund der Vielfalt der Palette

nach Hersteller zusammengefasst und einzig die Unterscheidung nach monovalent und polyvalent separat ausgewertet. Aus den zitierten Veröffentlichungen ist nicht eindeutig abzuleiten, ob die Tiere zeitgleich zur Tollwutimpfung andere Impfungen erhalten hatten. Da die Impfung gegen Tollwut in Schweden und UK eine Reiseimpfung ist, kann jedoch davon ausgegangen werden, dass viele Tiere ausschließlich den Tollwutimpfstoff erhalten haben. Im Gegensatz dazu wird in Deutschland die singuläre Tollwutimpfung nur als Boosterimpfung im Rahmen der Grundimmunisierung empfohlen. Unsere Daten zeigen, dass ansonsten überwiegend polyvalente Impfstoffe eingesetzt oder zeitgleich ortstrennt andere Impfstoffe, mit den polyvalenten Impfstoffen analogen Antigenen, verabreicht werden. Das von Cliquet *et al.* [25] postulierte bessere Abschneiden monovalenter Impfstoffe konnte daher nicht bestätigt, ein geringgradig höheres Risiko für nicht ausreichende Titer bei Hunden durch den überwiegenden Einsatz polyvalenter Impfstoffe in Deutschland aber auch nicht ausgeschlossen werden.

Die serologischen Daten der vorliegenden Untersuchung sind geeignet, Aussagen zum Impfschema bei Hunden abzuleiten.

Für den Schutz gegen Tollwut muss es das Ziel sein, eine Serokonversion zu erreichen. Dazu sollte die Grundimmunisierung aus zwei Impfungen im Abstand von 3 bis 4 Wochen bestehen, wie von der StIKo Vet [96] empfohlen. Die Notwendigkeit eines Prime-Boost-Impfschemas wird auch von anderen Autoren betont [114]. Eine dritte Impfung sollte ein Jahr später verabreicht werden. Der Übergang zu längeren Impfintervallen, wie sie für einige Tollwutimpfstoffe gelten, sollte erst nach Abschluss dieser Grundimmunisierung erfolgen. Das Abfallen des Tollwutantikörpertiters innerhalb eines Jahres unter den Grenzwert von 0.5 IU/ml ist nach unseren Daten nach einer Erstimpfung eher die Regel denn eine Ausnahme und kommt auch nach Wiederholungsimpfungen vor. Vergleichbare Ergebnisse wurden von Wallace *et al.* [106] berichtet. Daher sollte bei länger zurückliegender Impfung vor der Bestimmung des Antikörpertiters zu Reisezwecken sowie vor Reisen in Endemiegebiete eine Nachimpfung vorzugsweise mit einem Impfstoff erfolgen, der eine gute humorale Immunität hervorruft. Unabhängig vom Alter und vom Impfstatus muss bei Hunden immer mit Tieren gerechnet werden, die den geforderten Mindesttiter nicht erreichen [29][27].

## 4.2. Ergebnisse bei Katzen

Bei Katzen bestätigt unsere Untersuchung die Ergebnisse aus anderen Ländern [25][64]. Katzen wiesen ein deutlich geringeres Risiko für nicht ausreichende Titer auf als Hunde und es wurden generell höhere Titer gemessen. In der Routinediagnostik wurden bei weniger als 5% der geimpften Katzen Antikörpertiter unterhalb des Grenzwertes gemessen. Die Risikofaktoren bei Hunden trafen auch bei Katzen zu. Nicht ausreichende Titer fanden sich vor allem bei jungen Katzen nach der ersten Impfung sowie bei Tieren mit langem zeitlichen Abstand zwischen der Impfung und der Blutentnahme. Dieses Ergebnis konnten wir in den Impfversuchen bestäti-

#### 4. Diskussion

gen: alle Tiere zeigten bis zu einem halben Jahr nach der Erstimpfung ausreichende Titer. Nach 10 Monaten wurde bei einzelnen Tieren in einigen Gruppen ein Titer unter 0.5 IU/ml gemessen. Auffällig war, dass bei einem Impfstoff alle Katzen auch 3 Jahre nach einfacher Impfung ausreichende Titer aufwiesen.

Die adjuvansfreien Impfstoffe führten wie die adjuvanshaltigen Impfstoffe bei den meisten Katzen zu langanhaltend hohen Titern. Nach der Boosterimpfung unterschieden sich die Titer von mit adjuvanshaltigen Impfstoffen geimpften Tieren nicht von denen der Tiere, die mit adjuvansfreien Impfstoffen geimpft worden waren. Vor dem Hintergrund der Pathogenese des feline injektionsassoziierten Fibrosarkoms (s. S. 85) stellt dieses Ergebnis den Einsatz von Adjuvanzen bei Tollwutimpfstoffen für Katzen in Frage.

Das Risiko für einen Titer  $<0.5$  IU/ml scheint bei Katzen nach mehrfacher Impfung gering zu sein. Nach unseren Daten wiesen alle Katzen, die mindestens 2 Mal geimpft worden waren, ausreichende Titer auf. Im zweiten Impfversuch konnte dieser Befund bestätigt werden. Keine der doppelt geimpften Katzen wies ein Jahr nach der Impfung einen Titer  $<0.5$  IU/ml auf, während dies bei 2 Tieren der einmalig geimpften Katzen der Fall war. Das im zweiten Versuch überprüfte, von der StIKo Vet [96] für Katzen vorgeschlagene Grundimmunisierungsschema mit 2 Tollwutimpfungen im Abstand von 4 Wochen wies insofern Vorteile im Hinblick auf das Risiko für nicht ausreichende Titer auf. Im ersten Impfversuch zeigten alle Katzen mehrere Jahre nach der Erstimpfung eine starke Boosterantwort, während diese im zweiten Impfversuch unerwartet niedrig ausfiel. In unseren Impfversuchen hatten zwar alle Katzen das Mindestimpfalter von 3 Monaten bereits deutlich überschritten, jedoch waren im zweiten Impfversuch alle Tiere bei der zweiten Impfung jünger als 1 Jahr alt. Eine mögliche Erklärung für die schwächere Boosterantwort im zweiten Versuch könnte somit das Alter der Tiere zum Zeitpunkt der zweiten Impfung und ein noch nicht voll ausgereiftes Immunsystem sein. Obwohl die Auswertung des Fragebogens ergeben hat, dass lediglich etwa die Hälfte aller Katzen innerhalb des ersten halben Lebensjahres die Erstimpfung gegen Tollwut erhält, sind weitere Studien hinsichtlich der Notwendigkeit einer Boosterimpfung bei jungen Katzen sinnvoll. Aufgrund unserer Ergebnisse kann die Empfehlung gegeben werden, bei jungen Katzen nach der Erstimpfung vor der Bestimmung des Antikörpertiters zu Reisezwecken oder vor Reisen in Endemiegebiete zunächst eine Boosterimpfung zu verabreichen und die Blutentnahme entsprechend den Einreisebestimmungen des Ziellandes durchzuführen.

Eine Differenzierung nach Impfstoffhersteller war aufgrund der geringen Fallzahl bei Katzen für den Fragebogen nicht möglich. Dennoch lassen die Ergebnisse unserer Impfversuche den Schluss zu, dass die humorale Immunantwort bei Katzen analog zu dem Befund bei Hunden bei den eingesetzten Impfstoffen unterschiedlich stark ausfällt. Die Impfstoffe der Hersteller, die bei Hunden eine gute humorale Immunantwort induzierten, erzielten auch bei Katzen durchgängig die besten Ergebnisse.

### 4.3. Ergebnisse bei Frettchen

In unserer Studie zeigte sich, dass Frettchen auf die Impfung gegen Tollwut ebenfalls mit hohen Titern neutralisierender Antikörper reagieren. Dabei konnten abhängig vom eingesetzten Tollwutimpfstoff signifikante Unterschiede hinsichtlich der Höhe der durchschnittlich gemessenen Titer beobachtet werden. Bemerkenswerterweise konnte jedoch wie bei den Katzen keine generelle Überlegenheit adjuvanshaltiger gegenüber adjuvansfreien Impfstoffen beobachtet werden. Die Adjuvanzien Aluminiumhydroxid oder Aluminiumphosphat werden inaktivierten Tollwutimpfstoffen für Tiere zugesetzt, um die Immunantwort zu steigern; sie sind jedoch als ursächlicher Faktor in der Pathogenese des injektionsassoziierten Fibrosarkoms bei der Katze diskutiert worden [46][5]. Bei Frettchen ist ebenfalls ein ursächlicher Einfluss von Impfungen auf die Entstehung von Fibrosarkomen postuliert worden [71][72]. Der Nutzen des Einsatzes aluminiumhaltiger Adjuvanzien sollte daher kritisch bewertet werden. Wir konnten in unseren Versuchen zeigen, dass adjuvansfreie Tollwutimpfstoffe bei Katzen und Frettchen zu hohen und langanhaltenden Titern führen. Im Hinblick darauf, dass bei adjuvansfreien Impfstoffen weniger unerwünschte Arzneimittelwirkungen zu erwarten sind, sollte der Entwicklung von adjuvansfreien Impfstoffen der Vorzug gegeben werden.

Aus dem Vergleich zwischen den Gruppen mit zeitgleicher bzw. zeitversetzter Impfung gegen Staupe und Tollwut ergaben sich keine Hinweise auf einen Einfluss des Impfschemas auf die Höhe der im Verlauf von 2 Jahren gemessenen Antikörpertiter gegen Tollwut- und Staupevirus. Daraus kann geschlossen werden, dass die zeitgleiche, ortsgetrennte Anwendung von Staupe- und Tollwutimpfstoffen beim Frettchen im Hinblick auf die humorale Immunantwort gegen Tollwut- und Staupevirus unproblematisch ist. Aus rechtlichen Gründen sind jedoch die Angaben der Impfstoffhersteller in der Fach- und Gebrauchsinformation zu beachten.

Die Antikörpertiter gegen Staupe zeigten zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Die Titer stiegen bei allen Frettchen nach der Erstimpfung deutlich an und verblieben über 8 Monate auf hohem Niveau. Nach den Wiederholungsimpfungen wurde nur ein geringer Anstieg der Titerhöhe beobachtet. Zur Impfung gegen Staupe werden ausschließlich attenuierte Lebendimpfstoffe eingesetzt. Da es bei Lebendimpfstoffen zu einer Replikation der Impfviren kommt, wird sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort stimuliert. Es wird daher allgemein davon ausgegangen, dass Lebendimpfstoffe eine stärkere und länger andauernde Immunität hervorrufen als inaktivierte Impfstoffe. Unsere Ergebnisse stellen die Notwendigkeit der jährlichen Wiederholungsimpfung gegen Staupe bei Frettchen in Frage. Weitere Studien zur Dauer der Immunität gegen Staupe nach der Impfung und dem Zusammenhang zwischen Antikörperspiegel und Schutzwirkung sollten erfolgen.

