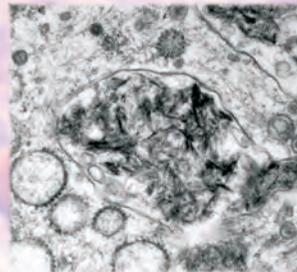
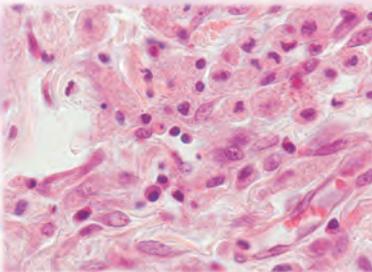


UNTERSUCHUNGEN ZU INJEKTIONSASSOZIIERTEN REAKTIONEN MIT BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG ALUMINIUMHALTIGER IMPFSTOFFE AM FRETTCHEM

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

CLAUDIA HERGENHAN



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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

1. Auflage 2009

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

1st Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

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

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Manfred Reinacher

und

dem Paul-Ehrlich-Institut
Langen

Betreuer: PD Dr. Andreas Hoffmann

**Untersuchungen zu injektionsassoziierten Reaktionen
mit besonderer Berücksichtigung aluminiumhaltiger
Impfstoffe am Frettchen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Claudia Hergenhan

Tierärztin aus Frankfurt am Main

Gießen, 2009

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer

Gutachter: Prof. Dr. Manfred Reinacher

PD Dr. Andreas Hoffmann

Tag der Disputation: 26. November 2009

**Gib jedem Tag die Chance,
der schönste Deines Lebens zu werden.**

Mark Twain

Meiner Familie in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

Abschnitt	Seite
1. Einführung	1
2. Literaturübersicht	6
2.1 Historie der Impfung.....	6
2.2 Adjuvans – Steigerung der Effektivität und Verringerung der Dosis	8
2.3 Die lokale Entzündungsreaktion nach einer Impfung	10
2.3.1 Lokalreaktion beim Menschen	11
2.3.2 Lokalreaktion bei Tieren	11
2.3.3 Abtransport der aluminiumhaltigen Adjuvantien	18
3. Eigene Untersuchungen	20
3.1 Material und Methoden	20
3.1.1 Versuchsaufbau	20
3.1.2 Untersuchungsmaterial	22
3.1.3 Vorbericht.....	23
3.1.4 Probenvorbereitung für die Detektion von Aluminium und zur Charakterisierung der Entzündung im Gewebe.....	24
3.1.4.1 Präparation für die Histologie	24
3.1.4.2 Präparation für die induktiv gekoppelte Plasmaionen-Massenspektrometrie .	25
3.1.4.3 Präparation für die Elektronenmikroskopie.....	25
3.1.4.4 Präparation für die energiedispersive Röntgenanalytik.....	27
3.1.5 Statistische Analyse.....	27
3.2 Ergebnisse	29
3.2.1. Makroskopische Befunde	29
3.2.2. Histopathologische Befunde.....	29
3.2.2.1. Befunde der ersten Versuchsserie.....	29
3.2.2.2. Befunde der zweiten Versuchsserie.....	37
3.2.2.3. Befunde im Bereich der Markierungen	51
3.2.2.4. Vergleichende Darstellung der Untersuchungsbefunde	51
3.2.2.4.1 Betrachtung der Entzündung – Ansätze zu einer quantitativen Analyse.....	51
3.2.2.4.2 Betrachtung der Entzündung bezüglich der Zellart, des Zelltodes und der Granulationsgewebsbildung	61

Inhaltsverzeichnis

Abschnitt	Seite
3.2.3. Befunde der induktiv gekoppelten Plasmaionen-Massenspektrometrie (ICP-MS)	109
3.2.4. Elektronenmikroskopische Befunde.....	115
3.2.5. Befunde der energiedispersiven Röntgenanalytik	123
4. Diskussion.....	128
4.1 Aluminiumhydroxidhaltiges Adjuvans	128
4.2 Lokale histologische Veränderungen nach Verabreichung aluminiumadjuvanshaltiger Impfstoffe.....	133
4.3 Schlussfolgerung	141
5. Zusammenfassung und Summary	143
5.1 Zusammenfassung	143
5.2 Summary	144
6. Tabellen	146
7. Materialien	150
8. Abkürzungen	151
9. Literaturverzeichnis.....	154

1. Einführung

Lokale injektionsassoziierte Reaktionen bei Mensch und Tier

Lokale injektionsassoziierte Reaktionen nach einer Impfung werden schon seit vielen Jahren bei Mensch und Tier beobachtet. Beim Menschen wurden hierbei schmerzhafte Schwellungen (Erdohazi & Newman 1971; Fawcett & Smith 1984; Culora *et al.* 1996), subkutane Knoten (Erdohazi & Newman 1971; Fawcett & Smith 1984; Miliauskas *et al.* 1993; Lafaye *et al.* 2004) oder Schwellungen bzw. subkutane Knoten in Verbindung mit Juckreiz (Fawcett & Smith 1984; Culora *et al.* 1996; Bergfors *et al.* 2005) sowie allergische Reaktionen auf das im Impfstoff enthaltene Aluminium (Bergfors *et al.* 2005) beschrieben. Sofern die lokalen Reaktionen mit einer Gewebsproliferation einhergingen, konnte deren Entwicklung in einem sehr weiten Zeitraum von fünfzehn Tagen bis zweiundzwanzig Monaten nach der Impfung beobachtet werden (Erdohazi & Newman 1971; Fawcett & Smith 1984; Miliauskas *et al.* 1993; Bordet *et al.* 2001; Bergfors *et al.* 2005). Sie persistierten über Monate (Erdohazi & Newman 1971; Fawcett & Smith 1984) bis zu sieben Jahren (Bergfors *et al.* 2005) und wiesen in der Zeit bis zur Untersuchung nur einen geringen Rückgang der Schwellung auf (Erdohazi & Newman 1971; Fawcett & Smith 1984). Nach der Entnahme der knotigen Veränderung konnte in den vier von Culora und in den zehn von Lafaye untersuchten Fällen kein Rezidiv beobachtet werden (Culora *et al.* 1996; Lafaye *et al.* 2004).

Histologisch wurden diese Läsionen hauptsächlich durch eine granulomatös-nekrotisierende Reaktion mit eingelagertem Fremdmaterial charakterisiert (Erdohazi & Newman 1971; Fawcett & Smith 1984; Miliauskas *et al.* 1993; Bordet *et al.* 2001). Dieses wurde durch weitere Untersuchung als Aluminium identifiziert (Erdohazi & Newman 1971; Fawcett & Smith 1984; Miliauskas *et al.* 1993; Culora *et al.* 1996; Madewell *et al.* 2001; Bordet *et al.* 2001; Lafaye *et al.* 2004; Rivas *et al.* 2005; Chong *et al.* 2006).

Chong wies auf Fettnekrosen, fokale Fibrosen und eine gemischtzellige Entzündung im untersuchten Gewebe hin (Chong *et al.* 2006). In vielen Fällen wurde eine Granulombildung (Erdohazi & Newman 1971; Savage 1973; Fawcett & Smith 1984; Bordet *et al.* 2001; Lafaye *et al.* 2004; Chong *et al.* 2006) oder eine Granulombildung mit lymphozytärer Hyperplasie (Lafaye *et al.* 2004) beschrieben. In einigen Fällen wurde von makrophagischer Myofasziitis (Sharma *et al.* 2004; Di Muzio *et al.* 2004; Rivas *et al.* 2005) und Bildung eines kutanen Pseudolymphoms (Maubec *et al.* 2005) berichtet.

Einführung

Auch bei der makrophagischen Myofasziitis konnte Fremdmaterial im Gewebe gefunden und als Aluminium bestimmt werden (Gherardi *et al.* 2001; Rivas *et al.* 2005).

Abhängig von der Art der Verabreichung der Injektion wurden auch bei Tieren, insbesondere bei Katzen, feste Knoten im Muskel (Dubielzig *et al.* 1993) bzw. in der Haut und Unterhaut (Hendrick & Brooks 1994) sowie überpigmentierte haarlose Stellen (Wilcock & Yager 1986) nach einer Impfung im Bereich der Injektionsstelle beobachtet. Die Reaktionen entwickelten sich im Zeitraum von zwei Wochen bis zehn Jahren nach Durchführung der Injektion (Wilcock & Yager 1986; Hendrick & Dunagan 1991; Dubielzig *et al.* 1993; Hendrick & Brooks 1994; Gemmill 1998; Briscoe *et al.* 1998).

Histologisch konnten diese Läsionen als subkutane granulomatöse Entzündungsreaktionen mit zentraler Nekrose (Hendrick & Goldschmidt 1991), nekrotisierend-granulomatöse Pannikulitis (Hendrick & Dunagan 1991), fokale Vaskulitis (Wilcock & Yager 1986), Fibrosarkom (Munday *et al.* 2003; Hendrick & Goldschmidt 1991; Dubielzig *et al.* 1993; Hendrick & Brooks 1994; Briscoe *et al.* 1998; Ford *et al.* 2000; Madewell *et al.* 2001; Madewell *et al.* 2004), malignes fibröses Histiozytom (Wilcock & Yager 1986; Esplin *et al.* 1993; Hendrick & Brooks 1994; Ford *et al.* 2000; Madewell *et al.* 2001), Osteosarkom (Esplin *et al.* 1993; Hendrick & Brooks 1994; Ford *et al.* 2000), Rhabdomyosarkom (Hendrick & Brooks 1994; Ford *et al.* 2000; Chang *et al.* 2006), Chondrosarkom (Hendrick & Brooks 1994), Liposarkom, Lymphosarkom, Myxofibrosarkom und gemischtgewebige Sarkome (Hendrick & Brooks 1994; Ford *et al.* 2000) identifiziert werden. In einem Teil der untersuchten Gewebeproben wurde eingelagertes Material gefunden. Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass es sich hierbei um Aluminium handelte (Hendrick *et al.* 1992; Madewell *et al.* 2001). Man folgerte, dass das Persistieren der Entzündung und die immunologischen Reaktionen in Verbindung mit der Anwesenheit des Aluminiumadjuvans an der Injektionsstelle die Katze prädisponiert, eine Störung in der Ordnung ihres Faserbindegewebes während der reparierenden Antwort auszubilden und dass diese Störung in manchen Fällen zur neoplastischen Transformation führt (Hendrick *et al.* 1992).

Die Beobachtung, dass sich nach einem okulären Trauma oder einer chronischen Uveitis bei Katzen ein primäres intraokuläres Sarkom entwickelte, bestärkte diese Hypothese (Dubielzig 1984; Jelínek 2003).

Einführung

Die Diagnose eines Uterussarkoms nach lang (ohne nähere Zeitangabe) anhaltender Pyometra (Jelínek 2003) lässt ebenfalls auf eine Verbindung zwischen Entzündung und Tumorprogression schließen.

Einen weiteren Hinweis auf den möglichen Zusammenhang von Entzündung und Tumorentstehung brachte eine Untersuchung von Hühnerküken, die mit dem Rous Sarkomvirus infiziert worden waren. Sie entwickelten im Bereich der Injektionsstelle nach Injektion von Rous Sarkomviren Tumoren. Um einen Wundreiz zur Überprüfung der Beobachtung zu setzen, wurde daher zehn Tage alten Küken chirurgische Seide in den Flügel eingebracht. Die Tiere waren zu diesem Zeitpunkt mit dem Rous Sarkomvirus infiziert.

Mit dieser Methode wurde zu 100 % Tumoren im Bereich der eingebrachten Seide induziert. Im Lauf der Untersuchung konnte der Beweis erbracht werden, dass die Kombination aus dem Wachstums- und Differenzierungsfaktor Transforming Growth Faktor- β 1 (TGF- β 1) und dem Virus bei den Küken eine wichtige Rolle bei der Tumorbildung spielte (Sieweke *et al.* 1989; Sieweke *et al.* 1990).