Anhand der Auswertung der Access-Datenbank wurde deutlich, dass die Durchführung der Tollwutantikörperbestimmung zu Reisezwecken bei Frettchen eine Ausnahme darstellt. Die Antikörperbestimmung ist erforderlich zum Import von Frettchen aus nicht gelisteten Drittländern in die EU. Zum Verbringen innerhalb der EU

und bei Import aus gelisteten Drittländern ist der Nachweis der Impfung ausreichend. Angesichts der geringen Fallzahlen und der untergeordneten Bedeutung des Frettchens für die Epidemiologie der Tollwut sind diese Maßnahmen als ausreichend zu betrachten.

### 4.4. Sonstige Ergebnisse

Unsere Studie hat gezeigt, dass bei einem hohen Prozentsatz der in die Auswertung einbezogenen Tiere die Angaben des Tierarztes im Fragebogen von den zuvor bei Einsendung der Blutprobe gemachten Angaben abwichen. Dieses kann als Hinweis auf Dokumentationsmängel in den behandelnden Tierarztpraxen gewertet werden. Aus Sicht der Pharmakovigilanz ist bedenklich, dass die überwiegende Zahl der Dokumentationsmängel die eingesetzten Impfstoffe und Chargen betraf. Mittels Pharmakovigilanz sollen Mängel bei der Qualität von Impfstoffen, z.B. im Hinblick auf Wirksamkeit und Verträglichkeit, erkannt werden. Die korrekte Zuordnung der Charge zum aufgetretenen Verdachtsfall ist dazu in der Regel erforderlich. Seit die Impfstoffe mit abziehbaren Etiketten versehen sind, die in den Impfpass eingeklebt werden, ist von korrekten Angaben im Impfpass auszugehen. Die Dokumentation in den Unterlagen der Tierarztpraxen scheinen hingegen verbesserungswürdig zu sein. Anhand dieser Unterlagen sollte ebenfalls nachvollziehbar sein, welchen Impfstoff und welche Charge ein Tier verabreicht bekommen hat. Dieses scheint aktuell nicht im geforderten Umfang der Fall zu sein. Die mittlerweile von den Tierärztekammern forcierte Implementierung von Qualitätsmanagementsystemen ist vor diesem Hintergrund positiv zu bewerten.

Neben Dokumentationsmängeln konnten wir mit unseren Daten nachweisen, dass bei einem hohen Prozentsatz der Tiere (17,5%, s. Kapitel 3.1.3) die gesetzlichen Vorgaben der Reisebestimmungen bewusst oder unbewusst nicht eingehalten worden waren. Dieser Befund ist aufgrund der Komplexität der rechtlichen Bestimmungen und den länderspezifisch sehr unterschiedlichen Anforderungen nicht überraschend. Durch den Wegfall des *PETS* und der zusätzlichen Anforderungen für Schweden und Norwegen zum 01.01.2012 (s. Kap. 1.2.1) ist die Anwendung der innergemeinschaftlichen Reisebestimmungen vereinfacht geworden. Es kann angenommen werden, dass keine Gefährdung für die öffentliche Gesundheit durch Tiere bestand, bei denen die Reisebestimmungen nicht eingehalten worden waren. Die Tollwutinzidenz in Deutschland betrug seit Inkrafttreten der VO 998/2003 weniger als 1 Tollwutfall pro 1 Million Haustiere pro Jahr und konnte somit als vernachlässigbar angesehen werden [3]. Im Hinblick auf Tiere, die sich in Gebieten mit nicht vernachlässigbarer Tollwutinzidenz aufgehalten hatten oder die in solche Gebiete verbracht werden sollten, kann eine solche Gefährdung bei Nichteinhaltung der gesetzlich festgelegten Fristen jedoch nicht ausgeschlossen werden (s. S. 90).

Bei unseren Untersuchungen haben wir keinen Hinweis auf das Vorkommen von „non-respondern“ bei Katzen und Hunden erhalten. Alle Tiere zeigten nach wiederholter Impfung und bei zeitnaher Blutuntersuchung ausreichend hohe Titer. In

einem Fall wurde bei einem Hund, der trotz mehrfacher Impfungen wiederholt niedrige Titer aufwies, ein malignes Lymphom diagnostiziert, welches zur Euthanasie des betroffenen Tieres führte. Das Vorkommen von „non-respondern“ kann jedoch anhand unserer Daten auch nicht ausgeschlossen werden.

Unsere Impfversuche zeigen, dass bei allen untersuchten Tierarten nach ein- oder mehrfacher Impfung gegen Tollwut ein stabiles Antikörperplateau erreicht werden kann. Gleiches gilt für Staupelebendimpfstoffe bei Frettchen. Nach Erreichen des stabilen Antikörperplateaus ruft eine erneute Impfung keinen nennenswerten Anstieg des Antikörperspiegels hervor und der Titer fällt nur langsam wieder ab. Aufgrund der guten Korrelation zwischen hohen Antikörpertitern und Schutz gegen Erkrankung kann eine Einschätzung hinsichtlich der Notwendigkeit einer Wiederholungsimpfung anhand des gemessenen Antikörperspiegels getroffen werden. Bei nachgewiesenermaßen hohem Antikörpertiter könnte für einen angemessenen Zeitraum von Wiederholungsimpfungen abgesehen werden. Neuere Untersuchungen anderer Autoren sprechen ebenfalls für ein solches Vorgehen [114]. Voraussetzung dafür ist, dass eine eingehende Aufklärung der Tierbesitzer erfolgt. Es ist insbesondere darauf hinzuweisen, dass im Falle nicht zeitgerecht erfolgter Wiederholungsimpfungen grenzüberschreitende Reisen rechtlich nicht erlaubt sind. Zudem ist einschränkend darauf hinzuweisen, dass aus unseren Versuchen keine grundsätzlichen Aussagen zur Dauer der protektiven Immunität abgeleitet werden können.

## 4.5. Einfluss des Testvirus (FAVN-Test)

In diesem letzten Schritt wurde der Frage nachgegangen, ob es in Abhängigkeit von dem Impfstoff, mit dem ein Tier geimpft wurde, durch das vorgeschriebene Testprotokoll zu einer unterschiedlichen Bewertung der Antikörpertiter kommt. Eine Untersuchung von Moore *et al.* [70] hatte einen solchen Zusammenhang bei adjuvansfreien Tollwutimpfstoffen für Menschen gezeigt.

Sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin wird der Impfstamm Flury-LEP eingesetzt, welcher auf ein Isolat aus einem 1939 an Tollwut erkrankten Mädchen in Georgia, USA zurückgeht. Die übrigen Impfstämme (VP 12, Virus fixe, Pasteur RIV, P.M.) gehen wahrscheinlich auf den ursprünglich 1882 in Paris von Louis Pasteur aus einer tollwütigen Kuh isolierten und an Kaninchen adaptierten Stamm zurück. Diesen attenuierten Laborstamm bezeichnete Pasteur als „Virus fixe“, da die ursprünglich variable Inkubationszeit nach mehreren Kaninchenpassagen konstant bei 7 Tagen lag [47]. Da die Sequenzen der Impfstämme nicht veröffentlicht sind, beruht die Annahme der Herkunft auf den Namensbestandteilen der Impfstämme. Der im FAVN-Test eingesetzte Stamm CVS geht ebenfalls auf das Pasteurvirus zurück. Insofern ist denkbar, dass anhand des FAVN-Tests gegen diese Impfviren gerichtete Antikörper besser erkannt und somit höhere Titer gemessen werden als bei Flury-LEP-Impfstoffen. Somit sollte insbesondere im Hinblick auf den Impfstamm Flury-LEP untersucht werden, ob eine Benachteiligung entsprechend geimpfter Tiere aufgrund des Testsystems besteht. Um dieses zu untersuchen, wurden im FAVN-Test

#### 4. Diskussion

die zur Impfstoffherstellung verwendeten Virusstämme anstelle von CVS eingesetzt und die gemessenen Titer in Abhängigkeit vom Virusstamm verglichen.

Seren von Tieren, die ausschließlich mit Impfstoffen eines Herstellers geimpft worden waren, wurden gegen den gemäß OIE vorgeschriebenen Virusstamm sowie gegen den homologen und zwei heterologe Virusstämme anderer Hersteller getestet. Es wurde angenommen, dass Serumantikörper die höchste Wirksamkeit gegen das zur Immunisierung eingesetzte, homologe Virus zeigen, während bei heterologen Virusstämmen niedrigere Titer zu erwarten wären. Anhand der von Moore *et al.* [70] angegebenen Werte wurde die benötigte Probenanzahl je Impfstoffgruppe berechnet.

Die dreifaktorielle Varianzanalyse zeigt, dass keine signifikanten Wechselwirkungen zwischen den drei untersuchten Faktoren Testdurchgang, Testvirus und Impfstoffgruppe bestehen. Zwischen den Faktoren Testdurchgang und Testvirus sowie Impfstoffgruppe und Testvirus konnten hingegen signifikante Wechselwirkungen nachgewiesen werden.

Die Wechselwirkung zwischen Testdurchgang und Testvirus legt nahe, dass voneinander abweichende Virusmengen in den einzelnen Testdurchgängen eingesetzt wurden. Die gemessene, maximal eingesetzte Virusdosis lag um den Faktor 2 über dem zulässigen Wert. Für ein biologisches Testsystem stellt dieses eine geringgradige Erhöhung des Virustiters dar, die als akzeptabel eingestuft werden kann. Da entsprechend der Versuchsanordnung jedes Serum im gleichen Testdurchgang gegen alle vier Testviren titriert wurde, wirkten sich Unterschiede in der Virusdosis auf alle Testseren gleich aus. Die Versuchsreihe kann daher als valide angesehen werden.

Die beobachtete Wechselwirkung zwischen Impfstoff und Testvirus bestätigt die Ursprungshypothese und wurde daher in einer zweifaktoriellen Varianzanalyse innerhalb der Impfstoffgruppen weiter untersucht. Ein signifikanter Einfluss des Testvirus auf das Testergebnis bestätigte sich für die Impfstoffgruppen C (Stamm Pasteur RIV) und E (Stamm Virus fixe G52), nicht jedoch für die Impfstoffgruppe D (Stamm Flury-LEP). Die Hypothese für eine Benachteiligung aufgrund des Testsystems von Tieren, die mit Flury-LEP-Impfstoffen geimpft worden waren, lässt sich anhand unserer Daten also nicht bestätigen.

Die Berechnung der Unterschiede zeigt, dass lediglich für die Impfstoffgruppe C ein höherer Titer bei Verwendung des homologen Virusstammes erwartet werden kann, während sich für Impfstoffgruppe E ein niedrigerer Titer ergibt. Die testvirusabhängige Standardabweichung lag im Mittel unterhalb von einer Titerstufe. Ein Vorteil bei der Titration mit homologem Virus hätte sich also für solche Tiere ergeben können, die mit Impfstoff C geimpft worden waren und deren Titer höchstens eine Titerstufe unterhalb des Grenzwertes lag. Dieses traf auf weniger als 3% der Hunde und auf keine Katze zu. Ohne negative Effekte bei den anderen Impfstoffgruppen einzuberechnen hätte sich also ein relevanter Einfluss auf das Ergebnis bei einem äußerst geringen Anteil der Tiere ergeben können. Andere mögliche Faktoren wie z.B. die Variabilität von Test zu Test - bei Serumneutralisationstests gilt eine Standardabweichung von etwa einer Verdünnungsstufe als akzeptabel - oder von La-

bor zu Labor sind als deutlich stärker zu bewerten. Der Einfluss des Testvirus kann vor diesem Hintergrund als vernachlässigbar angesehen werden.

Aufgrund von möglichen antigenetischen Differenzen ist das Testvirus bei Serumneutralisationstests als wichtigster Einflussfaktor auf das Ergebnis anzusehen. Als weiterer Faktor muss die Zellkultur berücksichtigt werden. Alle betroffenen Impfstoffe werden in Kulturen von Hamsternierenzellen (BHK-Zellen) hergestellt und die jeweiligen Virusstämme konnten auf den BHK-Testzellen unseres Labors vermehrt werden. Sie ließen sich problemlos vor dem Versuch in diesen Zellen passagieren, so dass der Faktor Zellkultur ebenfalls als vernachlässigbar eingeschätzt wird.

Die Versuchsreihe und die Ergebnisse können im Hinblick auf die angewandte Methodik als korrekt und valide bewertet werden. Die Schlussfolgerung lautet, dass das Testsystem keinen relevanten Einfluss auf die gemessene Titerhöhe ausübt und die Titration weiterhin mit dem Virusstamm CVS durchgeführt werden kann.

## 4.6. Schlussfolgerungen

Die Tollwut ist eine bedeutende Zoonose, die weltweit bei Menschen geschätzte 59000 Todesopfer im Jahr fordert und von Haus- und Wildtieren, insbesondere Haushunden, auf den Menschen übertragen wird. Durch Impfungen ist eine effektive Prophylaxe bei Menschen und Tieren möglich. In Westeuropa wurde durch die flächendeckende orale Immunisierung des regionalen Hauptwirtes der silvatischen Tollwut, dem Rotfuchs, eine Tilgung der Seuche erreicht. Durch restriktive Maßnahmen hinsichtlich des grenzüberschreitenden Verkehrs und des Imports von Heimtieren soll eine Einschleppung der Tollwut in die tollwutfreien Gebiete verhindert werden. Die veterinärhygienischen Vorschriften erfordern, neben der eindeutigen Kennzeichnung von Hunden, Katzen und Frettchen und dem Nachweis einer gültigen Impfung gegen Tollwut, unter bestimmten Voraussetzungen auch den Nachweis, dass das betreffende Tier einen Antikörpertiter von mindestens 0.5 IU/ml gegen das Tollwutvirus aufweist.

Durch die Impfung gegen Tollwut wird die Bildung neutralisierender Antikörper induziert. Eine belastbare Immunität ist nach einigen Tagen bis wenigen Wochen ausgebildet. Erfolgt eine Infektion, bevor ein ausreichender Immunschutz aufgebaut worden ist, kann das Tier zu einem späteren Zeitpunkt an Tollwut erkranken, da das Virus in den Nervenbahnen nicht mehr von Antikörpern erreicht werden kann. Besteht die Möglichkeit, dass sich ein Tier vor Ausbildung der Immunität infiziert hat, und dieses ist in allen Gebieten mit nicht vernachlässigbarem Tollwutrisiko der Fall, muss eine angemessene Wartezeit eingehalten werden. Die Länge der Wartezeit richtet sich nach der zu erwartenden Inkubationszeit. Die EFSA (European Food Safety Authority) gibt für Hunde und Katzen 38 Tage (Standardabweichung 45 Tage) aus experimentellen Studien und 2 bis 234 Tage anhand von Daten aus Quarantänestationen an. Die Dauer der Inkubationszeit folgt einer log-normal Verteilung, so dass die Länge der Wartezeit auf der Grundlage des gewünschten Sicherheitsniveaus festgelegt werden kann. Während für *PETS* 6 Monate Wartezeit nach der

#### 4. Diskussion

Blutentnahme und für Schweden und Norwegen ein Mindestabstand von 120 Tagen zur letzten Tollwutimpfung galten, sind für den Import aus nicht-gelisteten Ländern in die EU 3 Monate Wartezeit nach der Blutentnahme erforderlich.

Im Reiseverkehr muss das Ziel des Impfmanagements gegen Tollwut insofern sein, bei allen Tieren die Serokonversion und dauerhaft hohe Antikörpertiter von mindestens 0.5 IU/ml sicherzustellen. Im Umkehrschluss schließt ein Titer unterhalb des Grenzwertes jedoch nicht aus, dass eine immunologische Reaktion auf eine Impfung erfolgt ist und es kann durchaus ein Schutz gegen Erkrankung bestehen.

Unsere Ergebnisse haben gezeigt, dass bei Hunden, Katzen und Frettchen eine einfache Impfung gegen Tollwut zur Serokonversion führt, jedoch nicht unbedingt ausreicht, um Antikörperspiegel  $\geq 0.5$  IU/ml über die Dauer von mindestens einem Jahr zu gewährleisten. Selbst hohe Titer einige Wochen nach der Impfung können innerhalb weniger Monate wieder unter den Grenzwert von 0.5 IU/ml absinken; dieses wurde in den Impfversuchen experimentell belegt. Die Auswertung des Fragebogens zeigte eindrucksvoll, dass nicht ausreichende Titer vor allem bei jungen Tieren nach der Erstimpfung gemessen werden. Daraus lässt sich folgern, dass es zur Sicherstellung eines hohen Titers über einen längeren Zeitraum erforderlich ist, bei jungen Hunden mindestens 2 Impfungen gegen Tollwut zu verabreichen. Da in unserem Impfversuch der Titer 4 Monate nach der Zweitimpfung bei 2 von 28 Hunden (7,1%) erneut unter den Grenzwert abgefallen war, scheint es im Hinblick auf die Sicherstellung eines hohen Antikörperspiegels gegen Tollwut geboten, dass die Grundimmunisierung bei Hunden entsprechend den Empfehlungen der StIKo Vet [96] aus 3 Impfungen besteht. Vor Reisen in Tollwutendemiegebiete und vor der Bestimmung des Antikörpertiters gegen Tollwut zu Reisezwecken sollte bei Hunden grundsätzlich eine Boosterimpfung in Betracht gezogen werden. Gleiches gilt für einmalig geimpfte Katzen.

Im Hinblick auf das Risiko der Einschleppung bzw. Weiterverbreitung der Tollwut und der Diskussion über die Reisebestimmungen müssen weitere Aspekte Berücksichtigung finden. Die EFSA führte dazu eine Risikobewertung durch und begründet ihre Empfehlungen vorwiegend mit der Tollwutinzidenz in einem Gebiet.

Die EU15-Staaten werden als Gebiet mit vernachlässigbarer Tollwutinzidenz von  $<1$  Tollwutfall pro 1 Million Haustiere pro Jahr eingestuft. Die Maßnahmen zum Schutz vor Verbreitung der Tollwut durch Impfung und epidemiologische Überwachung der Wildtiere werden als ausreichend angesehen.

In einigen EU-Staaten, insbesondere in den östlichen Ländern aber auch im Baltikum und auf dem Balkan, besteht jedoch eine höhere und somit nicht vernachlässigbare Tollwutinzidenz. In diesen Ländern ist grundsätzlich von einer Infektionsgefahr auszugehen. Ferner ist mit dem Vorkommen sowohl der urbanen als auch der silvatischen Tollwut zu rechnen. Restriktive Maßnahmen einschließlich einer ausreichenden Wartezeit für das Verbringen von Hunden, Katzen und Frettchen aus Gebieten mit nicht vernachlässigbarem Risiko in Gebiete mit vernachlässigbarem Risiko werden von der EFSA empfohlen. Nach geltender EU-Rechtslage dürfen Tiere, die einmalig im Mindestalter gegen Tollwut geimpft wurden, 3 Wochen nach der Impfung

aus den genannten EU-Ländern mit nicht vernachlässigbarer Tollwutinzidenz in das Gebiet der EU15-Staaten verbracht werden. Aus Sicht der EFSA-Risikobewertung ist dieses nicht ausreichend, um das Verbringen infizierter Tiere mit ausreichender Sicherheit zu verhindern. Diese Risikobewertung rechtfertigt die Aufrechterhaltung der Impfempfehlung für Hunde und Katzen in Deutschland.

Die EFSA macht in ihrem Bericht keine Unterscheidung zwischen Staaten mit silvatischer und/oder urbaner Tollwut. In Staaten, in denen lediglich silvatische Tollwut vorkommt, ist das Risiko für den Menschen dennoch als erheblich geringer einzuschätzen als in Staaten mit urbaner Tollwut. Eine Differenzierung aufgrund epidemiologischer Daten sollte in Betracht gezogen werden. Die Virusstämme der urbanen Tollwut sind an den Haushund adaptiert. Da virulentes Virus bis zu 14 Tage vor Auftreten klinischer Symptome ausgeschieden werden kann [36] und das klinische Bild der „stillen Wut“ das Erkennen der Erkrankung erschwert, kann eine Übertragung des Tollwutvirus unbemerkt erfolgen. Besonders gefährdet sind Welpen und Jungtiere von Hündinnen ohne Impfschutz. Eine Infektion der Welpen erfolgt z.B. über das Belecken der Welpen. Der Hund als Hauptwirt der urbanen Tollwut scheidet große Mengen Virus aus; dies stellt eine große Infektionsgefahr für den Menschen dar. Mutterlose Jungtiere werden mitunter von Touristen mitgenommen und unter Nichtbeachtung der rechtlichen Bestimmungen in die EU importiert. Solche illegalen Importe stellten in den vergangenen Jahren die Hauptursache für gemeldete Tollwutfälle bei Haustieren in tollwutfreien Mitgliedstaaten bzw. Mitgliedstaaten mit geringer Tollwutinzidenz dar (Deutschland 2001, Frankreich 2001 bis 2005, Belgien 2007). In der Mehrzahl der Fälle waren Jungtiere betroffen [108][37][77][88]. In vielen beliebten Urlaubsländern wie z.B. Türkei, Marokko, Tunesien und Ländern des fernen Ostens wie Thailand und Indien, ist mit dem endemischen Vorkommen der urbanen Tollwut zu rechnen.