Einige Jahre später beschäftigten sich andere Wissenschaftler (Martins-Green *et al.* 1994) mit der Entstehung dieser Tumoren nach der Impfung bei Küken. Die Studie zeigte, dass sich bei einem geimpften Tier ein Tumor auch im Bereich von Wunden entwickelte, die nicht in der Nachbarschaft des Primärtumors lagen. Es konnte belegt werden, dass es sich dabei nicht um eine Metastase handelte. Außerdem wurde bewiesen, dass unter anderem die Entwicklung eines Tumors in einer Wunde mit der Anwesenheit zirkulierender Viren und einer Entzündung korreliert. Dazu gehörte auch der Nachweis, dass außer dem TGF- β auch saure und basische Wachstumsfaktoren der Fibroblasten (fibroblast growth factors) eine Wunde zur Tumorbildung bringen konnten. Diese drei Faktoren (TGF- β sowie saure und basische Wachstumsfaktoren der Fibroblasten), welche die Tumorentstehung unterstützten, induzierten auch eine Entzündung. TGF- α und der epidermale Wachstumsfaktor, die beide an der Wundheilung beteiligt sind, bewirkten dies dagegen nicht. Wurde die Entzündung durch Anwendung eines antiinflammatorisch wirkenden Mittels (β -Methylprednisolon) unterdrückt, wurde auch die Tumorbildung verhindert. Man folgerte, dass die Induktion einer Tumorbildung im Bereich einer Wunde bei einem mit Rous Sarkomvirus infizierten Küken durch freigesetzte Zytokine der Entzündungszellen ausgelöst wurde.

Einführung

Außerdem entstand die These, dass ein Tumor, der an der Stelle einer chronischen Irritation entstanden ist, auch beim Menschen oder anderen Säugetieren ein Ergebnis der persistierenden Einwirkung inflammatorischer Zytokine sein könnte. Diese wirken hierbei auf zelluläre Gene, die für die Aufrechterhaltung der Homöostase wichtig sind. Die Über- oder Unterexpression dieser Gene könnte zu Deregulierungen von Zellfunktionen führen, deren extremste Form die Transformation ist (Martins-Green *et al.* 1994).

Es wurde gezeigt, dass der proinflammatorische Transkriptionsfaktor Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) eine bedeutende Rolle in der Förderungsphase der Entwicklung eines Leberzellkarzinoms spielt (Pikarsky *et al.* 2004). Andere Untersuchungen wiesen darauf hin, dass NF- κ B für das Lipopolysaccharid(LPS)-induzierte Tumorwachstum erforderlich war (Luo *et al.* 2004) und dass LPS NF- κ B-abhängige Gene in Tumorzellen induzierte. Der Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) wurde im Rahmen dieser Untersuchungen als bedeutender Entzündungsmediator angesehen, der für das LPS-induzierte Tumorwachstum und die Aktivierung von NF- κ B verantwortlich gemacht wurde. Es konnte belegt werden, dass die Inhibition des NF- κ B in Tumorzellen entzündungsinduziertes Tumorwachstum, welches durch TNF- α vermittelt wurde, zur TRAIL*-vermittelten Tumorregression überführte (Lou *et al.* 2004).

Im injektionsassoziierten Sarkom konnten Hinweise für einen autokrinen Signalprozess gefunden werden. Dieser führte zur eigenständigen Produktion des Wachstumsfaktors PDGF (platelet-derived growth factor) durch die Tumorzellen. Der Nachweis von PDGF war bei Lymphozyten von injektionsassoziierten Entzündungen und Neoplasien positiv. Bei Lymphozyten einer nicht injektionsbedingten Entzündung und aus gesunden Lymphknoten konnte dagegen kein PDGF nachgewiesen werden (Dambach *et al.* 1996). Im Rahmen anderer Untersuchungen konnte bewiesen werden, dass eine Überexpression des PDGF und auch dessen Rezeptoren in der Zelllinie injektionsassoziiertes Sarkome vorhanden war. Hierbei wurde gezeigt, dass Imatinibmesylat die Interaktion zwischen PDGF und seinem Rezeptor blockieren kann. Daraus resultierten ein geringeres Wachstum der kultivierten Sarkomzellen und eine gesteigerte Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika (Carew *et al.* 1999; Katayama *et al.* 2004).

* Synonym Apo2 Ligand; ein Typ II Transmembranprotein der TNF-Familie

Einführung

Diese Ergebnisse stärkten die These, dass die Überexpression von PDGF und anderen Entzündungsmediatoren oder Wachstumsfaktoren einen Einfluss auf die Tumorentwicklung haben können.

Betrachtet man das Auftreten der zuvor beschriebenen Lokalreaktionen näher, so ist festzustellen, dass unterschiedliche maligne Tumoren auftraten. Hierbei ist das feline Fibrosarkom besonders aufgefallen, da dieses relativ häufig diagnostiziert wurde und dessen Prognose insgesamt ungünstig ist. Eine 1992 aufgestellte These (Hendrick *et al.* 1992) besagt, dass eine chronische Entzündung in Verbindung mit einer immunologischen Reaktion und der Anwesenheit von aluminiumhaltigen Adjuvans bei Katzen zur neoplastischen Transformation führen kann. Unter Berücksichtigung dieser These ist die Betrachtung der chronischen Entzündung nach Verabreichung einer Impfung von besonderem Interesse.

Ziel dieser Arbeit war daher, die Entstehung der Entzündungsreaktion an der Applikationsstelle und deren Entwicklung mittels systematischer histologischer Untersuchungen zu beschreiben. Die Untersuchungen erfolgten am Frettchen im Zeitraum von der ersten bis zur 24. Woche nach Verabreichung eines Impfstoffes. Zwecks Vergleichs kamen verschiedene Virusimpfstoffe zur Anwendung.

Außerdem wurde mittels Elektronenmikroskopie und extern durchgeführter induktiv gekoppelter Plasmaionen-Massenspektrometrie (ICP-MS) die Persistenz von aluminiumhaltigem Adjuvans an der Applikationsstelle verfolgt.

Die Wahl des Frettchens als Versuchstier erfolgte, da auch bei dieser Tierart die Bildung eines Fibrosarkoms im Bereich der Injektionsstelle beschrieben worden ist (Munday *et al.* 2003; Murray 1998).

2. Literaturübersicht

2.1 Historie der Impfung

Wie der Glaube an lebende Krankheitserreger, hat auch die aktuelle Praxis der Immunisierung ihre Wurzeln im Altertum (Kolmer 1915).

Das wahrscheinlich älteste klassische Beispiel der künstlichen Induktion einer Immunität ist die Inokulation mit Pockenviren, die aus den Bläschen eines an Pocken mild Erkrankten gewonnen wurden. Diese Behandlungsmethode bezeichnet man als „Variolation“, die in unterschiedlichen Formen im Osten im Altertum entstanden ist und 1721 von Lady Mary Wortley Montagu aus der Türkei nach England eingeführt wurde. Die Variolation war jedoch auch unter den gewählten Konditionen gefährlich. Daher gilt sie seit der Einführung von Jenners „Vakzination“ als obsolet (Parish 1965a).

Edward J. Jenner (*17.05.1749 Berkeley/Gloucestershire, †26.01.1823 Berkeley) (Gillispie 1981a) übertrug am 14. Mai 1796 Kuhpocken, die er aus den Bläschen einer an Kuhpocken erkrankten Melkerin entnommen hatte, auf einen Jungen, John Phipps, und führte damit seine erste Pockenschutzimpfung [Vakzination] durch (Jenner 1798; British Medical Journal 1896a).

Die erste Schutzimpfung gegen Pocken, von der ein Bericht existiert, vollzog jedoch Benjamin Jesty, ein Farmer von Yeominster in Dorsetshire. Er impfte 1774 seine Frau und seine zwei Söhne, 3 und 2 Jahre alt. Er selbst hatte zuvor Kuhpocken durch die Ansteckung von einer Kuh. Jestys Impfung war erfolgreich. Seine Familie blieb vor einer Infektion mit Pocken geschützt (British Medical Journal 1896b).

Die Vakzination gegen Pocken konnte die damals weit verbreitete Seuche zurückdrängen und bis heute als einzige Infektionskrankheit weltweit eliminieren.

Louis Pasteur (*27.12.1822 Dole, Jura/Frankreich, †28.09.1895 Château Villeneuve-l'Étang, Frankreich, nahe Paris) war Chemiker (Gillispie 1981b) und wandte sich 1877 erstmals dem Milzbrand zu. Er schwächte intakte Milzbranderreger durch mehrfache Kultivierung und thermische Behandlung ab und demonstrierte 1881 im Feldversuch, dass Tiere, die zuvor mit dem abgeschwächten Erreger infiziert worden waren, nicht mehr an der Infektion mit dem Originalerreger starben. Im Fall der Tollwut gelang es ihm, das Prinzip auf den Menschen zu übertragen. Zwecks Abschwächung des Erregers kultivierte Pasteur diesen in verschiedenen Tierarten und in *in-vitro*-Kulturen mit Gewebe des zentralen Nervensystems. Mit den so gewonnenen abgeschwächten Erregern führte er 1885 die erste erfolgreiche Impfung eines infizierten Kindes durch (Debré 1994).

Literaturübersicht

Pasteurs Methode der Prophylaxe gegen die Geflügelcholera, den Milzbrand und die Tollwut brachte die Verwendung von lebenden, attenuierten Mikroorganismen mit sich. Ein Fortschritt ergab sich als **Daniel Elmer Salmon** (*1850, †1914) und **Theobald Smith** (*1859, †1934) während Untersuchungen von 1884 bis 1886 zeigten, dass durch Hitze getötete Schweinecholera-Bazillen (eine Spezies der Salmonellen), Tauben gegen eine Konzentration des lebenden Bazillus immunisierte, die für nicht immunisierte Tauben fatal wäre (Parish 1965b).

Emil Adolf Behring (*15.03.1854 Hansdorf/Kreis Rosenberg, †31.03.1917 Marburg) (Gillispie 1981c) begann 1890 mit **Carl Fraenkel** (*1861, †1915) mit der Erforschung der künstlichen Immunisierung gegen die Diphtherie. Während Behring weiterhin im Institut von Robert Koch arbeitete, setzte Fraenkel seine Arbeit in Königsberg fort (Behring Nachdruck 1972). Außerdem arbeitete Behring mit **Shibasaburo Kitasato** (*1853, †1931) an der Immunisierung gegen Tetanus. Bei beiden Infektionskrankheiten ist es ihnen gelungen, sowohl infizierte Tiere zu heilen als auch gesunde so zu behandeln, dass sie nicht mehr an Diphtherie bzw. Tetanus erkrankten. Eine detaillierte Zusammensetzung ihres Tetanus-Heilserums wurde erstmals 1892 bekannt gegeben (Behring & Kitasato 1890; Behring und Wernicke 1892). Im darauf folgenden Jahr wurde die erste erfolgreiche Behandlung diphtheriekranker Kinder veröffentlicht (Behring *et al.* 1893). 1901 wurde Behring Träger des ersten Nobelpreises der Medizin und erhielt im selben Jahr den Adelstitel (Silverstein 1989a).

Der Bakteriologe **Léon Charles Albert Calmette** (*12.07.1863 Nizza, Frankreich, †29.10.1933 Paris, Frankreich) (Gillispie 1981d; Parish 1965c) entdeckte durch sein Forschungsprogramm die konjunktivale Reaktion auf Tuberkulin als eine diagnostische Hilfe. 1906 begann er zusammen mit seinem Mitarbeiter **Camille Guérin** (*1872, †1961) seine Arbeit mit dem Tuberkel-Bazillus, aus dem der Tuberkulose-Impfstoff B.C.G. (Bacille-Calmette-Guérin) resultierte. Erste klinische Versuche wurden 1921 mit lebend-B.C.G.-Impfstoff durchgeführt (Parish 1965c). Auf Calmette geht auch die Entwicklung des ersten antitoxischen Serums gegen Schlangengifte im Jahr 1894 zurück (Parish 1965d).

Der französische Tierarzt **Gaston Ramon** (*30.09.1886 Bellechaume, Frankreich, †08.06.1963 Paris, Frankreich), (Gillispie 1981e), entdeckte die Reaktion der Ausflockung für das Diphtherietoxin. Er untersuchte den Einfluss von Aluminiumverbindungen als Adjuvans in Impfstoffen (Silverstein 1989b).

Unter Verwendung von Formol und Hitze produzierte er Anatoxine und veröffentlichte deren Wirkungsprinzip und die Form der Verabreichung (Silverstein 1989b; Ramon 1950). In den folgenden Jahren machte Ramon die Immunität unterstützenden Substanzen (Adjuvantien) samt zugehöriger Impfstoffe bekannt (Panisset 1949).

2.2 Adjuvans – Steigerung der Effektivität und Verringerung der Dosis

In der Immunologie steht der Begriff Adjuvans (abgeleitet von *adiuvare*, *lat.*: unterstützen, helfen) für Substanzen, die bei Verabreichung mit einem Antigen mittels Injektion die Antwort des Immunsystems unspezifisch verstärken oder die Art der Immunantwort verändern. Als Adjuvantien werden vor allem Aluminiumverbindungen, Mineralöle, inaktivierte Mykobakterien, neuerdings auch immunstimulierende Komplexe (IS-COMs) und Liposomen verwendet.