Aus Ländern, welche in Anhang II Teil C der Verordnung VO 998/2003/EG aufgeführt sind, den sogenannten gelisteten Drittländern, dürfen Tiere unter den gleichen Regeln, wie sie für das innergemeinschaftliche Verbringen gelten, in die EU importiert werden. Auf der Basis der EFSA-Bewertung ist von einem nicht vernachlässigbaren Risiko bei einigen der gelisteten Drittländer auszugehen. Somit ist das Risiko der Einschleppung aus diesen Ländern, insbesondere solchen mit einem Vorkommen von urbaner Tollwut, gegeben. Das Einhalten und die Dauer einer Wartezeit vor Import von Tieren aus Ländern mit nicht vernachlässigbarem Risiko sind laut EFSA die wichtigsten Faktoren, um den Import tollwütiger Tiere zu verhindern. Bei einigen gelisteten Drittländern sind die Maßnahmen zur Prävention im Hinblick auf die epidemiologische Situation und die Empfehlungen der EFSA somit als nicht ausreichend anzusehen. Das Vorkommen urbaner Tollwut sollte als ein Ausschlusskriterium für die Aufnahme als gelistetes Drittland angesehen werden.

Im Hinblick auf das Infektionsrisiko in Gebieten mit nicht vernachlässigbarem Tollwutrisiko ist es wichtig, die Ziele des Impfmanagements, wie eingangs formuliert (s. S. 90), zu erreichen. Bei niedrigem Titer ist das Risiko für Erkrankungen nach einer Belastungsinfektion erhöht [9]. Daher sollte während der Wartezeit im

#### 4. Diskussion

Herkunftsland der Mindesttiter nicht unterschritten werden, was nach unseren Ergebnissen die zweifache Impfung junger Hunde erfordert. Aus diesem Grund sollten Hunde spätestens zum Zeitpunkt der Blutentnahme mindestens 2 Mal im Abstand von mindestens 2 bis 4 Wochen gegen Tollwut geimpft worden sein. Das Instrument der Tollwutantikörperbestimmung trägt aufgrund der geringeren Fälschungsmöglichkeiten und eindeutigen Rückverfolgbarkeit in Zweifelsfällen zu einem höheren Sicherheitsniveau bei. So kann das Einhalten der Wartezeit im Anschluss an die Entnahme der Blutprobe einfach überprüft werden, da das untersuchende Labor das Eingangsdatum der Blutprobe bescheinigt. Ebenso ist die Zuordnung des Zertifikats zu einem Tier über die Mikrochipnummer eindeutig gegeben. Durch diese Kontrollinstanzen wird der illegale Import von Tieren erschwert und die Grenzkontrolle vereinfacht. Eine funktionierende Grenzkontrolle beim Verbringen bzw. Import von Hunden und Katzen aus Tollwutendemiegebieten und die Einhaltung der Reisebestimmungen haben einen großen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit, ob infizierte Tiere in tollwutfreie Gebiete gelangen.

Mit den international standardisierten Methoden zur Bestimmung des Titers neutralisierender Antikörper gegen Tollwut stehen zuverlässige Instrumente zur Verfügung, um die Entscheidung über die Notwendigkeit von Wiederholungsimpfungen gegen Tollwut von dem gemessenen Antikörperspiegel abhängig zu machen. Statt der geforderten Revakzinierung in von den Impfstoffherstellern festgelegten Intervallen sollte analog zu den Empfehlungen beim Menschen alternativ eine Antikörperbestimmung erlaubt sein. Tiere mit nachgewiesenermaßen hohem Antikörperspiegel sollten für einen angemessenen Zeitraum von der Verpflichtung zur Nachimpfung ausgenommen werden. Im Hinblick auf das Auftreten unerwünschter Arzneimittelwirkungen und der Fibrosarkomproblematik bei Katzen und Frettchen ist die Menge verabreichter Medikamente und die Häufigkeit der Applikation auf das unbedingt nötige Maß zu reduzieren. Im Rahmen des Impfgesprächs kann die Notwendigkeit einer Impfung anhand von anerkannten Laboruntersuchungen festgestellt werden.

Es wird vorgeschlagen, folgende Punkte bei den Reisebestimmungen zu berücksichtigen:

1. In Abhängigkeit von der Tollwutinzidenz sollten Gebiete mit vernachlässigbarem Risiko von Gebieten mit nicht vernachlässigbarem Risiko gemäß EFSA-Definition unterschieden werden.
2. Eine offizielle Differenzierung zwischen Gebieten mit urbaner bzw. silvatischer Tollwut ist wünschenswert. Aufgrund des höheren Risikopotenzials für den Menschen sollte das Vorkommen urbaner Tollwut ein Ausschlusskriterium für die Aufnahme als gelistetes Drittland gemäß Anhang II Teil C der VO 998/2003/EG darstellen.
3. Ein Verbringen von Hunden und Katzen aus einem Gebiet mit höherem Risiko in ein Gebiet mit niedrigerem Risiko sollte nur möglich sein bei nachgewiesenem Tollwutantikörpertiter  $\geq 0.5$  IU/ml und einer Wartezeit von mindestens 3 Monaten nach der Blutentnahme.

4. Hunde sollten vor der Blutentnahme mindestens zwei Mal im Abstand von 2 bis 4 Wochen gegen Tollwut geimpft worden sein.
5. Innerhalb von Gebieten mit vergleichbarem Risiko sollte ein Verbringen von Hunden und Katzen mit gültiger Impfung ohne Einschränkungen möglich sein.
6. Die bisherigen Bedingungen für Frettchen sind als angemessen zu betrachten.



## 5. Zusammenfassung

Die Bestimmung des Antikörpertiters nach der Tollwutimpfung ist für den Import von Hunden, Katzen und Frettchen aus bestimmten Ländern in die EU erforderlich. Trotz ordnungsgemäßer Impfung erreicht ein beträchtlicher Anteil der Tiere den Grenzwert von 0,5 IU/ml nicht, welcher international dafür anerkannt ist, Schutz vor Erkrankung anzuzeigen.

In einer retrospektiven epidemiologischen Studie wurden die Daten von 1850 Hunden und 91 Katzen ausgewertet, um Risikofaktoren für Titer unterhalb des Grenzwertes zu identifizieren. Die Daten wurden anhand eines Fragebogens erhoben, mit dem detaillierte Angaben zur Impfgeschichte und begleitender Medikation erfragt wurden. Zusätzlich wurden die Daten aller während des Studienzeitraums in der Routinediagnostik gegen Tollwutantikörper untersuchten Hunde, Katzen und Frettchen ausgewertet.

Ein geringes Alter, Einfachimpfung und eine lange Zeitspanne zwischen der Impfung und der Blutentnahme erhöhten das Risiko für nicht ausreichende Titer bei Hunden. Als weiterer Faktor, der einen signifikanten Einfluss auf das Testergebnis ausübt, wurde der zur Immunisierung eingesetzte Impfstoff identifiziert. Unterschiede zwischen Impfstoffen blieben auch nach Wiederholungsimpfungen nachweisbar. Die gleichen Risikofaktoren wurden auch in mehrfach geimpften und in älteren Hunden identifiziert. Kein relevanter Einfluss wurde für die zeitgleiche Verabreichung anderer Medikamente, die Rasse und Kastration nachweisbar. Hunde in Deutschland hatten ein signifikant höheres Risiko für Titer unterhalb des Grenzwertes als Hunde aus anderen Ländern.

Katzen hatten im Vergleich zu Hunden ein signifikant niedrigeres Risiko für nicht ausreichende Titer. Im Allgemeinen waren die Titer von Katzen höher als die von Hunden. Ein geringes Alter, Einfachimpfung und eine lange Zeitspanne zwischen der Impfung und der Blutentnahme wurden als Risikofaktoren für Titer unterhalb des Grenzwertes ermittelt. Unterschiede zwischen Impfstoffen konnten für Katzen nicht identifiziert werden, vermutlich aufgrund der geringen Fallzahlen.

Die rechtlichen Anforderungen des Ziellandes waren bei 17,5% der Tiere nicht erfüllt. Bei 26,9% der Fragebögen wurden Abweichungen zu den vorher bei Einsendung der Blutproben gemachten Angaben festgestellt.

In prospektiven Impfstudien wurde der Verlauf des Antikörpertiters nach der Erstimpfung und nach Wiederholungsimpfungen gegen Tollwut mit Standardimpfstoffen bei Hunden, Katzen und Frettchen untersucht. Die Risikofaktoren für nicht ausreichende Titer, die anhand der epidemiologischen Untersuchungen für Hunde und Katzen identifiziert worden waren, konnten in diesen Impfversuchen bestätigt wer-

## 5. Zusammenfassung

den. Bei Frettchen konnte kein negativer Einfluss einer zeitgleichen Impfung gegen Staupe und Tollwut auf die Antikörperantworten festgestellt werden.

Zuletzt wurde der Einfluss des Testsystems auf die Titerhöhe untersucht. Jedes Serum wurde im FAVN-Test gegen das zum jeweiligen Impfstamm homologe Virus getestet. Die Ergebnisse wurden mit den im Standardprotokoll, d.h. mit dem heterologen CVS-Stamm erzielten Werten verglichen. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen dem heterologen und dem homologen Testsystem beobachtet. Somit ergibt sich kein Hinweis auf eine systematische Benachteiligung einzelner Impfstämme. Unsere Ergebnisse zeigen, dass der Einsatz homologer Virusstämme den Anteil nicht ausreichender Testergebnisse nicht signifikant verringern würde. Die Testparameter für sich allein erklären nicht das erhöhte Risiko für Ergebnisse unterhalb des Grenzwertes, welches für einige Impfstoffgruppen beobachtet wurde. Interessanterweise wurden keine durchgängig besseren Ergebnisse im homologen Testsystem erzielt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der CVS-Stamm für den Einsatz im FAVN-Test geeignet ist.

Hauptziel der Untersuchung war eine Verbesserung der aktuellen Impfeempfehlungen im Hinblick auf die internationalen Reisebestimmungen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Grundimmunisierung gegen Tollwut bei Hunden aus zwei Impfungen bestehen sollte. Vor der Antikörperbestimmung und vor dem Verbringen von Hunden und Katzen zwischen Gebieten mit unterschiedlichem Tollwutrisiko sollten die Tiere mindestens zwei Mal gegen Tollwut geimpft worden sein.

## 6. Abstract

Titration of post-vaccinal rabies antibody titres is required by European legislation for entry of dogs, cats and ferrets from certain countries into the EC. Despite orderly vaccination a considerable percentage of animals fail to reach 0.5 IU/ml. This threshold is recognized internationally to indicate protection from infection.

In a retrospective epidemiological study, data from 1850 dogs and 91 cats were analysed to identify risk factors for titres below threshold. Data were collected by means of a questionnaire requesting detailed information on the vaccination history and concurrent medications. Additionally data from routine anti-rabies antibody titration of all dogs, cats and ferrets tested during the study period were analysed. Young age, single vaccination and a long time-lag between vaccination and blood sampling significantly increased the odds for insufficient titre results in dogs. As additional factor the vaccine used for immunization was identified to significantly influence the outcome of the serological test. Differences between vaccines remained detectable even after revaccinations. The same risk factors were identified in multiply vaccinated and in elderly dogs. No relevant influence was detectable for concurrent medications, breed and neutering. Dogs sampled in Germany had a significantly higher risk for titres below threshold than dogs from other countries.

Cats had a significantly lower risk for insufficient titres compared to dogs. In general titres in cats were higher than in dogs. Young age, single vaccination and a long time-lag between vaccination and blood sampling were detected as risk factors for results below the threshold level. Differences between vaccines could not be identified in cats probably due to the low number of cases.

Legal requirements of the country of destination were not fulfilled in 17.5% of the animals. In 26.9% of the questionnaires inconsistencies with the data formerly supplied with the blood sample to the laboratory were detected.

In prospective vaccination studies the development of antibody titres after vaccination and revaccination against rabies with standard vaccines was examined in dogs, cats and ferrets. The risk factors for insufficient titres identified in dogs and cats by the epidemiological survey could be confirmed by these vaccination experiments. In ferrets there was no negative impact of concurrent vaccination against distemper and rabies on the antibody responses.

Finally the influence of the test system on the titre result was tested. The FAVN test was performed using the homologous rabies virus strain corresponding to the individual vaccine strain. The results were compared to those obtained by the standard protocol i.e. using the heterologous CVS strain. No significant difference was observed between the homologous and the heterologous test system indicating no

## 6. Abstract

systematic disadvantage of any vaccine strain. Our results demonstrate that the use of homologous test virus strains would not significantly reduce the percentage of results below the threshold level. The test parameters did not explain the higher odds for sub-threshold titres observed for some vaccine groups on its whole extend. Interestingly we did not find consistently improved results in the homologous testing system. In conclusion the CVS strain is suitable for use in the FAVN test.

The main objective of the study was to improve current vaccination recommendations in view of international travel regulations. The results indicate that a two-shot primary vaccination scheme against rabies should be used for dogs. Before testing for anti-rabies antibody titres and before travelling between areas of different rabies risk, dogs and cats should have been vaccinated at least twice against rabies.

# Anhang A.

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABLV	<i>Australian Bat Lyssavirus</i>
Al-hydroxid	Aluminiumhydroxid
Al(PO <sub>4</sub> )	Aluminiumphosphat
AM	Arzneimittel
Aqua bidest	doppelt destilliertes Wasser, Reinstwasser
ARAV	Aravan Virus
ATCC	American Type Culture Collection
BBLV	<i>Bakeloh Bat Lyssavirus</i>
BE	Blutentnahme
BHK	<i>Baby Hamster Kidney</i>
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CAV-2	Canines Adenovirus Typ 2
CDV	<i>Canine Distemper Virus</i> , Hundestaupevirus
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CPiV	Canines Parainfluenzavirus
CPV	Canines Parvovirus
CVS	<i>Challenge Virus Standard</i>
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DUVV	Duvenhage Virus
EBLV	<i>European Bat Lyssavirus</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
etc.	etcetera
EU	Europäische Union

## Anhang A. Abkürzungen

F	weiblich
Fa	Firma
FAVN-Test	<i>Fluorescent Antibody Virus Neutralisation Test</i>
FB	Fachbereich
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G-Protein	Glykoprotein
GMT	Geometrischer Mittlerer Titer
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HDC	Humane diploide Zellen
HFB	Hühnerfibroblastenzellen
i.d.R.	in der Regel
IKOV	Ikoma Lyssavirus
ISS	Internes Standardserum
IU	Internationale Einheiten
JLU	Justus-Liebig-Universität Gießen
k.A.	keine Angabe
Kap.	Kapitel
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumhydrogenphosphat
KHUV	Khujand Virus
KI	Konfidenzintervall
LBV	<i>Lagos Bat Virus</i>
log <sub>10</sub> ND <sub>50</sub>	Logarithmus zur Basis 10 der Neutralisierenden Dosis 50%
M	männlich
max.	maximal
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
MOKV	Mokolavirus
N	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenophosphat
N-Protein	Nukleoprotein
ND <sub>50</sub>	Neutralisierende Dosis 50% = Dosis, bei der 50% der Zellkulturen geschützt sind
NES	Negatives Standardserum
Norw.	Norwegen

OIE	Weltorganisation für Tiergesundheit, Paris
OIF	Orale Immunisierung der Füchse
OR	<i>Odds Ratio</i> , Risikoverhältnis
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCEC	primäre Hühnerembryonalzellen
PEI	Paul-Ehrlich-Institut, Langen
PEP	Postexpositionelle Prophylaxe
<i>PETS</i>	<i>Pet Travel Scheme</i>
Ph.Eur.	Europäisches Arzneibuch, Europäische Pharmakopoe
P.M.	Pitman Moore
PrEP	Präexpositionelle Prophylaxe
p.vacc.	<i>post vaccinationem</i>
RABV	<i>Rabies Lyssavirus</i> , klassisches Tollwutvirus
RFFIT	<i>Rapid Immunfluoreszens Focus Inhibition Test</i>
RIG	<i>Rabies Immunglobulin</i>
RNA	Ribonucleinsäure
RT-PCR	reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion
s.	siehe
S.	Seite
Schw.	Schweden
SHIBV	<i>Shimoni Bat Virus</i>
SNT	Serumneutralisationstest
SOP	<i>Standard Operating Procedure</i> , Standard-Arbeitsanweisung
StIKo Vet	Ständige Impfkommission Veterinärmedizin
Tab.	Tabelle
TCID <sub>50</sub>	<i>Tissue Culture Infective Dose 50%</i> = Dosis, bei der 50% der Zellkulturen infiziert werden
μl	Miroliter
u.a.	unter anderem
UK	<i>United Kingdom</i> , Vereinigtes Königreich
UpM	Umdrehungen pro Minute
v	Volumen
v. Chr.	vor Christus
VO	Verordnung
w	<i>weight</i> , Gewicht
WCBV	<i>West Caucasian Bat Virus</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i> , Weltgesundheitsorganisation
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
zpE	zytopathischer Effekt





# Anhang B. Fragebogen

VERTRAULICH

**BERICHT ZUR SEROLOGISCHEN UNTERSUCHUNG AUF TOLLWUTANTIKÖRPER**

Name/Ort des untersuchenden Labors	Befundkopie beigelegt ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/>
Ergebnis der Untersuchung ..... IU/ml	

1. EINSENDENDER TIERARZT	2. BETROFFENES TIER
Name .....	Tierart <input type="checkbox"/> Hund <input type="checkbox"/> Katze
Adresse .....	Rasse ..... geb. am .....
Telefon-Nr. .... Fax .....	Geschlecht <input type="checkbox"/> m <input type="checkbox"/> w kastriert? <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> ja
Email .....	Mikrochip/Tätowier-Nr. ....

**3. ANGEWANDTER IMPFSTOFF**

Name des Impfstoffs.....	Applikationsart <input type="checkbox"/> s.k. <input type="checkbox"/> i.m.
Hersteller.....	Datum der Impfung .....
Chargennummern.....	Datum der Blutentnahme .....

**4. GLEICHZEITIGE ANWENDUNG ANDERER ARZNEIMITTEL**

Wurden gleichzeitig, kurz vorher oder innerhalb von 2 Wochen nach der Impfung andere Arzneimittel (einschließlich anderer Impfstoffe, auch weitere Komponenten bei Kombiimpfstoffen) verabreicht?  
 nein  unbekannt  ja

**Falls ja, bitte erläutern**

Name der Arzneimittel	Chargennummern	Behandlungsdatum
1. ....	.....	.....
2. ....	.....	.....
3. ....	.....	.....

**Bemerkungen** .....

**5. VORHERIGE TOLLWUTIMPFUNGEN**

Hat das Tier bereits vorher Tollwutimpfungen erhalten:  nein  unbekannt  ja  
**Falls ja, bitte die letzten Impfungen angeben** (bei Kombiimpfstoffen bitte alle Komponenten):

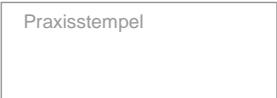
Name der Impfstoffe	Chargennummern	Impfdatum
1. ....	.....	.....
2. ....	.....	.....
3. ....	.....	.....

**Bemerkungen** .....

**6. UNTERSCHRIFT DES TIERARZTES**

Datum \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Unterschrift \_\_\_\_\_



An die einsendende  
Tierarztpraxis/ Tierklinik

S3                      06103 77-1802                      06103 77-1275                      Oktober 2005

**Blutuntersuchung auf Tollwutantikörper**

Sehr geehrte Kolleginnen und Kollegen,

Sie haben eine Untersuchung zur Bestimmung des Antikörperstatus nach Tollwutimpfung eines Heimtieres in Auftrag gegeben. Der beiliegende Untersuchungsbefund weist aus, dass der gemäß Einreisebestimmungen **erforderliche Mindesttiter erreicht** wurde.

Da, unabhängig vom untersuchenden Labor, bei einem relativ hohen Prozentsatz der untersuchten Tiere der Mindesttiter nicht erreicht wird, führt das Paul-Ehrlich-Institut derzeit eine Studie durch, um mögliche Einflussfaktoren auf die Antikörperbildung nach Tollwutimpfung zu untersuchen. Es wurde ein Fragebogen entwickelt, um zusätzliche Informationen zu den betroffenen Tieren und weiteren möglichen Einflussfaktoren (u.a. Zeitraum zwischen Impfung und Blutentnahme, verschiedene Rassen, verschiedene Impfstoffe und Impfstoffkombinationen, Alter der Tiere, etc.) zu erhalten. Damit die daraus erhaltenen Daten statistisch ausgewertet und Aussagen bezüglich der Signifikanz einzelner Einflussfaktoren getroffen werden können, wird darüber hinaus eine Kontrollgruppe benötigt, d.h. die entsprechenden Daten von Tieren, die im gleichen Zeitraum untersucht worden sind, den geforderten Mindesttiter jedoch erreicht haben.

Wir möchten Sie daher bitten, den Fragebogen, den Sie **auf der Rückseite dieses Schreibens** finden, vollständig auszufüllen und uns per Fax (06103-77 1275), Post oder E-Mail (vetmittelsicherheit@pei.de) zu übersenden. Aufgrund der vielen verschiedenen Einflussfaktoren wird nur dann eine wissenschaftliche Auswertung erfolgen können, wenn eine weitgehend vollständige Datenerfassung gelingt. Selbstverständlich werden die uns gegebenen Informationen vertraulich behandelt.