Erste Arbeiten mit Adjuvantien

Gaston Ramon entdeckte während seiner Arbeit zur Gewinnung von Antidiphtherie- und Antitetanusseren mit Hilfe von Anatoxinen 1925 die Wirkung von Adjuvantien (Panisset 1949). 1926 wurde die unterstützende Wirkung von Aluminiumverbindungen in Impfstoffen auch von anderen Wissenschaftlern bewiesen (Glenny *et al.* 1926). Sie stellten eine Reihe von Diphtherietoxin-Präzipitaten her, in dem Kaliumaluminiumsulfat, kolloidales Eisen oder Wolframsäure zu einem unbearbeiteten Toxoid gegeben wurde. Das Toxoid und der jeweilige Zusatz bildeten ein Präzipitat, das zur Prüfung der immunogenen Aktivität Meerschweinchen verabreicht wurde. Meerschweinchen, die das Aluminiumpräzipitat erhalten hatten, zeigten im Vergleich zu Meerschweinchen, denen unbehandeltes Toxoid verabreicht worden war, einen signifikanten Anstieg der Immunantwort gegen das Toxoid (Glenny *et al.* 1926).

1934 präsentierten Forscher das Ergebnis einer Untersuchung über die Immunität gegen die Diphtherie in Virginia (McGinnes & Stebbins 1934). Bei dieser Untersuchung wurde belegt, dass durch die Verabreichung eines aluminiumhaltigen Toxoidimpfstoffes eine 95 %ige Immunitätsausbildung gegenüber einer 60 %igen und 70 %igen Immunität nach Verabreichung eines Toxin-Antitoxins erzielt werden konnte.

Literaturübersicht

Nach Verabreichung eines aluminiumhaltigen Toxoidimpfstoffes an Meerschweinchen wurde bis einschließlich der siebten Woche wöchentlich das Granulom entnommen, das sich nach der Impfung im Bereich der Injektionsstelle gebildet hatte. Die Granulome wurden in Salzlösung gebracht, die man unbehandelten Meerschweinchen verabreichte. Sechs Wochen nach Entnahme der Granulome und Verabreichung der daraus hergestellten Salzlösung, wurde eine Blutuntersuchung an beiden Tiergruppen vorgenommen. Sowohl bei den Tieren, die den Impfstoff als auch bei den Tieren, die die granulomhaltige Salzlösung erhalten hatten, konnte Antitoxin nachgewiesen werden (Harrison 1935).

Dieses Ergebnis erbrachte den Beweis für die Ausbildung der immunogenen Antwort über einen Zeitraum von sechs bzw. dreizehn Wochen. Außerdem wurde dadurch belegt, dass das entnommene Granulom Antigen enthielt (Harrison 1935).

Während einer Studie fiel die Granulombildung eine Woche nach intramuskulärer bzw. subkutaner Verabreichung zweier an Aluminium adsorbierten Diphtherietoxoid-Impfstoffen bei Meerschweinchen auf (Eisler & Eibl 1949). Der Unterschied der Impfstoffe bestand nur in der Teilchengröße des verwendeten Aluminiums. Bei der Untersuchung der Granulome bezüglich ihres Aluminiumgehaltes konnte festgestellt werden, dass bei den meisten Tieren die Abnahme des Aluminiumgehaltes im Depot in der ersten Woche am größten war. Eine nachweisbare zeitabhängige Abnahme des Aluminiumgehaltes nach dem siebten bis zum 30. Tag konnte nicht ermittelt werden. Histologische Untersuchungen der Applikationsstellen belegten, dass sich um den Impfstoff mit den größeren Aluminiumteilchen ein stärkerer, fester gefügter Demarkationswall bildete als um den Impfstoff mit kleineren Aluminiumteilchen. Dies geschah unabhängig von der Art der Verabreichung. Der Demarkationswall zeichnete sich durch eine wechselnd stark ausgebildete Kapsel aus jungem Bindegewebe aus. Die Kapsel war aus Fibrozyten, Histozyten, Lymphozyten und Leukozyten zusammengesetzt (Eisler & Eibl 1949).

Es konnte bewiesen werden, dass aluminiumhaltige Adjuvantien Entzündungsreaktionen an der Injektionsstelle verursachten und immunkompetente Zellen anlockten. Dadurch entstanden Granulome, die antikörperproduzierende Plasmazellen enthielten (White *et al.* 1955).

2.3 Die lokale Entzündungsreaktion nach einer Impfung

Nach einer Impfung reagiert der Organismus auf den mechanischen, den chemischen und den mikrobiologischen Reiz, der jeweils durch die Impfung zugefügt wurde. Hierbei wirken Einstich und eingebrachtes Volumen mechanisch, die Zusammensetzung des Arzneimittels chemisch und die eingebrachten Mikroorganismen, deren Bruchstücke oder Stoffwechselprodukte mikrobiologisch.

Eine Impfung löst daher sowohl die zelluläre als auch die humorale Immunreaktion aus (Koskela & Herva 1982; Edelman *et al.* 2004) und aktiviert das Komplementsystem (Baelmans *et al.* 2005). Dies äußert sich pathohistologisch in einer Ansammlung von mononukleären Zellen am Applikationsort (Perper 1976).

Immunpathologische Mechanismen bestimmen hierbei den Verlauf und die Schwere der Entzündung. Im Heilungsprozess folgt der Entzündung die Heilung. Abhängig von der Art, Stärke und Dauer des Entzündungsreizes kann die Heilung mit oder ohne Ausbildung eines Granulationsgewebes einhergehen.

Als Gewebsreaktion auf allergisch-infektiöse oder chronisch-entzündliche Prozesse können Granulome entstehen.

Das Granulom wurde als eine kompakte, organisierte Ansammlung von murenen mononukleären Phagozyten (Makrophagen und/oder Epitheloidzellen) definiert, die von zusätzlichen Befunden wie Nekrose oder von der Infiltration anderer Leukozyten begleitet sein können (Adams 1976). Granulome können einen für bestimmte Erkrankungen relativ charakteristischen histologischen Aufbau haben (Cohrs & Schulte 1952; Warren & Domingo 1970). Beispiel hierfür ist das Fremdkörpergranulom. Dieses kann sowohl durch körperfremdes (Gardner & Cummings 1933; Gardner 1937; Black & Epstein 1973) als auch durch körpereigenes Material (Bassermann 1969; Moriyama *et al.* 1984; Stahl & Ben-Asher 2000) hervorgerufen werden. Der Fremdkörperreiz verursacht eine granulomatöse Entzündung, die sich durch herdförmige Ansammlungen von Zellen mit oder ohne Nekrose darstellt. Er wird durch die Anwesenheit von Makrophagen und Riesenzellen charakterisiert (Davis 1963; Black & Epstein 1973).

2.3.1 Lokalreaktion beim Menschen

Eine Veröffentlichung von 2004 beschreibt zehn Fälle einer kutanen lymphozytären Hyperplasie nach Verabreichung von Impfstoffen im Zeitraum von 1993 bis 2003 (Lafaye *et al.* 2004). Die Veränderung zeigte sich äußerlich durch subkutan liegende Knoten, die sich ein bis achtzehn Monate nach der Impfung im Bereich der Injektionsstelle entwickelt hatten. Histologisch konnte in allen Fällen neben der lymphozytären Hyperplasie eine Fibrose und ein Granulom belegt werden. In sechs Fällen wurde Aluminium im Gewebe nachgewiesen. Die Entwicklung des Knotens war in jedem der Fälle benigne. Ein der Extraktion folgendes Rezidiv ist nicht aufgetreten (Lafaye *et al.* 2004). Andere Autoren haben ähnliche Läsionen nach einer Impfung beschrieben (Lanzafame & Micali 1993; Culora 1996; Stavrianeas *et al.* 2002; Maubec *et al.* 2005).

Als weitere Reaktion nach einer Impfung beim Menschen ist die makrophagische Myofasziitis beim Erwachsenen aufgefallen, die besonders in Frankreich beschrieben wurde. Diese wird durch eine Persistenz von Aluminiumhydroxid verursacht (Fischer *et al.* 2003; Shingde *et al.* 2005), welches als Adjuvans in manchen Impfstoffen enthalten ist. Inzwischen gibt es auch Berichte über betroffene Kleinkinder (Di Muzio *et al.* 2004; Rivas *et al.* 2005) und ein Baby (Sharma *et al.* 2004).

2.3.2 Lokalreaktion bei Tieren

1952 fiel die Granulombildung nach Verabreichung aluminiumhaltiger Impfstoffe bei Rindern auf. Sie war mit einer ausgeprägten Umfangsvermehrung verknüpft. Die Granulome zeigten im histologischen Schnitt ein eindeutiges Bild, so dass sie sicher von anderen raumfordernden Veränderungen unterschieden werden konnten (Cohrs & Schulte 1952).

1986 wurden bei 13 Hunden nach einer Impfung gegen Tollwut überpigmentierte, haarlose Stellen mit einer Größe von 2 bis 5 cm im Durchmesser im Injektionsbereich beschrieben. Sie entstanden zwischen drei und sechs Monaten nach der Impfung. Sie waren einheitlich mit einer Gefäßentzündung der Arteriolen der tiefen Haut und Unterhaut verbunden (Wilcock & Yager 1986).

Im Zeitraum von September 1988 bis Juni 1989 ist in den USA die nach Injektion vermehrt aufgetretene Entzündungsreaktion der Unterhaut bei Katzen aufgefallen (Hendrick & Dunagan 1991).

Literaturübersicht

Die Autoren vermuteten einen Zusammenhang zwischen dieser Reaktion und der Verabreichung von Impfstoffen, da sich die Entzündungen lokal nach Verabreichung derselben entwickelt hatten. Es wurden auch Proben von zwei Hunden untersucht, die nach einer Impfung gegen Tollwut eine gut abgegrenzte Entzündung der Unterhaut entwickelt hatten (Hendrick & Dunagan 1991).

Ab 1990 wurde in den zur Untersuchung eingesandten Proben von Katzen aus dem dorsalen Halsbereich und der Interskapularregion eine hohe Anzahl von Fibrosarkomen (FS) diagnostiziert (Hendrick & Goldschmidt 1991).

Bezogen auf alle eingesandten Biopsiematerialien von Katzen wurde von 1987 bis 1991 ein Anstieg der Prävalenz von FS der Katze um 61 % festgestellt (Hendrick *et al.* 1992). Diese hatten sich in Körperregionen entwickelt, die von Tierärzten routinemäßig für die Verabreichung von Impfstoffen verwendet wurden. Die Anzahl der FS, die den Bereichen zugeordnet wurden, die nicht für die Verabreichung von Injektionen herangezogen wurden, stieg im Untersuchungszeitraum nicht an, während bei der Anzahl der FS in den für die Injektion verwendeten Körperregionen ein signifikanter Anstieg ($p < 0,0007$) festgestellt wurde (Hendrick *et al.* 1992).

Da sowohl in den Makrophagen der Entzündungsreaktion (Hendrick & Dunagan 1991) als auch in den Makrophagen der Fibrosarkome (Hendrick & Goldschmidt 1991; Hendrick *et al.* 1992; Esplin *et al.* 1993; Madewell *et al.* 2001) Fremdmaterial diagnostiziert und durch Mikroanalytik Aluminium und Sauerstoff nachgewiesen werden konnte (Hendrick *et al.* 1992; Esplin *et al.* 1993), verstärkte sich der Verdacht, dass die Entwicklung der FS mit den Impfungen im Zusammenhang stand. Auch die Ergebnisse einer auf das Alter der Katzen bezogenen eindimensionalen Studie wies auf einen Zusammenhang zwischen der feline Leukosevirus(FeLV)- und der Tollwut-Impfung im Zwischenschulterblatt- und Halsbereich und der Entwicklung eines FS innerhalb eines Jahres nach der Impfung an der Injektionsstelle hin. Gleiches gilt für die Tollwut-Impfung im Bereich des Oberschenkels (Kass *et al.* 1993).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde angenommen, dass das Persistieren der Entzündung und die immunologischen Reaktionen im Zusammenhang mit der Anwesenheit des Aluminiumadjuvans im Bereich der Injektionsstelle die Katze prädisponiert, eine Störung in der Ordnung ihres Faserbindegewebes während der reparierenden Antwort auszubilden. Man nahm an, dass diese Störung in manchen Fällen zur neoplastischen Transformation dieser Zellen führt.