Wir möchten uns schon jetzt für Ihre Zusammenarbeit bedanken und verbleiben

mit freundlichen Grüßen

Im Auftrag

Dr. Klaus Cußler



# Abbildungsverzeichnis

1.1. Einstufung nach Risikogebieten gemäß WHO. . . . .	3
1.2. Tollwutfälle bei Füchsen in Europa in den Jahren 2005 und 2012 . . .	8
1.3. Tollwutfälle bei Hunden in Europa in den Jahren 2005 und 2012 . . .	9
2.1. Impfschema Katzen, 1. Impfversuch . . . . .	30
2.2. Impfschema Katzen, 2. Impfversuch . . . . .	31
2.3. Impfschema Frettchen . . . . .	33
2.4. Impfschema Hunde . . . . .	34
3.1. Hunde: Reiseziele . . . . .	38
3.2. Hunde: Altersgruppen . . . . .	40
3.3. Hunde: Anzahl Impfungen . . . . .	42
3.4. Hunde: Impfstoffhersteller . . . . .	44
3.5. Hunde: Impfstoffhersteller, Hunde im ersten Lebensjahr . . . . .	45
3.6. Hunde: Anteil mono- und polyvalenter Impfstoffe und Impfhistorie . .	46
3.7. Hunde: Impfstoffhersteller bei mehrfach geimpften Hunden . . . . .	48
3.8. Hunde: Rassen . . . . .	50
3.9. Hunde: Reproduktionsstatus . . . . .	50
3.10. Katzen: Reiseziele . . . . .	53
3.11. Katzen: Anzahl Impfungen . . . . .	53
3.12. Katzen: Altersgruppen . . . . .	54
3.13. Austitrierte Titer der hochtitrigen Seren . . . . .	56
3.14. Durchschnittstitler und Impfhistorie der Kontrollseren (Hunde) . . . .	57
3.15. Austitrierte Seren und Impfhistorie . . . . .	57
3.16. Datenbank: Tierarten . . . . .	59
3.17. Datenbank: Anteil Reiseuntersuchungen . . . . .	59
3.18. Datenbank: Anteil Tiere mit Titer <0.5 IU/ml . . . . .	60
3.19. Datenbank: Titer Hunde . . . . .	60
3.20. Datenbank: Titer Katzen . . . . .	61
3.21. Datenbank: Postleitzahlbereiche . . . . .	62
3.22. 1. Impfversuch Katzen: Titerverlauf nach Erstimpfung . . . . .	64
3.23. 1. Impfversuch Katzen: Titerverlauf nach Wiederholungsimpfung . . .	65
3.24. 2. Impfversuch Katzen: Titerverlauf . . . . .	66
3.25. Impfversuch Frettchen: Titerverlauf Impfstoffe D und E . . . . .	67
3.26. Impfversuch Frettchen: Titerverlauf Impfstoff C . . . . .	68
3.27. Impfversuch Frettchen: Titerverlauf Impfstoffe G und H . . . . .	68
3.28. Impfversuch Frettchen: Titerverlauf Staupe, adjuvanshaltige Impfstoffe	69

*Abbildungsverzeichnis*

3.29. Impfversuch Frettchen: Titerverlauf Staupe, adjuvansfreie Impfstoffe .	69
3.30. Impfversuch Hunde: Titerverlauf . . . . .	71
3.31. Impfversuch Hunde: Gesamtergebnisse . . . . .	72
3.32. Titerdifferenz zwischen homologem und heterologem Virusstamm . .	74

# Tabellenverzeichnis

1.1. Klassifizierung des Genus <i>Lyssavirus</i> . . . . .	5
1.2. Klassifizierung des Genus <i>Lyssavirus</i> , Fortsetzung . . . . .	6
2.1. In den Impfversuchen eingesetzte Impfstoffe . . . . .	23
3.1. Hunde: Geschlecht und Reproduktionsstatus . . . . .	37
3.2. Hunde: Durchschnittliche Titerhöhe . . . . .	39
3.3. Hunde: OR Alter . . . . .	40
3.4. Hunde: Zeitlicher Abstand Impfung - BE . . . . .	41
3.5. Hunde: OR Zeitlicher Abstand Impfung - BE . . . . .	41
3.6. Hunde: OR Anzahl Impfungen . . . . .	43
3.7. Hunde: Alter und Abstand Impfung - BE nach Erstimpfung . . . . .	43
3.8. Hunde: OR Impfstoffhersteller . . . . .	44
3.9. Hunde: OR Impfstoffhersteller, Hunde im ersten Lebensjahr . . . . .	45
3.10. Hunde: Impfstoffhersteller bei Erst- und Wiederholungsimpfung . . . . .	47
3.11. Hunde: Mehrfach geimpfte Hunde . . . . .	48
3.12. Hunde: OR Impfstoffhersteller, mehrfach geimpfte Hunde . . . . .	49
3.13. Hunde: zeitgleiche Anwendung anderer Arzneimittel . . . . .	51
3.14. Katzen: Geschlecht und Reproduktionsstatus . . . . .	52
3.15. Katzen: OR Alter . . . . .	55
3.16. Katzen: Anteil mono- und polyvalenter Impfstoffe . . . . .	55
3.17. Datenbank: Titer nach Herkunftsland . . . . .	61
3.18. 1. Impfversuch Katzen: Vergleich Impfstoffe . . . . .	63
3.19. Impfversuche Katzen: Kombinierte Auswertung . . . . .	66
3.20. Impfversuch Hunde: Vergleich nach Erstimpfung . . . . .	71
3.21. Impfversuch Hunde: Vergleich nach Boosterimpfung . . . . .	72



# Literaturverzeichnis

- [1] Verordnung zum Schutz gegen die Tollwut, Ausfertigungsdatum 23.05.1991.
- [2] Verordnung zur Änderung tierseuchenrechtlicher Verordnungen und zur Änderung der Seefischereiverordnung vom 20.12.2005, verkündet in BGBl I Jahrgang 2005 Nr. 74 vom 23.12.2005, 2005.
- [3] Assessment of the risk of rabies introduction into the UK, Ireland, Sweden, Malta, as a consequence of abandoning the serological test measuring protective antibodies to rabies. *The EFSA Journal*, 436, 1-54, 2006.
- [4] Verordnung zum Schutz gegen die Tollwut, Tollwut-Verordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 4. Oktober 2010 (BGBl. I S. 1313), die durch Artikel 10 der Verordnung vom 17. April 2014 (BGBl. I S. 388) geändert worden ist, 2014.
- [5] M. A. AbdelMageed, P. Foltopoulou, and E.A. McNeil. Feline vaccine-associated sarcomagenesis: Is there an inflammation-independent role for aluminium? *Vet comp oncol*, 5:357–362, July 2017.
- [6] Advisory Group on Quarantine and I. Kennedy. *Quarantine and Rabies: A Reappraisal*. Great Britain, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1998.
- [7] H. O. Aghomo, O. O. Oduye, and C. E. Rupprecht. The serological response of young dogs to the Flury LEP strain of rabies virus vaccine. *Vet Res Commun*, 14(5):415–425, May 1990.
- [8] P. A. Apanga, J. K. Awoonor-Williams, M. Acheampong, and M. A. Adam. A Presumptive Case of Human Rabies: A Rare Survived Case in Rural Ghana. *Frontiers in public health*, 4:256, 2016.
- [9] M. F. Aubert. Practical significance of rabies antibodies in cats and dogs. *Rev Sci Tech*, 11(3):735–760, Sep 1992.
- [10] H. Badrane, C. Bahloul, P. Perrin, and N. Tordo. Evidence of two Lyssavirus phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. *J Virol*, 75(7):3268–3276, Apr 2001.
- [11] H. Badrane and N. Tordo. Host switching in Lyssavirus history from the Chiroptera to the Carnivora orders. *J Virol*, 75(17):8096–8104, Sep 2001.
- [12] L. T. Berndtsson, A. K. J. Nyman, E. Rivera, and B. Klingeborn. Factors associated with the success of rabies vaccination of dogs in Sweden. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 53:22, May 2011.
- [13] G. Bijlenga and T. Heaney. Post-exposure local treatment of mice infected with rabies with two axonal flow inhibitors, Colchicine and Vinblastine. *J. Gen. Virol.*, 39:381–385, October 1978.

- [14] J. Blancou. Ecology and epidemiology of fox rabies. *Rev Infect Dis*, 10 Suppl 4:S606–S609, October 1988.
- [15] H. Boonsriroj, D. Llenaresas Manalo, K. Kimitsuki, T. Shimatsu, N. Shiwa, H. Shinozaki, Y. Takahashi, N. Tanaka, S. Inoue, and C.-H. Park. A pathological study of the salivary glands of rabid dogs in the Philippines. *The Journal of veterinary medical science*, 78:35–42, January 2016.
- [16] H. Bourhy, B. Kissi, L. Audry, M. Smreczak, M. Sadkowska-Todys, K. Kulonen, N. Tordo, J. F. Zmudzinski, and E. C. Holmes. Ecology and evolution of rabies virus in Europe. *J Gen Virol*, 80 ( Pt 10):2545–2557, Oct 1999.
- [17] H. Bourhy, B. Kissi, and N. Tordo. Molecular diversity of the Lyssavirus genus. *Virology*, 194(1):70–81, May 1993.
- [18] D. J. Briggs, J. S. Smith, F. L. Mueller, J. Schwenke, R. D. Davis, C. R. Gordon, K. Schweitzer, L. A. Orciari, P. A. Yager, and C. E. Rupprecht. A comparison of two serological methods for detecting the immune response after rabies vaccination in dogs and cats being exported to rabies-free areas. *Biologicals*, 26(4):347–355, Dec 1998.
- [19] S. M. Brookes, D. M. Healy, and A. R. Fooks. Ability of rabies vaccine strains to elicit cross-neutralising antibodies. *Dev Biol (Basel)*, 125:185–193, October 2006.
- [20] A. D. Bryceson, B. M. Greenwood, D. A. Warrell, N. M. Davidson, H. M. Pope, J. H. Lawrie, H. J. Barnes, W. E. Bailie, and G. E. Wilcox. Demonstration during life of rabies antigen in humans. *J Infect Dis*, 131(1):71–74, Jan 1975.
- [21] CDC Centers for Disease Control and Prevention. Recovery of a patient from clinical rabies. Wisconsin, 2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 53(50):1171–1173, Dec 2004.
- [22] F. Cliquet and M. Aubert. Elimination of terrestrial rabies in Western European countries. *Dev Biol (Basel)*, 119:185–204, April 2004.
- [23] F. Cliquet, M. Aubert, and L. Sagné. Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. *J Immunol Methods*, 212(1):79–87, Mar 1998.
- [24] F. Cliquet, E. Picard-Meyer, and E. Robardet. Rabies in Europe: what are the risks? *Expert review of anti-infective therapy*, 12:905–908, August 2014.
- [25] F. Cliquet, Y. Verdier, L. Sagné, M. Aubert, J. L. Schereffer, M. Selve, M. Wasniewski, and A. Servat. Neutralising antibody titration in 25,000 sera of dogs and cats vaccinated against rabies in France, in the framework of the new regulations that offer an alternative to quarantine. *Rev Sci Tech*, 22(3):857–866, Dec 2003.
- [26] P. Crepin, L. Audry, Y. Rotivel, A. Gacoin, C. Caroff, and H. Bourhy. Intra-vitam diagnosis of human rabies by PCR using saliva and cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol*, 36(4):1117–1121, Apr 1998.
- [27] D. David, M. Bellaiche, and B. A. Yakobson. Rabies in two vaccinated dogs in Israel. *Vet Rec.*, 167(23):907–8, Dec. 2010.