Literaturübersicht

Weiterhin wurde postuliert, dass die persistierende Entzündung, die Wundheilung oder beides in Verbindung mit den Komponenten eines Impfstoffes zur Proliferation von Fibroblasten und Myofibroblasten führen kann, die durch einen unbekanntem Mechanismus der neoplastischen Transformation unterliegen (Hendrick 1998).

Die einer Impfung zugeordneten FS (injektionsassoziierte Fibrosarkome; iFS) der Katze lagen im Gegensatz zu den nicht-injektionsassoziierten FS (niFS) überwiegend in der Subkutis (Doddy et al. 1996).

Es konnte bewiesen werden, dass die Entstehung des iFS nicht mit einer Infektion mit dem FeLV bzw. mit dem feline Sarkom Virus (FeSV) in Verbindung stand (Kass *et al.* 1993; Hendrick *et al.* 1994; Ellis *et al.* 1996).

Bei anderen Karnivoren [Frettchen (Munday *et al.* 2003; Murray 1998), Hunden (Vascellari *et al.* 2003), einem Löwen (*Panthera leo*) (Kinne & Tarello 2007) und einem Tiger (*Panthera tigris*) (Larsen & Carpenter 1999)] wurde ebenfalls über die Entstehung eines FS nach einer Impfung berichtet. Bei dem erwähnten Tiger wurde in der Nähe des FS in der Muskulatur eine abgebrochene Pfeilspitze isoliert, die nicht mit dem FS in Verbindung stand.

Murray (1998) berichtete unter anderem von wiederholter Beobachtung lokaler Reaktionen nach Verabreichung der Tollwutimpfung an Frettchen in seiner Praxis, die mit Ausnahme eines FS im Bericht jedoch nicht näher beschrieben werden.

Bei einem der iFS von Frettchen konnten mittels Elektronenmikroskopie ebenfalls intrazytoplasmatische Aggregate von dichtem, nadelähnlichem, kristallinen Material festgestellt werden (Munday *et al.* 2003).

Durch die histopathologische Untersuchung von 38 feline Tumoren nach einer Impfung wurden 25 Sarkome und 13 Granulome gefunden. Das Durchschnittsalter der Katzen mit Sarkom betrug 9 Jahre und das der Katzen mit Granulom 2 Jahre. Sowohl die Sarkome als auch die Granulome waren unter anderem durch das Vorkommen von mehrkernigen Riesenzellen und zentraler Nekrose gekennzeichnet. Zwei von einer Injektion unabhängige, aber morphologisch ähnliche Tumoren (Uterussarkom, okuläres Sarkom) gingen ebenfalls in die Untersuchung ein.

Literaturübersicht

Sie waren nach lang (ohne nähere Zeitangabe) anhaltender Pyometra und nach okulärem Trauma entstanden. Die Befunde dieser Untersuchungen wurden mit den Ergebnissen einer unabhängigen Studie (ohne Angabe des Autors) verglichen. Hierbei wurden drei 9-Monate alte Katzen und drei mehrjährige Katzen (10, 12 und 15 Jahre) mit ölhaltigem kommerziellem Impfstoff (ohne Angabe) geimpft und die Lokalreaktion untersucht. Die jungen Katzen reagierten mit einer ausgedehnten granulomatösen Entzündungsreaktion in der tiefen Dermis und in der Subkutis. Diese zeichnete sich durch die Anwesenheit zahlreicher Makrophagen, Lymphozyten, Plasmazellen, Mastzellen, eosinophiler Granulozyten und degranulierter Granulozyten aus. Es wurden auch Rückstände des öligen Adjuvans in zystenähnlichen Hohlräumen gefunden. Die älteren Katzen reagierten mit großen Mengen von Makrophagen mit schaumigem Zytoplasma, was als Folge der Phagozytose des öligen Materials angesehen wurde. Andere Entzündungszellen waren nur selten vertreten. Die immunhistochemische und enzymhistochemische Untersuchung konnten keinen Unterschied zwischen den Altersgruppen aufdecken. Basierend auf diesem Ergebnis wurde angenommen, dass junge und alte Katzen eine unterschiedliche spezifische Immunreaktivität besitzen. Der ähnliche Aufbau der Granulome und Sarkome sowie die altersbezogene Immunreaktion wurden als Hinweis darauf angesehen, dass die Progression der chronischen Entzündung zu der eines Tumors wechselte. Man folgerte, dass die chronische Entzündung und eine „altersbezogene Immundefizienz“ der Katzen bei der Entstehung der injektionsassoziierten Sarkome beteiligt sind (Jelínek 2003).

Eine Anfang der 90er Jahre durchgeführte Studie mit Kaninchen (Pineau *et al.* 1992) beschäftigte sich mit der Reaktion der Haut nach Verabreichung eines handelsüblichen kombinierten aluminiumhaltigen Impfstoffes gegen Tetanus, Pertussis und Poliomyelitis aus der Humanmedizin. Die Verabreichung des aluminiumhaltigen Impfstoffes erfolgte in jeweils halber Dosierung an sechs Stellen intrakutan. Die Stellen, an denen der Impfstoff appliziert worden war, wurden im Zeitraum von 8 bis 56 Tagen untersucht. Als Kontrolle diente die Verabreichung von sterilem destilliertem Wasser im gleichen Schema. Vom 8. bis zum 56. Tag konnten im Bereich der Impfstoffverabreichung Knoten in der Haut palpatorisch festgestellt werden. Bei einem Tier wurde auch 72 Tage nach der Impfung in der Histologie noch ein Knoten ermittelt, während bei den Kontrollen zu keinem Zeitpunkt eine Knotenbildung festgestellt werden konnte.

Literaturübersicht

Die Knoten setzten sich am achten Tag aus einem dichten entzündlichen Infiltrat zusammen, das hauptsächlich aus Lymphozyten, einigen polymorphkernigen Leukozyten und wenigen Histiocyten bestand. Am 56. Tag waren hauptsächlich ein- und mehrkernige Makrophagen zu finden. Diese wurden als Reaktion auf einen Fremdkörper interpretiert. Die Aluminiumkonzentration in allen Knoten war deutlich höher als im unbehandelten Gewebe. Es konnte eine enge Relation zwischen der Intensität des Infiltrates und der Aluminiumkonzentration festgestellt werden. Die Aluminiumkonzentration im Blutserum erhöhte sich während des Versuches nur unwesentlich (Pineau *et al.* 1992).

Nach einem Bericht von 1993 konnte bei einer Katze vier Monate nach einer intramuskulär verabreichten Impfung gegen Tollwut an der Injektionsstelle im Muskel ein fester Knoten palpirt werden, der in den folgenden vier Wochen schnelles Wachstum zeigte. Die histologische Untersuchung führte zur Diagnose eines Fibrosarkoms (Dubielzig *et al.* 1993).

1994 wurde das Ergebnis einer Untersuchung von 46 Sarkomen von Katzen, die sich nach einer Impfung entwickelt hatten, veröffentlicht. Diese 46 Sarkome teilten sich in 23 Fibrosarkome, 13 maligne fibröse Histiocytozytome, 7 Osteosarkome, 2 Rhabdomyosarkome und ein Chondrosarkom auf (Hendrick & Brooks 1994). Auch beim Frettchen konnten Fibrosarkome nach einer Impfung im Bereich der Injektionsstelle festgestellt werden (Munday *et al.* 2003; Murray 1998).

Im Jahr 2000 wurde ein Fallbericht veröffentlicht, der von einer Fibrosarkombildung bei einer 13-jährigen Katze nach der Verabreichung eines Arzneimittels handelt (Gagnon 2000). Das Fibrosarkom entwickelte sich zwei Monate nach der Gabe von einem Makrolid-Antibiotikum in Kombination mit einem nicht steroidalem Antiphlogistikum, die in einer Mischspritze zwischen den Schultern verabreicht worden waren. Der Katze waren aber auch ein und drei Monate vor dieser Kombination verschiedene Medikamente subkutan zwischen den Schulterblättern verabreicht worden. Hierzu zählten Ringer-Lösung, langwirksames Benzylpenizillin und Dexamethason sowie langwirksames Benzylpenizillin und Metoclopramid jeweils in Einzelinjektionen. Die letzte Impfung war sechs Jahre zuvor verabreicht worden.

Literaturübersicht

So hatte die Katze im Zeitraum von fünf Monaten vor Auftreten des Fibrosarkoms in derselben Körperregion sechs Injektionen erhalten. Die Autorin hält es für wahrscheinlich, dass das Mischen der Präparate zur Entstehung des Tumors beigetragen haben könnte (Gagnon 2000).

Valtulini *et al.* (2001, 2005) machten durch zwei Veröffentlichungen auf Granulome nach der Impfung bei Schweinen aufmerksam. In den dazu gehörigen Studien stellte man fest, dass laut Schlachthausberichten bei 10.394 (64,8 %) von insgesamt 16.039 Schweinen Granulome beobachtet worden waren. Diese Angaben wurden durch selbst durchgeführte Inspektionen der Landwirte bestätigt. Es konnte eine signifikante Beziehung zwischen der Entwicklung der Granulome und der Verwendung einer Impfstoffkombination, die $\text{Al}(\text{OH})_3$ (40 mg/2 ml Dosis) beinhaltetete, ermittelt werden. Im durchgeführten Feldversuch wurde belegt, dass die Tiere, denen Impfstoff mit Adjuvans jeweils links und rechts in den Halsmuskel verabreicht worden war, an beiden Stellen ein Granulom entwickelten. Gleiches gilt für Tiere, denen reines Adjuvans ohne Antigen appliziert worden war. Tiere, die einerseits das Adjuvans und andererseits Wasser erhalten hatten, entwickelten nur ein Granulom, während Tiere, denen nur Wasser injiziert worden war, an beiden Injektionsstellen kein Granulom entwickelten (Valtulini *et al.* 2005).

Zwei Gruppen von Javaneraffen (*Macaca fascicularis*) von jeweils zwölf Tieren wurden mit kombiniertem Diphtherie-Tetanus-Impfstoff immunisiert und die Injektionsstelle unter anderem am 85., 169. und 366. Tag untersucht. Die Zusammensetzung der beiden verwendeten Impfstoffe war bis auf das Adjuvans identisch. Das Adjuvans des einen Impfstoffes war $\text{Al}(\text{OH})_3$, das des anderen AlPO_4 . Der Verabreichung des Impfstoffes erfolgte über eine einmalige Injektion in den Oberschenkelmuskel (*Musculus quadriceps*). Am 85. Tag waren die Injektionsstellen histologisch durch mittelmäßige bis ausgeprägte Ansammlungen von Makrophagen und Infiltration lymphoider Zellen gekennzeichnet. Die Entzündungsreaktion war bei dem $\text{Al}(\text{OH})_3$ -haltigen Impfstoff stärker ausgeprägt als bei dem AlPO_4 -haltigen Impfstoff. Am 169. Tag wiesen Tiere, denen AlPO_4 -haltiger Impfstoff verabreicht worden war, nur noch eine lokale lymphoide Infiltration und/oder fokale Fibrose auf, aber keine infiltrierenden Makrophagen. Dreiviertel der Affen, die $\text{Al}(\text{OH})_3$ -haltigen Impfstoff erhalten hatten, zeigten eine ausgeprägte Läsion, die hauptsächlich aus Makrophagen bestand.

Literaturübersicht

Bei den Untersuchungen der Läsionen fielen eine große Anzahl degenerierter bzw. schwammähnlich veränderter Makrophagen auf. Der Nachweis von Aluminium in den Proben wurde bis zum 169. Tag nach der Impfung erfolgreich durchgeführt. Die Untersuchungen zeigten, dass die Gruppe nach Verabreichung des $\text{Al}(\text{OH})_3$ -haltigen Impfstoffes gegenüber der Gruppe, die AlPO_4 -haltigen Impfstoff erhalten hatte, eine vierfach höhere Aluminiumkonzentration in der reaktiven Zone aufwies. Die Konzentration des Phosphors nach Verabreichung des AlPO_4 -haltigen Impfstoffes korrelierte mit der Aluminiumkonzentration in der reaktiven Zone. In den Proben, die in der Nachbarschaft der reaktiven Zone entnommen worden waren, konnte in keiner der beiden Gruppen eine erhöhte Aluminiumkonzentration gemessen werden (Verdier *et al.* 2005).

2007 wurde eine Studie über die histopathologischen Veränderungen in der Subkutis von 14-16 Wochen alten Katzen nach Verabreichung von Mehrfachimpfstoffen veröffentlicht. In der Untersuchung wurden verschiedene Mehrfachimpfstoffe eingesetzt, die auf drei Gruppen verteilt waren:

Gruppe A erhielt Impfstoff ohne Adjuvans, Gruppe B erhielt Impfstoff mit öligem Adjuvans und der Impfstoff der Gruppe C war aluminiumhaltig in Kombination mit Quil A. Bei der Gruppe A zeigte sich zum Zeitpunkt der Untersuchung am 62. Tag eine fast vollständige Auflösung der Läsionen der Unterhaut, die bis zu diesem Zeitpunkt über Biopsien verfolgt worden waren. Bei den Impfstoffen der Gruppe B und C konnte nach 62 Tagen eine granulomatöse Entzündung ermittelt werden. Das jeweilige Adjuvans wurde intrazytoplasmatisch liegend vorgefunden. Die Entzündung war mit lokaler Fibrose und bei Gruppe B zusätzlich mit Bereichen von Kalzifikation verbunden.

Obwohl gegenüber der Untersuchung am 7. und 21. Tag nach der Impfung in allen Gruppen ein deutlicher Rückgang der Entzündung zu erkennen war, konnte im Vergleich zu den Gruppen A und B am 62. Tag bei der Gruppe C ein höherer allgemeiner Schweregrad der Entzündung festgestellt werden (Day *et al.* 2007).

Bei Betrachtung der beschriebenen Lokalreaktionen fällt auf, dass sowohl der Mensch als auch der Hund, die Katze, das Frettchen, das Kaninchen, das Schwein, das Rind und der Affe von Lokalreaktionen nach Verabreichung eines Impfstoffes betroffen sind.

Diese führen fallspezifisch zur Alopezie, Schwellung, Juckreiz, Granulom- und Narbenbildung oder im schlimmsten Fall zur Ausbildung eines malignen Tumors im Bereich der Injektionsstelle.

Die These, dass die chronische Entzündung in Verbindung mit einer immunologischen Reaktion und der Anwesenheit von aluminiumhaltigen Adjuvans zur neoplastischen Transformation führen kann (Hendrick *et al.* 1992), wurde durch die okuläre Sarkombildung nach Verletzung des Auges bestärkt (Dubielzig 1984; Dubielzig *et al.* 1990, Jelínek 2003). Daher ist die Betrachtung der chronischen Entzündung nach Verabreichung einer Impfung von besonderem Interesse.

Beim Menschen sind durch Impfungen ausgelöste tumoröse Veränderungen überwiegend benignen Natur. Im Gegensatz dazu ist die Ausbildung maligner Tumoren im Bereich der Injektionsstelle bei der Katze aufgefallen. Hierbei spielt das Fibrosarkom eine besondere Rolle, da dieses als maligne Veränderung bei der Katze häufig diagnostiziert wurde und dessen Prognose insgesamt ungünstig ist.

2.3.3 Abtransport der aluminiumhaltigen Adjuvantien

Bei der unter 2.3.2 beschriebenen Untersuchung an Neuseeländer Kaninchen erfolgten die Impfungen mit einem kombinierten aluminiumhaltigen Tetanus-Pertussis-Poliomyelitis-Impfstoff intradermal. Im Untersuchungszeitraum konnte kein wesentlicher Anstieg der Aluminiumkonzentration im Blut ermittelt werden. Dagegen lag die Aluminiumkonzentration im nach der Injektion entstandenen Knoten deutlich höher als im unbehandelten Gewebe der entsprechenden Lokalisation. Der Nachweis des Aluminiums im Knoten wurde bis zum 72. Tag erbracht (Pineau *et al.* 1992).

Hem (2002) stellte fest, dass aluminiumhaltige Adjuvantien *in vitro* von α -Hydroxycarboxylsäuren (Zitronensäure, Milchsäure und Apfelsäure), die in der interstitiellen Flüssigkeit enthalten sind, aufgelöst werden. Die Konzentration und die Temperatur der α -Hydroxycarboxylsäuren entsprachen beim Versuch *in vitro* jedoch nicht der typischen Konzentration und der Temperatur im Körper. In den anschließend durchgeführten Untersuchungen zeigte sich, dass sich amorphes AlPO_4 nach intramuskulärer Verabreichung schneller auflöste als kristallines Al(OH)_3 . Die Blutuntersuchung auf Aluminium über 28 Tage ergab, dass im Blut dreimal mehr Aluminium des AlPO_4 -haltigen Adjuvans auftrat als des Al(OH)_3 -haltigen (Hem 2002).

Literaturübersicht

Die Untersuchungen bestätigten Ergebnisse einer vorausgegangenen Studie. In dieser waren mit ^{26}Al markierte aluminiumhaltige Adjuvantien intramuskulär an Neuseeländer Kaninchen verabreicht worden. Die im Verlauf von 28 Tagen folgenden Blutuntersuchungen wiesen eine dreifach höhere Aluminiumkonzentration (^{26}Al im Blut) nach Verabreichung des AlPO_4 -haltigen Adjuvans auf als nach Verabreichung des $\text{Al}(\text{OH})_3$ -haltigen. Das Verteilungsprofil von ^{26}Al in den Geweben nach Verabreichung der beiden Adjuvantien war jedoch gleich (Nieren > Milz > Leber > Herz > Lymphknoten > Gehirn) (Flarend *et al.* 1997).

Die Auflösung *in vitro* und die Absorption *in vivo* führten zu der Schlussfolgerung, dass intramuskulär verabreichte aluminiumhaltige Adjuvantien durch α -Hydroxycarboxylsäuren in der interstitialen Flüssigkeit aufgelöst, im Gewebe verteilt, ins Blut absorbiert und über den Urin ausgeschieden werden (Hem 2002).

Nach unveröffentlichten Beobachtungen von Gupta *et al.* (1995) konnten bei Mäusen und Meerschweinchen aluminiumhaltige Adjuvantien bis zu einem Jahr nach subkutaner Verabreichung nachgewiesen werden.

Verdier *et al.* (2005) erbrachten den Nachweis von Aluminium an den Applikationsstellen bis zum sechsten Monat (169. Tag) nach intramuskulärer Verabreichung von aluminiumhaltigen Impfstoffen an Makaken.

Hamilton (2003) äußerte den Verdacht, dass schlecht abbaubare Adjuvantien, wie z. B. Aluminiumsalze und Mineralöl-Emulsionen, in Zellen, die der Linie der Makrophagen abstammen, akkumulieren können.

Vorausgegangene Untersuchungen von Hamilton *et al.* (2000) zeigten, dass viele schlecht abbaubare, korpuskuläre Adjuvantien wie Aluminiumhydroxid, Kalzium-Phosphat-Suspension, Silica (Kieselerde/Kieselsäure), durch Hitze inaktivierte Bakterien, aber auch Öl-in-Wasser-Emulsionen das Überleben von murinen Makrophagen in der Zellkultur und sogar die DNA-Synthese induzieren (Hamilton *et al.* 2000). Er folgerte in einer späteren Untersuchung, dass die über eine lange Zeitspanne gesteigerte Anzahl an mesenchymaler Zellen ein bedeutendes Merkmal der chronischen Läsion ist. Daraus resultiere, dass mehr Zellen im Bereich der Entzündung zur Verfügung stehen, um Entzündungsmediatoren zu produzieren. Außerdem wies Hamilton darauf hin, dass die Signalgebung so lange erfolgt, wie die Zelle - wahrscheinlich in Lysosomen - versucht, das resistente Material selbst oder dessen Zerfallsprodukte abzubauen (Hamilton 2003).

3. Eigene Untersuchungen

3.1 Material und Methoden

3.1.1 Versuchsaufbau

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Versuchsserien geplant. Innerhalb der ersten Versuchsserie sollten eventuelle Unterschiede in der Lokalreaktion nach subkutaner Verabreichung eines $\text{Al}(\text{OH})_3$ -haltigen Tollwut-Impfstoffes, einer $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Suspension und einer isotonischen Kochsalzlösung ermittelt werden.

Die zweite Versuchsserie diente der Erfassung von Unterschieden in der Lokalreaktion nach Verabreichung eines anderen $\text{Al}(\text{OH})_3$ -haltigen Tollwut-Impfstoffes, eines AlPO_4 -haltigen Tollwut-Impfstoffes, eines adjuvansfreien Tollwut-Impfstoffes und eines adjuvansfreien Staupe-Impfstoffes. Die Ergebnisse aus diesen Untersuchungen wurden mit den Ergebnissen der ersten Versuchsserie verglichen.

In der **ersten Versuchsserie** wurden 8 männliche und 6 weibliche Frettchen (*Mustela putorius furo*), die bereits einen Chip zur Identifizierung der Tiere erhalten hatten, einbezogen. Zur besseren Darstellung der Applikationsstelle und der Markierung wurden die Haare an den für die Injektion vorgesehenen Körperregionen durch Rasur entfernt. Die Tiere erhielten am Tag Null eine subkutane Injektion mit $\text{Al}(\text{OH})_3$ -haltigem Tollwut-Impfstoff oder eine $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Suspension im Bereich der rechten seitlichen Brustwand. Eine zweite Injektion mit isotonischer Kochsalzlösung wurde im Bereich der linken seitlichen Brustwand verabreicht. Die Markierung der lokalen Volumenzunahme im Gewebe nach Verabreichung der Injektion erfolgte durch das Auftragen eines Eosin-Farbrings (rot) auf die Haut, der alle zwei bis drei Tage aufgefrischt wurde. Die Untersuchung der Applikationsstellen fand in den Zeitabständen 1 Woche, 4 Wochen, 12 Wochen und 24 Wochen statt. Eine genaue Aufstellung der Untersuchungen gibt die Tabelle 3.1 wieder.

Eigene Untersuchungen

Tabelle 3.1 Aufbau der Versuchsserie 1 mit 14 Tieren

Gruppe	Tierzahl	Tag Null, re. Brustkorbwand	Tag Null, li. Brustkorbwand	US 1. Wo	US 4. Wo	US 12. Wo	US 24. Wo
1	8	Injektion Tollwut-Impfstoff 1* mit Al(OH) ₃ , (Virus fixe, Stamm G52)	Injektion NaCl-Lsg.*	2 Tiere	2 Tiere	2 Tiere	2 Tiere
2	4	Injektion Al(OH) ₃ -Suspension*	Injektion NaCl-Lsg.	1 Tier	1 Tier	1 Tier	1 Tier
3	2	unbehandelt	unbehandelt	1 Tier		1 Tier	

NaCl-Lsg.: isotonische Kochsalzlösung

US: Untersuchung

Wo: Woche

* Zusammensetzung siehe Tabelle 3.3

Die **zweite Versuchsserie** bestand aus 24 weiblichen, ca. einjährigen Frettchen (*Mustela putorius furo*) mit einem Körpergewicht zwischen 629 g und 1132 g. Die Markierung der Tiere zwecks Identifizierung erfolgte eine Woche vor Versuchsbeginn mit einem Chip. Auch bei diesen Tieren erfolgte eine Rasur im für die Injektion vorgesehenen Bereich. Am Tag Null erhielten sie eine subkutane Injektion mit Al(OH)₃- oder AlPO₄-haltigem Tollwut-Impfstoff im Bereich des rechten seitlichen Brustkorbs. Die zweite subkutane Injektion mit adjuvansfreiem Tollwut-Impfstoff wurde im Bereich der linken seitlichen Brustwand und eine adjuvansfreie Staupenimpfung im dorsalen rechten Lendenbereich verabreicht. Die Markierung der lokalen Volumenzunahme im Gewebe nach Verabreichung der Injektion erfolgte durch das Auftragen eines Farbrings aus Pikrinsäure (gelb). Dieser wurde in der achten Woche nach der Injektion aufgefrischt. Die Untersuchung der Applikationsstellen sowie die einer Probe aus dem unbehandelten Lendenbereich der linken Körperhälfte fanden in den Zeitabständen von einer Woche, 4 und 12 Wochen statt (siehe Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2 Aufbau der Versuchsserie 2 mit 24 Tieren