- [28] A. D. Davis, R. J. Rudd, and R. A. Bowen. Effects of aerosolized rabies virus exposure on bats and mice. *J Infect Dis*, 195(8):1144–1150, Apr 2007.
- [29] P. De Benedictis, F. Mutinelli, C. Veggiato, I. Capua, G. Sequecco, R. Coassin, and G. Ferri. Rabies in a vaccinated dog in Italy. *Vet Rec*, 165(7):216, Aug. 2009.
- [30] A. de Souza and S. N. Madhusudana. Survival from rabies encephalitis. *Journal of the neurological sciences*, 339(1-2):8–14, 2014.
- [31] R. E. Dierks, F. A. Murphy, and A. K. Harrison. Extraneural rabies virus infection. Virus development in fox salivary gland. *Am J Pathol*, 54(2):251–273, Feb 1969.
- [32] European Pharmacopoeia. Monograph 0451, Rabies vaccine (inactivated) for veterinary use. *European Pharmacopoeia*, 04, 2008.
- [33] J. S. Evans, D. L. Horton, A. J. Easton, A. R. Fooks, and A. C. Banyard. Rabies virus vaccines: Is there a need for a pan-lyssavirus vaccine? *Vaccine*, 110(30):171a, February 2012.
- [34] M. Fekadu, S. L. Nesby, J. H. Shaddock, C. L. Schumacher, S. B. Linhart, and D. W. Sanderlin. Immunogenicity, efficacy and safety of an oral rabies vaccine (SAG-2) in dogs. *Vaccine*, 14(6):465–468, Apr 1996.
- [35] M. Fekadu and J. H. Shaddock. Peripheral distribution of virus in dogs inoculated with two strains of rabies virus. *Am J Vet Res*, 45(4):724–729, Apr 1984.
- [36] M. Fekadu, J. H. Shaddock, and G. M. Baer. Excretion of rabies virus in the saliva of dogs. *J Infect Dis*, 145(5):715–719, May 1982.
- [37] A. R. Fooks, G. Harkess, T. Goddard, D. A. Marston, L. McElhinney, K. Brown, D. Morgan, R. Paul, P. J. Thomas, and B. Smith. Rabies virus in a dog imported to the UK from Sri Lanka. *Vet Rec*, 162(18):598, May 2008.
- [38] A. R. Fooks, L. M. McElhinney, D. J. Pounder, C. J. Finnegan, K. Mansfield, N. Johnson, S. M. Brookes, G. Parsons, K. White, P. G. McIntyre, and D. Nathwani. Case report: isolation of a European bat lyssavirus type 2a from a fatal human case of rabies encephalitis. *J Med Virol*, 71(2):281–289, Oct 2003.
- [39] C. Freuling, T. Selhorst, A. Kliemt, F. J. Conraths, and T. Müller. Deutschland ist tollwutfrei! *Forschungsreport FLI*, 1:34–38, 2008.
- [40] C. Freuling, A. Vos, N. Johnson, A. Fooks, and T. Müller. Bat rabies - a gordian knot? *Berl Münch Tierärztl Wochenschr*, 122:425–433, November 2009.
- [41] Z. F. Fu. Rabies and rabies research: past, present and future. *Vaccine*, 15 Suppl:S20–S24, November 1997.
- [42] K. M. Gottesdiener. Transplanted infections: donor-to-host transmission with the allograft. *Ann Intern Med*, 110(12):1001–1016, Jun 1989.
- [43] C. E. Greene and D. W. Dreesen. Chapter 22 (Rabies). In: *C.E. Greene (ed.), Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and the cat*, pages 114 – 126. The W. B. Saunders Co., Philadelphia, Pa., 2nd edition, 2007.

- [44] K. Hampson, L. Coudeville, T. Lembo, M. Sambo, A. Kieffer, M. Attlan, J. Barrat, J. D. Blanton, D. J. Briggs, S. Cleaveland, P. Costa, C. M. Freuling, E. Hiby, L. Knopf, F. Leanes, F.-X. Meslin, A. Metlin, M. E. Miranda, T. Müller, L. H. Nel, S. Recuenco, C. E. Rupprecht, C. Schumacher, L. Taylor, M. A. Natal Vigilato, J. Zinsstag, J. Dushoff, and Global Alliance for Rabies Control Partners for Rabies Prevention. Estimating the global burden of endemic canine rabies. *PLoS neglected tropical diseases*, 9:e0003709, April 2015.
- [45] W. Hellenbrand, C. Meyer, G. Rasch, I. Steffens, and A. Ammon. Cases of rabies in Germany following organ transplantation. *Euro Surveill*, 10(2):E050224.6, November 2005.
- [46] M. J. Hendrick, M. H. Goldschmidt, F. S. Shofer, Y. Y. Wang, and A. P. Somlyo. Postvaccinal sarcomas in the cat: epidemiology and electron probe microanalytical identification of aluminum. *Cancer Res*, 52(19):5391–5394, Oct 1992.
- [47] DJ Hicks, AR Fooks, and N Johnson. Developments in rabies vaccines. *Clinical & Experimental Immunology*, 169(3):199–204, 2012.
- [48] ICTV International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus Taxonomy: 2009 Release, 2009.
- [49] ICTV International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus Taxonomy: 2011 Release, 2011.
- [50] ICTV International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus Taxonomy: 2013 Release, 2013.
- [51] ICTV International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus Taxonomy: 2016 Release, 2016.
- [52] N. Johnson, C. Black, J. Smith, H. Un, L. M. McElhinney, O. Aylan, and A. R. Fooks. Rabies emergence among foxes in Turkey. *J Wildl Dis*, 39(2):262–270, Apr 2003.
- [53] N. Johnson, A. Fooks, and K. McColl. Human rabies case with long incubation, Australia. *Emerg Infect Dis*, 14(12):1950–1951, Dec 2008.
- [54] N. Johnson, C. Freuling, A. Vos, H. Un, R. Valtchovski, M. Turcitu, F. Dumistrescu, V. Vuta, R. Velic, V. Sandrac, O. Aylan, T. Müller, and A. R. Fooks. Epidemiology of rabies in Southeast Europe. *Dev Biol (Basel)*, 131:189–198, August 2008.
- [55] N. Johnson, R. Phillipotts, and A. R. Fooks. Airborne transmission of lyssaviruses. *J Med Microbiol*, 55(Pt 6):785–790, Jun 2006.
- [56] L. J. Kennedy, M. Lunt, A. Barnes, L. McElhinney, A. R. Fooks, D. N. Baxter, and W. E. R. Ollier. Factors influencing the antibody response of dogs vaccinated against rabies. *Vaccine*, 25(51):8500–8507, Dec 2007.
- [57] D. L. Knobel, S. Cleaveland, P. G. Coleman, E. M. Fèvre, M. I. Meltzer, M. E. Miranda, A. Shaw, J. Zinsstag, and F.X. Meslin. Re-evaluating the burden of rabies in Africa and Asia. *Bull World Health Organ*, 83(5):360–368, May 2005.

- [58] J. Krebs, J. Smith, C. Rupprecht, and J. Childs. Rabies surveillance in the United States during 1998. *J Am Vet Med Assoc*, 215(12):1786–1798, 1999.
- [59] J. Krebs, J. Wheeling, and J. Childs. Rabies surveillance in the United States during 2002. *J Am Vet Med Assoc*, 223(12):1736–1748, Dec 2003.
- [60] I. V. Kuzmin, A. D. Botvinkin, L. M. McElhinney, J. S. Smith, L. A. Orciari, G. J. Hughes, A. R. Fooks, and C. E. Rupprecht. Molecular epidemiology of terrestrial rabies in the former Soviet Union. *J Wildl Dis*, 40(4):617–631, Oct 2004.
- [61] O. P. Larghi, E. González, and J. R. Held. Evaluation of the corneal test as a laboratory method for rabies diagnosis. *Appl Microbiol*, 25(2):187–189, Feb 1973.
- [62] H. G. Lloyd. Wildlife rabies in Europe and the British situation. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 70(3):179–187, Sep 1976.
- [63] E. Lycke and H. Tsiang. Rabies virus infection of cultured rat sensory neurons. *J Virol*, 61(9):2733–2741, Sep 1987.
- [64] K. L. Mansfield, P. D. Burr, D. R. Snodgrass, R. Sayers, and A. R. Fooks. Factors affecting the serological response of dogs and cats to rabies vaccination. *Vet Rec*, 154(14):423–426, Apr 2004.
- [65] D. A. Marston and R. J. Ellis. Complete genome sequence of ikoma lyssavirus. *J. Virol.*, 68(86):665–678, June 2012.
- [66] D. A. Marston and D. L. Horton. Ikoma lyssavirus, highly divergent novel lyssavirus in an african civet. *Emerg. Infect. Dis.*, 5707(18):362–369, April 2012.
- [67] J. M. Minke, J. Bouvet, F. Cliquet, M. Wasniewski, L. Lemaitre, C. Cariou, V. Cozette, L. Vergne, and P. M. Guigal. Comparison of antibody responses after vaccination with two inactivated rabies vaccines. *Vet Microbiol*, 133(3):283–6, April 2009.
- [68] K. Miyamoto and S. Matsumoto. The nature of the Negri body. *J Cell Biol*, 27(3):677–682, Dec 1965.
- [69] T. Müller, J. Cox, W. Peter, R. Schäfer, N. Johnson, L. M. McElhinney, J. L. Geue, K. Tjørnehøj, and A. R. Fooks. Spill-over of European bat lyssavirus type 1 into a stone marten (*Martes foina*) in Germany. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 51(2):49–54, Mar 2004.
- [70] S. M. Moore, T. A. Ricke, R. D. Davis, and D. J. Briggs. The influence of homologous vs. heterologous challenge virus strains on the serological test results of rabies virus neutralizing assays. *Biologicals*, 33(4):269–276, Dec 2005.
- [71] J. S. Munday, N. L. Stedman, and L. J. Richey. Histology and immunohistochemistry of seven ferret vaccination-site fibrosarcomas. *Vet Pathol*, 40(3):288–293, May 2003.
- [72] J. Murray. Vaccine injection-site sarcoma in a ferret. *J Am Vet Med Assoc*, 213(7):955, Oct 1998.
- [73] S. A. Nadin-Davis, M. Abdel-Malik, J. Armstrong, and A. I. Wandeler. Lyssa-