Gr.	Tierzahl	Tag Null re. seitr. BK	Tag Null li. seitr. BK	Tag Null re. Lende	US 1. Wo	US 4. Wo	US 12. Wo
1	12	Injektion Tollwut-Impfstoff 2* mit Al(OH) ₃ (Stamm Flury LEP)	Injektion Tollwut-Impfstoff 4* adjuvansfrei (Stamm Flury LEP)	Injektion Staupen-Impfstoff* adjuvansfrei (Stamm D84/1)	4 Tiere	4 Tiere	4 Tiere
2	12	Injektion Tollwut-Impfstoff 3* mit AlPO ₄ (Stamm Pasteur RIV)	Injektion Tollwut-Impfstoff 4 adjuvansfrei (Stamm Flury LEP)	Injektion Staupen-Impfstoff adjuvansfrei (Stamm D84/1)	4 Tiere	4 Tiere	4 Tiere

BK: Brustkorb

Gr.: Gruppe

US: Untersuchung

Wo: Woche

* Zusammensetzung siehe Tabelle 3.3

Tabelle 3.3 Zusammensetzung der Impfstoffe/Lösung/Suspension pro ml laut Herstellerangaben in der Gebrauchsinformation

Impfstoff / Lösung	Zulassung für	Immunologisch wirksame Bestandteile	wirksame und sonstige Bestandteile
Tollwut-Impfstoff 1	Hunde, Katzen, <u>Marderartige</u> , Pferde, Rinder und Schafe	Inaktiviertes Tollwutvirus (Virus fixe, Stamm G52), Glykoproteine ≥ 1 I.E. ¹ (Wirtssystem: Hamsterembryozelllinie)	Aluminium (als Hydroxid) 1,7 mg, Thiomersal, Spuren von Gentamicin
Tollwut-Impfstoff 2	Hunde, Katzen, Rinder und Pferde	Inaktiviertes Tollwut-Antigen, Stamm Flury LEP, ≥ 1 I.U. ² (Wirtssystem: BHK-Zellen)	Aluminiumhydroxid (3 % w/v) 2,1 mg, Thiomersal $\leq 0,1$ mg, Dinatriumhydrogenphosphat 1,07 mg, Kaliumhydrogenphosphat 0,13 mg, Natriumchlorid 5,6 mg und Phosphatpuffer ad 1 ml
Tollwut-Impfstoff 3	Hunde, Katzen, <u>Frettchen</u> , Rinder, Schafe und Pferde	Inaktiviertes Tollwutvirus, Stamm Pasteur RIV, mind. 3 Internationale Einheiten ³ (Wirtssystem: BHK-Zellen)	Aluminiumphosphat 0,66 mg, Thiomersal 0,1 mg
Tollwut-Impfstoff 4	Menschen	Inaktiviertes Tollwutvirus Stamm Flury LEP, $\geq 2,5$ I.E. ¹ (Wirtssystem: gereinigte Hühnerfibroblastenzellen)	Tris(hydroxymethyl)aminoethan, Natriumchlorid, Dinatriumedetat, Kaliumglutamat, Polygeline und Sucrose
Staupe-Impfstoff	Nerze und <u>Frettchen</u>	Attenuiertes Staupevirus, Stamm D 84/1, min. $10^{3,7}$ KID ₅₀ (Wirtssystem: SPF-Hühnerembryofibroblasten)	Spuren von Neomycinsulfat
Al(OH) ₃ -Suspension	dient in Impfstoffen als Adjuvans	-	Aluminiumhydroxid 1,8 mg, pH 5,9
isotonische (0,9 %) Kochsalzlösung	Menschen	-	9 g Natriumchlorid in 1000 ml Wasser zu Injektionszwecken

¹ internationale Einheit

² internationale Einheit gemäß Europäischem Arzneibuch

³ gemessen nach WHO-Standard

3.1.2 Untersuchungsmaterial

Untersucht wurde die Haut aus dem Bereich der 96 Applikationsstellen in unterschiedlichen Zeitabständen nach der Injektion und 23 Hautproben aus dem unbehandelten Lendenbereich der linken Körperhälfte sowie 2 Hautproben aus dem seitlichen Brustwandbereich von unbehandelten Tieren. Von den 96 untersuchten Proben stammten 72 aus dem Bereich des seitlichen Brustkorbes und 24 aus dem Bereich der rechten Lende. Eine Übersicht der Probenentnahmen zeigt die Tabelle 6.1 im Kapitel 6. Tabellen.

Eigene Untersuchungen

Die Hautproben der Versuchsserie 1 wurden in der Histologie mittels Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung, in der Elektronenmikroskopie (EM) und mit induktiv gekoppelter Plasmaionen-Massenspektrometrie (ICP-MS) untersucht. Die Untersuchung der Proben der Versuchsserie 2 fand nach HE-Färbung der Schnitte in der Histologie statt.

3.1.3 Vorbericht

Die in die Versuche einbezogenen Frettchen stammten aus der Zucht des Bundesinstitutes für Risikobewertung in Berlin. Die Tiere der Versuchsserie 1 (siehe 3.1.1) waren während des Versuchs auch dort untergebracht. Die Tiere der Versuchsserie 2 (siehe 3.1.1) wurden aus dem Bundesinstitut für Risikobewertung in Berlin bezogen und während des Versuchs im Paul-Ehrlich-Institut in Langen gehalten. Unabhängig vom Standort wurden die Frettchen geschlechtlich getrennt in Gruppen von 4-6 Tieren in Bodenhaltung gehalten. Die Bodenhaltung wurde mit Hängematten, Höhlen und Spielzeug angereichert. Die Ernährung wurde mit Katzen- und Hundefutter gesichert. Außerdem ergänzte die Gabe von Mäusen oder Geflügelfleisch 1-2 Mal pro Woche den Speiseplan. Wasser stand uneingeschränkt zur Verfügung. Nach Durchführung der allgemeinen Untersuchung wurde der Versuch wie unter 3.1.1 beschrieben aufgenommen. Die Probenentnahme erfolgte am euthanasierten Tier. Die Euthanasie erfolgte nach Verabreichung von Ketamin 10 %[®] und Xylazin[®] in Narkose. Sie wurde mit T61[®] durchgeführt.

Das Frettchen F6-0191 wurde am 30.07.2007 ohne vorherige Anzeichen einer Erkrankung tot aufgefunden. Die bei der Obduktion des Tieres erhobenen Befunde weisen auf ein Trauma ungeklärter Genese im cranialen Schädelbereich als Todesursache hin. Es konnten keine Anzeichen einer Erkrankung ermittelt werden. Da das Tier am 26. Tag nach Verabreichung der Impfstoffe verstorben ist, wurden die entsprechenden Hautproben in die Bewertung „4 Wochen nach Verabreichung der Injektionen“ aufgenommen.

3.1.4 Probenvorbereitung für die Detektion von Aluminium und zur Charakterisierung der Entzündung im Gewebe

3.1.4.1 Präparation für die Histologie

Der Fixierung der frischen Hautproben für die histopathologische Untersuchung diene 4%iges Formalin. Nach zwei Tagen folgte die Entwässerung über eine aufsteigende Ethanolreihe von 50 %, 70 %, 90 % und 96 %, 100 % Isopropanol sowie Xylol im Rondell Microm STP 120 bis zur Durchtränkung mit 60 °C warmem Paraffin. Danach wurden die Proben mit Hilfe des Gerätes Tissue Block System TBS 88 in Paraffin aufgeblickt, 2 µm dicke Schnitte hergestellt und diese auf Super Frost Plus[®] Objektträger aufgezogen. Für die Färbung wurden die Schnitte entparaffiniert, rehydriert, mit HE gefärbt, anschließend entwässert und mit Entellan Neu[®] eingedeckt.

Herstellung der Lösungen zur Entparaffinierung und HE-Färbung

Kardasewitsch-Lösung

50 ml Ammoniak 25 % und 200 ml Ethanol 70 % werden miteinander gemischt

Eosin G[®] Stammlösung

1000 ml entionisiertes Wasser werden mit 1000 ml Ethanol 96 % gemischt und 20 g Eosin G[®] hinzugefügt. Die Lösung wird bis zur vollständigen Auflösung des Eosins mittels Magnetrührer bei Zimmertemperatur gerührt.

Eosin G[®] Gebrauchslösung

Entionisiertes Wasser, Ethanol 96 % und die Eosin G[®]-Stammlösung werden im Verhältnis 1+1+1 gemischt und vor Gebrauch filtriert. Diesem Eosin-Ethanol-Stammlösung-Gemisch werden 400 µl Essigsäure pro 250 ml Gemisch unmittelbar vor der Färbung zugefügt.

Mayer's Hämatoxylin

50 g Kaliumalaun werden in 1000 ml entionisiertem Wasser bei Zimmertemperatur gelöst. Dieser Lösung wird 1 g Hämatoxylin kristallin hinzugefügt und ebenfalls gelöst. Anschließend werden 0,2 g Natriumiodat, 1 g Zitronensäure und 50 g Chloralhydrat zugefügt und bis zum vollständigen Auflösen aller Zutaten gerührt. Die Endfarbe der Lösung ist rotviolett. Die Farblösung kann über Monate aufbewahrt werden, muss aber vor Gebrauch filtriert werden.

Eigene Untersuchungen

HCL-Ethanol

576 ml Ethanol 96 %, 524 ml entionisiertes Wasser und 2,8 ml Salzsäure rauchend (37 %) werden miteinander gemischt.

Arbeitsschritte der HE-Färbung

Folgende Arbeitsschritte wurden zur Färbung der Schnitte vorgenommen:

<u>Entparaffinierung per Hand</u>	<u>Färbung per Hand</u>	<u>Eindecken</u>
1. 2 x 5 Min. Xylol	1. 4 Min. Mayer´s Hämatoxylin	Entellan Neu®
2. 2 x 5 Min. Propanol	2. 1 Sek. HCl-Ethanol	Deckglas
3. 5 und 4 Min. Ethanol 96 %	3. 5 Min. fließendes Leitungswasser	
3. 2 x 5 Min. Ethanol 70%	4. 2 Min. Eosin G® Gebrauchslösung	
5. 4 Min. Kardasewitsch	5. 2 x 3 Min. Ethanol 96 %	
6. 1 Sek. Seifenwasser	6. 2 x 2 Min. Propanol	
7. 5 Min. entionisiertes Wasser	7. 4 x 2 Min. Xylol	
8. 30 Sek. entionisiertes Wasser		

3.1.4.2 Präparation für die induktiv gekoppelte Plasmaionen-Massenspektrometrie

Die frischen Unterhautproben der Versuchsserie 1 wurden bei -20 °C eingefroren und bis zum Aufschließen ebenso gelagert. Der Aufschluss und die Untersuchung der Proben erfolgten extern im Hessischen Landeslabor in Kassel.

3.1.4.3 Präparation für die Elektronenmikroskopie

Der Fixierung der frischen Hautproben für die elektronenmikroskopische Untersuchung über Nacht diente 2,5%iges Glutaraldehyd in Phosphate Buffered Saline (PBS) ohne Kalzium (Ca) und Magnesium (Mg). Nach dreimaligem Spülen in PBS ohne Ca und Mg erfolgte eine Nachfixierung von 60 Minuten mittels einer 1%igen Osmiumtetroxid-Lösung und eine Entwässerung über eine aufsteigende Ethanolreihe von 30 %, 50 % und 70 % über jeweils 30 Minuten. Hinzu kam eine weitere Kontrastierung mit einer 2%igen Uranylazetatlösung in 70%igem Ethanol unter Lichtausschluss über 60 Minuten. Anschließend wurden die Proben 5 Minuten in 70%igem Ethanol gewaschen und in die aufsteigende Ethanolreihe über 80 %, 90 %, 96 % und Ethanol wasserfrei mit jeweils 30 Minuten Einwirkzeit überführt. Es folgte eine zweimalige Durchtränkung mit Propylenoxid über 15 Minuten. Der Austausch von Propylenoxid gegen Epon erfolgte verschlossen unter Bewegung über eine jeweils 60 minütige Einwirkzeit im Propylenoxid-Epongemisch im Verhältnis von 2+1, 1+1 und 1+2. Danach wurden die Proben unter Bewegung bei offenem Gefäß 60 Minuten in reinem Epon gehalten.

Eigene Untersuchungen

Nach Austausch des Epons erfolgte die weitere Einwirkung über Nacht unter Bewegung im geschlossenen Gefäß. Am nächsten Morgen wurden die Proben in frisches Epon überführt und über 48 Stunden bei 60 °C zwecks Polymerisierung des Epons aufbewahrt. 70 nm dünne Schnitte, die auf Kupfer- oder Nickelgrids aufgezogen und nach dem Trocknen nochmals mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert wurden, dienten der Beurteilung im Elektronenmikroskop.

Außerdem erfolgte die Präparation eines $\text{Al}(\text{OH})_3$ -haltigen und eines adjuvansfreien Tollwut-Impfstoffes für die Untersuchung im Elektronenmikroskop. Hierfür wurde aus Aqua destillata und Agarosepulver eine 3%ige Agaroselösung hergestellt und im Wasserbad bei 40 °C flüssig gehalten. Unter Verwendung eines Spitzglases konnten die festen Bestandteile der Impfstoffe durch Zentrifugieren im Sediment konzentriert und anschließend das Zentrifugat dekantiert werden. Das Sediment wurde mit flüssiger 3%iger Agarose im Verhältnis 1+1 durch Rühren vermischt. Durch Überführung des Reagenzröhrchens in Eis kam es zum Erstarren der Agarose. Als Transportmedium für das Agaroseblöckchen bis zum nächsten Schritt diente PBS ohne Ca und Mg. Die weitere Behandlung entsprach den Vorbereitungen der Hautproben ab dem Schritt „Nachfixierung in Osmiumtetroxid“ wie zuvor beschrieben.

Herstellung der Lösungen für die Kontrastierung der Eponschnitte

Uranylazetatlösung ca. 2 %

Gesättigtes Uranylazetat mit 70%igem Ethanol im Verhältnis 1+2 mischen und filtrieren. Dies ist die gebrauchsfertige Lösung, die zu jeder Kontrastierung frisch angesetzt wird.

Natronlauge (NaOH-Lösung)

Zwei Tropfen 10 M NaOH-Lösung in 10 ml Aqua destillata geben und mischen.

Bleizitratlösung 0,2 %

10 ml Aqua destillata mit 100 µl 10 M NaOH-Lösung mischen, 0,02 g Bleizitrat zugeben und vorsichtig schwenken bis sich das Bleizitrat aufgelöst hat. Die Lösung nicht stark bewegen und über Nacht stehen lassen. Die fertige Lösung muss klar und ohne Ausflockungen sein.

Arbeitsschritte für die Kontrastierung der Eponschnitte

Die Eponschnitte wurden fünf Minuten in einer 2%igen Uranylacetatlösung kontrastiert und anschließend in Aqua destillata gespült. Eine weitere Kontrastierung erfolgte in 0,2%iger Bleizitratlösung. Danach wurden sie zweimal mit Natronlauge und anschließend in Aqua destillata gespült.

3.1.4.4 Präparation für die energiedispersive Röntgenanalytik

Zwei der wie unter 3.1.4.3 hergestellten Proben für die Elektronenmikroskopie dienten auch der Untersuchung in der energiedispersiven Röntgenanalytik. Die Untersuchung wurde extern im Institut für Geowissenschaften, Facheinheit Mineralogie, Abteilung NanoGeoscience in der Goethe-Universität in Frankfurt am Main durchgeführt.

3.1.5 Statistische Analyse

Die Datenverwaltung, Auswertung und die Erstellung der graphischen Abbildungen im Rahmen der Präsentation der Ergebnisse erfolgte auf den Rechnern des Paul-Ehrlich-Institutes in Langen in den Fachbereichen Sicherheit veterinärmedizinischer Mittel und Tierschutz (Referat S3) sowie Biostatistik.

Die statistische Auswertung erfolgte explorativ und wurde mit PROC UNIVARIATE, PROC FREQ und PROC MIXED der SAS/STAT Software, Version 9.1, SAS System für Windows durchgeführt. Zur Beschreibung der Daten wurde der arithmetische Mittelwert (\bar{x}), die Standardabweichung (s), der Stichprobenumfang (n), der Median (x) und die Differenz der Mittelwerte berechnet.

Für normalverteilte Daten wurden zu den geschätzten Mittelwerten (Kleinst-Quadrate-Schätzer) 95%-Konfidenzintervalle angegeben. Dies gilt auch für die Mittelwertdifferenzen.

Die Entscheidung statistischer Tests erfolgte zum zweiseitigen Signifikanzniveau $\alpha = 5 \%$. Zusätzlich wird, wenn möglich, der exakte p-Wert angegeben. Für Paarvergleiche zwischen mehreren Behandlungsgruppen diente bei der induktiv gekoppelten Plasmaionen-Massenspektrometrie (ICP-MS) eine α -Adjustierung nach Bonferroni und bei der Histologie eine α -Adjustierung nach Holm.

Eigene Untersuchungen

Häufigkeiten (z.B. von Entzündungen) wurden mit Fishers exaktem Test verglichen und die Daten der ICP-MS explorativ mit einem gemischt-linearen Modell für wiederholte Messungen ausgewertet. „Injektion“ und „Untersuchungswoche“ dienten hierbei als feste Effekte. Da den Daten eher einer Log-Normalverteilung zu Grunde lag, wurden diese vor der Auswertung logarithmiert (\log_{10}).

Die Graphen wurden mit dem Programm GraphPad Prism (Version 4.03, 2005), die Säulen-Diagramme mit dem Programm Microsoft Graph-Diagramm erstellt.

Die Tabellen für die Gegenüberstellung qualitativer Merkmale, wie zum Beispiel das Vorhandensein von mehrkernigen Riesenzellen, Nekrosen oder Apoptosen, wurden mit dem Programm Microsoft Excel erzeugt.

3.2 Ergebnisse

3.2.1. Makroskopische Befunde

Nach der subkutanen Verabreichung der Impfstoffe bzw. der isotonischen Kochsalzlösung oder der $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Suspension konnte eine Volumenzunahme unter der Haut an der Applikationsstelle festgestellt werden, die 10-20 Minuten nach der Injektion nicht mehr sichtbar war. Am ersten Tag nach der Injektion wurde kein Unterschied zwischen den verschiedenen Applikationsstellen festgestellt. Alle Tiere waren in ihrem Verhalten und Allgemeinbefinden während des Untersuchungszeitraumes unauffällig.

Beginnend mit dem siebten Tag nach der Verabreichung konnte palpatorisch ein deutlicher Unterschied der Hautdicke an den Applikationsstellen der einzelnen Impfstoffe festgestellt werden. Die Zunahme an Volumen verteilte sich im Bereich der Applikationsstelle flächenhaft in der Haut. Während an der Stelle der verabreichten Kochsalzlösung im Vergleich zur unbehandelten Haut keine, bei der Staupeimpfung nur eine geringe Zunahme der Hautdicke festgestellt werden konnte, gab es an den Applikationsstellen des adjuvansfreien Tollwut-Impfstoffes eine mittelmäßige und an den aluminiumadjuvanshaltigen Applikationsstellen eine hochgradige Zunahme der Hautdicke. Ein Unterschied zwischen den Applikationsstellen mit $\text{Al}(\text{OH})_3$ -haltigem gegenüber AlPO_4 -haltigem Adjuvans konnte palpatorisch nicht ermittelt werden. Vier Wochen nach Durchführung der Injektion war es nicht mehr möglich, Unterschiede an den Applikationsstellen makroskopisch zu ermitteln. Die äußere Haut zeigte zu diesem Zeitpunkt weder eindeutig sichtbare noch palpierbare Auffälligkeiten.

3.2.2. Histopathologische Befunde

Im Rahmen der Untersuchung zeigten sich unterschiedliche Entzündungsreaktionen in den Proben zu den gegebenen Untersuchungszeitpunkten. Alle in der ersten Woche diagnostizierten Entzündungen, wurden als „akut“ oder „subakut“ eingestuft. Die Bezeichnung „chronisch“ erhielten Entzündungen, die in der vierten oder zwölften Woche diagnostiziert werden konnten.

3.2.2.1. Befunde der ersten Versuchsserie

Die Hautproben der Versuchsserie 1 (siehe 3.1.1) wurden eine Woche, vier, zwölf und vierundzwanzig Wochen nach der Impfung bzw. nach Verabreichung der $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Suspension und der Kochsalzlösung untersucht.

Ergebnisse

Die Beurteilung der histologischen Schnitte erfolgte nach Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung. Als Kontrollen dienten zwei Proben von unbehandelten Tieren.

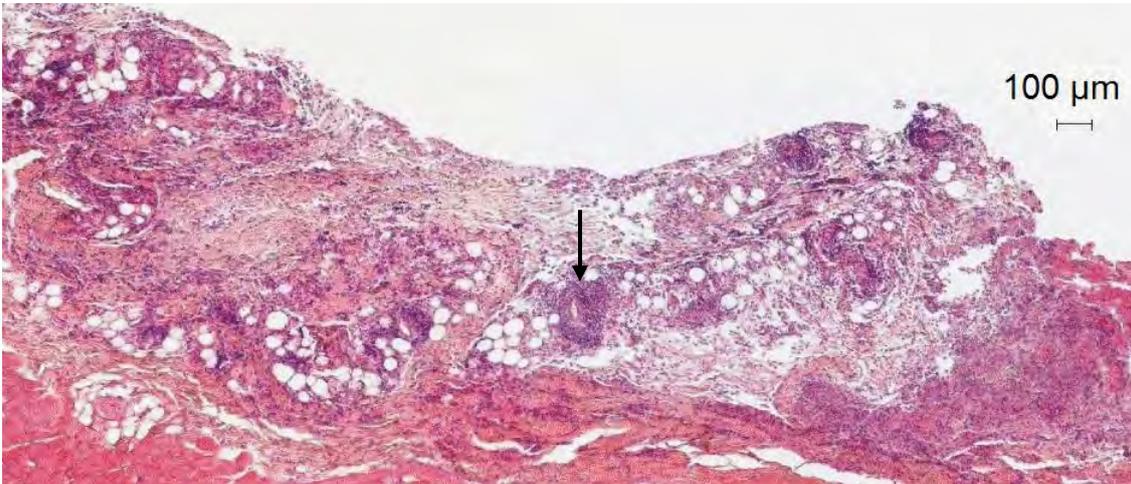


Bild 3.1 Eine Woche nach Verabreichung des Tollwut-Impfstoffes 1 [Virus fixe, Stamm G52 mit $\text{Al}(\text{OH})_3$] zeigte sich eine hochgradige akute diffuse pyogranulomatöse Entzündung mit perivaskulären Lymphozyteninfiltraten (Beispiel durch Pfeil markiert) und Granulationsgewebsbildung. Die Abbildung wurde aus zwei Einzelbildern zusammengesetzt. Probe D173, HE

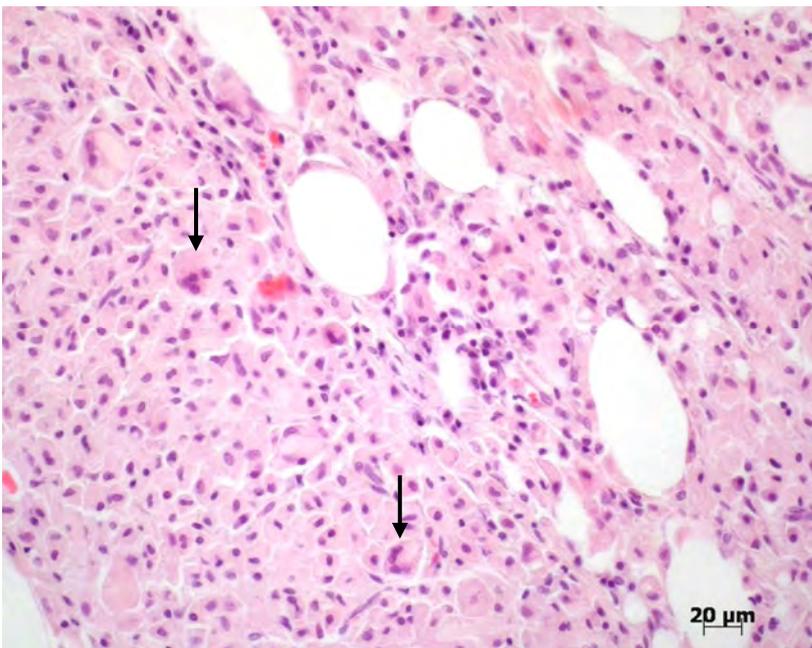


Bild 3.2

Die Abbildung zeigt eine hochgradige chronische diffuse granulomatöse Entzündung mit mehrkernigen Riesenzellen nach Verabreichung des Tollwut-Impfstoffes 1 [Virus fixe, Stamm G52 mit $\text{Al}(\text{OH})_3$] in der 4. Woche. Zwei mehrkernige Riesenzellen sind mit einem Pfeil markiert.