- virus P gene characterisation provides insights into the phylogeny of the genus and identifies structural similarities and diversity within the encoded phosphoprotein. *Virology*, 298(2):286–305, Jul 2002.
- [74] A. A. Neilson and C. A. Mayer. Rabies - prevention in travellers. *Aust Fam Physician*, 39(9):641–645, Sep 2010.
- [75] E. Niin, M. Laine, A. L. Guiot, J. M. Demerson, and F. Cliquet. Rabies in Estonia: situation before and after the first campaigns of oral vaccination of wildlife with SAG2 vaccine bait. *Vaccine*, 26(29-30):3556–3565, Jul 2008.
- [76] P. Nouvellet, C. A. Donnelly, M. De Nardi, C. J. Rhodes, P. De Benedictis, C. Citterio, F. Obber, M. Lorenzetto, M. Dalla Pozza, S. Cauchemez, and G. Cattoli. Rabies and canine distemper virus epidemics in the red fox population of northern Italy (2006-2010). *PloS one*, 8:e61588, 2013.
- [77] French Ministry of Agriculture and French Ministry of Health. Measures to control an imported case of canine rabies in France. *Dev Biol (Basel)*, 125:95–100, July 2006.
- [78] OIE. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Animals*, 2013.
- [79] B. S. Prabhakar and N. Nathanson. Acute rabies death mediated by antibody. *Nature*, 290(5807):590–1, June 1981.
- [80] H. K. Pradhan, J. P. Gurbuxani, F. Cliquet, B. Pattnaik, S. S. Patil, A. Regnault, H. Begouen, A. L. Guiot, R. Sood, P. Mahl, R. Singh, E. Picard, M. F A Aubert, J. Barrat, and F. X. Meslin. New steps in the control of canine rabies in India. *Dev Biol (Basel)*, 131:157–166, June 2008.
- [81] P. Précausta, J. P. Soulebot, M. Bugand, A. Brun, and G. Chappuis. [Modalities of production and immunity conferred by an inactivated rabies vaccine originating from cell culture]. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 5(1-3):217–226, December 1982.
- [82] E. Robardet, E. Picard-Meyer, M. Dobroštana, I. Jaceviciene, K. Mähar, Z. Muižniece, G. Pridotkas, M. Masiulis, E. Niin, E. Olševskis, and F. Cliquet. Rabies in the Baltic States: Decoding a Process of Control and Elimination. *PLoS neglected tropical diseases*, 10:e0004432, February 2016.
- [83] E. Rota Nodari, S. Alonso, M. Mancin, M. De Nardi, S. Hudson-Cooke, C. Veggiato, G. Cattoli, and P. De Benedictis. Rabies Vaccination: Higher Failure Rates in Imported Dogs than in those Vaccinated in Italy. *Zoonoses and public health*, 64:146–155, March 2017.
- [84] C. Rupprecht, I. Kuzmin, and F. Meslin. Lyssaviruses and rabies: current conundrums, concerns, contradictions and controversies. *F1000Research*, 6:184, 2017.
- [85] C. E. Rupprecht, C. A. Hanlon, and D. Slate. Oral vaccination of wildlife against rabies: opportunities and challenges in prevention and control. *Dev Biol (Basel)*, 119:173–184, July 2004.
- [86] B Saeed and M Al-Mousawi. Rabies acquired through kidney transplantation in a child: a case report. *Exp. Clin. Transplant.*, 140(3):3322–3322, Oct 2017.

- [87] M. C. Schneider, P. C. Romijn, W. Uieda, H. Tamayo, D. Fernandes da Silva, A. Belotto, J. Barbosa da Silva, and L. F. Leanes. Rabies transmitted by vampire bats to humans: an emerging zoonotic disease in Latin America? *Rev Panam Salud Publica*, 25(3):260–269, Mar 2009.
- [88] V. Servas, A. Mailles, D. Neau, C. Castor, A. Manetti, E. Fouquet, J-M. Ragnaud, H. Bourhy, M-C. Paty, N. Melik, J. Astoul, F. Cliquet, M-P. Moiton, C. François, M. Coustillas, J-C. Minet, P. Parriaud, I. Capek, and L. Filleul. An imported case of canine rabies in Aquitaine: investigation and management of the contacts at risk, August 2004-March 2005. *Euro Surveill*, 10(11):222–225, Nov 2005.
- [89] A. Servat, S. Kempff, A. Labadie, J.L. Schereffer, F. Boué, and F. Cliquet. In vivo potency tests of rabies inactivated vaccines for veterinary use. A 2-year retrospective analysis of data according to the criteria of the European Pharmacopoeia. *Pharmeuropa*, 20:655 – 664, May 2008.
- [90] V. Shankar, B. Dietzschold, and H. Koprowski. Direct entry of rabies virus into the central nervous system without prior local replication. *J Virol*, 65(5):2736–2738, May 1991.
- [91] J. S. Smith, D. B. Fishbein, C. E. Rupprecht, and K. Clark. Unexplained rabies in three immigrants in the United States. A virologic investigation. *N Engl J Med*, 324(4):205–211, Jan 1991.
- [92] J. S. Smith, P. A. Yager, and G. M. Baer. A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. *Bull World Health Organ*, 48(5):535–541, May 1973.
- [93] J. P. Soulebot, A. Brun, G. Chappuis, F. Guillemin, H. G. Petermann, P. Precausta, and J. Terre. Experimental rabies in cats: immune response and persistence of immunity. *Cornell Vet*, 71(3):311–325, Jul 1981.
- [94] A. Srinivasan, E. C. Burton, M. J. Kuehnert, C. Rupprecht, W. L. Sutker, T. G. Ksiazek, C. D. Paddock, J. Guarner, W. J. Shieh, C. Goldsmith, C. A. Hanlon, J. Zoretic, B. Fischbach, M. Niezgoda, W. H. El-Feky, L. Orciari, E. Q. Sanchez, A. Likos, G. B. Klintmalm, D. Cardo, J. LeDuc, M. E. Chamberland, D. B. Jernigan, S. R. Zaki, and Rabies in Transplant Recipients Investigation Team. Transmission of rabies virus from an organ donor to four transplant recipients. *N Engl J Med*, 352(11):1103–1111, Mar 2005.
- [95] StIKo. Empfehlungen der Ständigen Impfkommision (StIKo) am Robert-Koch-Institut. *Epidemiologisches Bulletin*, 30:279–298, 2010.
- [96] StIKo Vet. Leitlinien zur Impfung von Kleintieren, 2017.
- [97] Ständige Impfkommision Veterinär im Bundesverband praktizierender Tierärzte e.V. (StIKo vet. im bpt). Deutsche Impfempfehlungen für die Kleintierpraxis. 2006.
- [98] P. Sureau. Contribution to rabies prevention. *Vaccine*, 10(13):896–899, 1992.
- [99] V. Tepsumethanon, B. Lumlertdacha, C. Mitmoonpitak, V. Sitprija, F. X. Meslin, and H. Wilde. Survival of naturally infected rabid dogs and cats. *Clin Infect Dis*, 39(2):278–280, Jul 2004.

- [100] C. Troupin, L. Dacheux, M. Tanguy, C. Sabeta, H. Blanc, C. Bouchier, M. Vignuzzi, S. Duchene, E. C. Holmes, and H. Bourhy. Large-Scale Phylogenomic Analysis Reveals the Complex Evolutionary History of Rabies Virus in Multiple Carnivore Hosts. *PLoS pathogens*, 12:e1006041, December 2016.
- [101] H. Tsiang. Evidence for an intraaxonal transport of fixed and street rabies virus. *J Neuropathol Exp Neurol*, 38(3):286–299, May 1979.
- [102] H. Tsiang, P. E. Ceccaldi, and E. Lycke. Rabies virus infection and transport in human sensory dorsal root ganglia neurons. *J Gen Virol*, 72 ( Pt 5):1191–1194, May 1991.
- [103] H. Tsiang and P. H. Lagrange. In vivo detection of specific cell-mediated immunity in street rabies virus infection in mice. *J Gen Virol*, 47(1):183–191, Mar 1980.
- [104] H. Tsiang, E. Lycke, P. E. Ceccaldi, A. Ermine, and X. Hirardot. The anterograde transport of rabies virus in rat sensory dorsal root ganglia neurons. *J Gen Virol*, 70 ( Pt 8):2075–2085, Aug 1989.
- [105] S. Tsiodras, G. Dougas, A. Baka, C. Billinis, S. Doudounakis, A. Balaska, T. Georgakopoulou, G. Rigakos, V. Kontos, K. E. Tasioudi, M. Tzani, P. Tsarouxa, P. Iliadou, O. Mangana-Vougiouka, D. Iliopoulos, S. Sapounas, P. Efsthathiou, A. Tsakris, C. Hadjichristodoulou, and J. Kremastinou. Re-emergence of animal rabies in northern Greece and subsequent human exposure, October 2012 - March 2013. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 18:20474, May 2013.
- [106] R. M. Wallace, A. Pees, J. B. Blanton, and S. M. Moore. Risk factors for inadequate antibody response to primary rabies vaccination in dogs under one year of age. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 46:3036–3037, March 2017.
- [107] H. D. Watson, G. H. Tignor, and A. L. Smith. Entry of rabies virus into the peripheral nerves of mice. *J Gen Virol*, 56(Pt 2):372–382, Oct 1981.
- [108] A. Weber, B. Keller, and W. Schmahl. Fallbericht: Tollwut bei einem aus Aserbeidschan importierten, geimpften Hund. *Praktischer Tierarzt*, 12:912–914, 2003.
- [109] WHO. Expert Committee on Rabies: Eighth Report. Technical Report TRS 824, WHO, 1992.
- [110] WHO. Expert consultation on rabies - First Report. Technical Report TRS 931, WHO, 2005.
- [111] WHO. Fact Sheet Rabies. Technical Report 99, WHO, September 2006.
- [112] R. E. Willoughby, K. S. Tieves, G. M. Hoffman, N. S. Ghanayem, C. M. Amliel-Lefond, M. J. Schwabe, M. J. Chusid, and C. E. Rupprecht. Survival after treatment of rabies with induction of coma. *N Engl J Med*, 352(24):2508–2514, Jun 2005.
- [113] S. Winkle. Die Tollwut im Altertum. *Die gelben Hefte (Behring Werke)*, 11(1):34 – 44, 1971.
- [114] B. Yakobson, N. Taylor, N. Dveres, S. Rotblat, Z. Spero, E. W. Lankau, and

- J. Maki. Impact of Rabies Vaccination History on Attainment of an Adequate Antibody Titre Among Dogs Tested for International Travel Certification, Israel - 2010-2014. *Zoonoses and public health*, December 2016.
- [115] S. Zhang, Y. Liu, A. R. Fooks, F. Zhang, and R. Hu. Oral vaccination of dogs (*Canis familiaris*) with baits containing the recombinant rabies-canine adenovirus type-2 vaccine confers long-lasting immunity against rabies. *Vaccine*, 26(3):345–350, Jan 2008.