Probe D234/235, HE

Die Tabellen 3.4 bis 3.7 zeigen die Häufigkeit der histologischen Veränderungen und die Befunde der Versuchsserie 1 (Versuchsserie 2 siehe Tabellen 3.8 - 3.12). Hierbei entspricht die Größe des Entzündungsherd: ggr.: bis 0,1 mm, mgr.: > 0,1-2 mm und hgr.: > 2 mm bis 1 cm. Der Anteil der Zellen am Entzündungszellinfiltrat verhält sich wie folgt: vereinzelt 1 - 10 %, wenig 11 - 20 %, viele 21 - 40 % und überwiegend > 40 %.

Tabelle 3.4 Histopathologische Befunde in der Versuchsserie 1; 1.-24. Woche Tollwut-Impfstoff 1

Histo-Nr.	Tier-Nr.	Sex	Wo	Lokalisation*	E-Grad	Alter	Begrenzung	Ly	Mak	nG	eG	PZ	RZ	Fb	Fz	Apt	Nek	Befund
D 173	1	1.0	1	Fgw und Msk	hoch	akut	diffus	++	++	+++	-	(+)	nein	+	-	+	nein	hgr. akute diffuse pyo-granulomatöse Entzündung, perivaskuläre Lymphozyteninfiltration, Granulationsgewebsbildung
D 181	2	1.0	1	Fgw und Msk	mittel	subakut	diffus	++	+++	-	-	-	nein	+	-	+	nein	mgr. subakute diffuse granulomatöse Entzündung, Granulationsgewebsbildung
D 223	3	1.0	4	Fgw und Msk	hoch	chronisch	diffus	+	+++	-	-	++	ja	++	(+)	-	nein	hgr. chronische diffuse granulomatöse Entzündung
D 234	4	1.0	4	Fgw und Msk	hoch	chronisch	diffus	(+)	+++	-	-	++	ja	+	(+)	+	nein	hgr. chronische diffuse granulomatöse Entzündung, Granulationsgewebsbildung
D 274	5	1.0	12	Fgw und Msk	hoch	chronisch	diffus	(+)	+++	-	-	++	ja	++	+	+	nein	hgr. chronische diffuse granulomatöse Entzündung, Granulationsgewebsbildung
D 284	6	1.0	12	Fgw und Msk	hoch	chronisch	diffus	+	++	-	-	++	ja	++	(+)	+	nein	hgr. chronische diffuse granulomatöse Entzündung
D 666	7	0.1	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nein	-	-	-	nein	obB
D 676	8	0.1	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nein	-	-	-	nein	obB

Apt: Apoptose
 Fgw: (Unterhaut-)Fettgewebe
 Histo-Nr.: Histologie-Nummer
 mgr.: mittelgradig
 Nr.: Nummer
 1.0: männlich

eG: eosinophile Granulozyten
 Fz: Fibrozyten
 obB: ohne besonderen Befund
 Msk: (Haut-)Muskulatur
 PZ: Plasmazellen
 0.1: weiblich

E-Grad: Entzündungsgrad
 ggr.: geringgradig
 Ly: Lymphozyten
 Nek: Nekrose
 Sex: Geschlecht
 RZ: mehrkernige Riesenzellen * Fettdruck = Hauptlokalisation der Entzündung

Fb: Fibroblasten
 hgr.: hochgradig
 Mak: Makrophagen/Histiozyten
 nG: neutrophile Granulozyten
 Wo: Woche nach Injektion * Fettdruck = Hauptlokalisation der Entzündung

Abkürzungen Zellzahl
 (+) vereinzelt
 + wenig
 ++ viele
 +++ überwiegend

Tabelle 3.5 Histopathologische Befunde in der Versuchsserie 1; 1.-24. Woche Al(OH)₃-Suspension

Histo-Nr.	Tier-Nr.	Sex	Wo	Lokalisation*	E-Grad	Alter	Begrenzung	Ly	Mak	nG	eG	PZ	RZ	Fb	Fz	Apt	Nek	Befund
D 157	9	0.1	1	Fgw und Msk	gering	subakut	fokal	+	+	-	-	-	nein	+	-	-	nein	ggr. subakute fokale lymphohistiozytäre Entzündung; kleiner Anteil ggr. subakuter fokaler Fibroblastenproliferation
D 213	10	0.1	4	Fgw und Msk	hoch	chronisch	diffus	+	+++	-	-	-	ja	++	(+)	-	nein	hgr. chronische diffuse granulomatoöse Entzündung, Granulationsgewebsbildung
D 294	11	0.1	12	Fgw und Msk	mittel	chronisch	diffus	(+)	++	-	-	-	ja	+++	(+)	(+)	nein	mgr. chronische diffuse granulomatoöse Entzündung, Granulationsgewebsbildung
D 686	12	1.0	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nein	-	-	-	nein	obB

Apt: Apoptose eG: eosinophile Granulozyten E-Grad: Entzündungsgrad Fb: Fibroblasten Abkürzungen Zellzahl
 Fgw: (Unterhaut-)Fettgewebe Fz: Fibrozyten ggr.: geringgradig hgr.: hochgradig (+) vereinzelt
 Histo-Nr.: Histologie-Nummer obB: ohne besonderen Befund Ly: Lymphozyten Mak: Makrophagen/Histiozyten + wenig
 mgr.: mitte.gradig Msk: (Haut-)Muskulatur Nek: Nekrose nG: neutrophile Granulozyten ++ viele
 Nr.: Nummer PZ: Plasmazellen Sex: Geschlecht Wo: Woche nach Injektion +++ überwiegend
 1.0: männlich RZ: mehrkernige Riesenzellen * Fettdruck = Hauptlokalisation der Entzündung

Tabelle 3.6 Histopathologische Befunde in der Versuchsserie 1; 1.-24. Woche isotonische Kochsalzlösung

Histo-Nr.	Tier-Nr.	Sex	Wo	Lokalisation*	E-Grad	Alter	Begrenzung	Ly	Mak	nG	eG	PZ	RZ	Fb	Fz	Apt	Nek	Befund
D 160	9	0.1	1	Fgw.	gering	subakut	fokal	-	-	-	-	-	nein	+	-	-	nein	ggr. subakute fokale fibrosierende Entzündung
D 174	1	1.0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nein	-	-	-	nein	obB
D 182	2	1.0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nein	-	-	-	nein	obB
D 215	10	0.1	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nein	-	-	-	nein	obB
D 225	3	1.0	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nein	-	-	-	nein	obB
D 236	4	1.0	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nein	-	-	-	nein	obB
D 276	5	1.0	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nein	-	-	-	nein	obB
D 286	6	1.0	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nein	-	-	-	nein	obB
D 296	11	0.1	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nein	-	-	-	nein	obB
D 668	7	0.1	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nein	-	-	-	nein	obB
D 678	8	0.1	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nein	-	-	-	nein	obB
D 688	12	1.0	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nein	-	-	-	nein	obB

Apt: Apoptose
 Fgw: (Unterhaut-)Fettgewebe
 Histo-Nr.: Histologie-Nummer
 mgr.: mittelgradig
 Nr.: Nummer
 1.0: männlich

eG: eosinophile Granulozyten
 Fz: Fibrozyten
 obB: ohne besonderen Befund
 Msk: (Haut-)Muskulatur
 PZ: Plasmazellen
 0.1: weiblich

E-Grad: Entzündungsgrad
 ggr.: geringgradig
 Ly: Lymphozyten
 Nek: Nekrose
 Sex: Geschlecht
 RZ: mehrkernige Riesenzellen

Fb: Fibroblasten
 hgr.: hochgradig
 Mak: Makrophagen/Histiozyten
 nG: neutrophile Granulozyten
 Wo: Woche nach Injektion
 * Fettdruck = Hauptlokalisierung der Entzündung

Abkürzungen Zellzahl
 (+) vereinzelt
 + wenig
 ++ viele
 +++ überwiegend

Tabelle 3.7 Histopathologische Befunde in der Versuchsserie 1; 1. und 12. Woche unbehandelt

Histo-Nr.	Tier-Nr.	Sex	Wo	Lokalisation*	E-Grad	Alter	Begrenzung	Ly	Mak	nG	eG	PZ	RZ	Fb	Fz	Apt	Nek	Befund
D 169	13	1.0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nein	-	-	-	nein	obB
D 303	14	0.1	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nein	-	-	-	nein	obB

Apt: Apoptose
 Fgw: (Unterhaut-)Fettgewebe
 Histo-Nr.: Histologie-Nummer
 mgr.: mittelgradig
 Nr.: Nummer
 1.0: männlich
 eG: eosinophile Granulozyten
 Fz: Fibrozyten
 obB: ohne besonderen Befund
 Msk: (Haut-)Muskulatur
 PZ: Plasmazellen
 0.1: weiblich
 E-Grad: Entzündungsgrad
 ggr.: geringgradig
 Ly: Lymphozyten
 Nek: Nekrose
 Sex: Geschlecht
 RZ: mehrkernige Riesenzellen * Fettdruck = Hauptlokalisation der Entzündung
 Fb: Fibroblasten
 hgr.: hochgradig
 Mak: Makrophagen/Histiozyten
 nG: neutrophile Granulozyten
 Wo: Woche nach Injektion
 * Fettdruck = Hauptlokalisation der Entzündung
 Abkürzungen Zellzahl
 (+) vereinzelt
 + wenig
 ++ viele
 +++ überwiegend

Ergebnisse

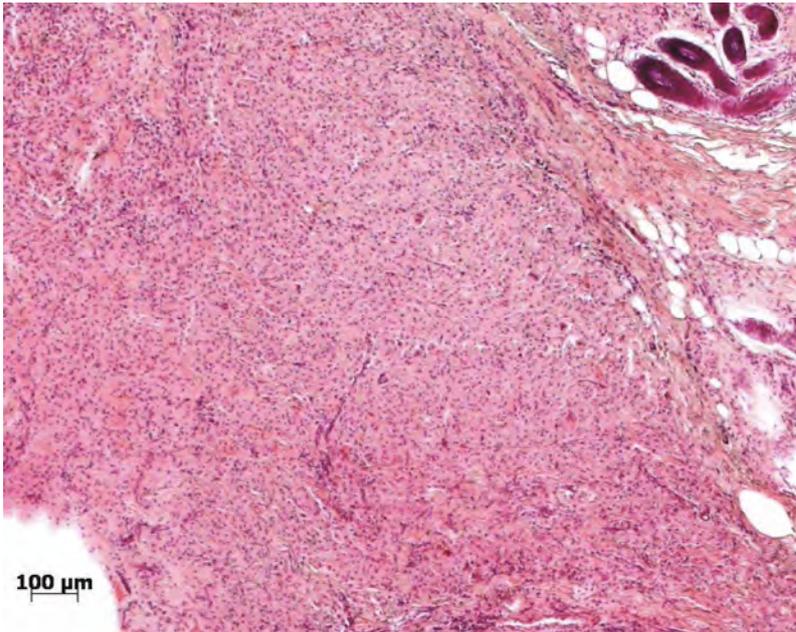


Bild 3.3

Die Abbildung zeigt eine hochgradige chronische diffuse granulomatöse Entzündung (mit mehrkernigen Riesenzellen) nach Verabreichung des Tollwut-Impfstoffes 1 [Virus fixe, Stamm G52 mit $\text{Al}(\text{OH})_3$] in der 12. Woche. Probe D274, HE

In der Versuchsserie 1 konnten nach Verabreichung des $\text{Al}(\text{OH})_3$ -haligen **Tollwut-Impfstoffes 1** (Bilder 3.1, 3.2 und 3.3) und nach Verabreichung der **$\text{Al}(\text{OH})_3$ -Suspension** (Bild 3.4) vergleichbare granulomatöse Entzündungsreaktionen nach einer, vier und zwölf Wochen beobachtet werden. In den Entzündungszellinfiltraten der 4. und 12. Woche nach Verabreichung der $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Suspension sowie in den Entzündungszellinfiltraten der 12. Woche nach Verabreichung des Tollwut-Impfstoffes 1 wurden mehrkernige Makrophagen nachgewiesen. Alle Proben (9/9) der 1. bis 12. Woche nach Verabreichung der $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Suspension und des Tollwut-Impfstoffes 1 wiesen lokale Entzündungszellinfiltrate auf. Die Entzündungsreaktionen konnten im Unterhautfettgewebe und/oder in der Hautmuskulatur nachgewiesen werden. Die Proben aus der 24. Woche nach Verabreichung des Tollwut-Impfstoffes 1 und der $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Suspension waren ohne besonderen Befund.

Ergebnisse

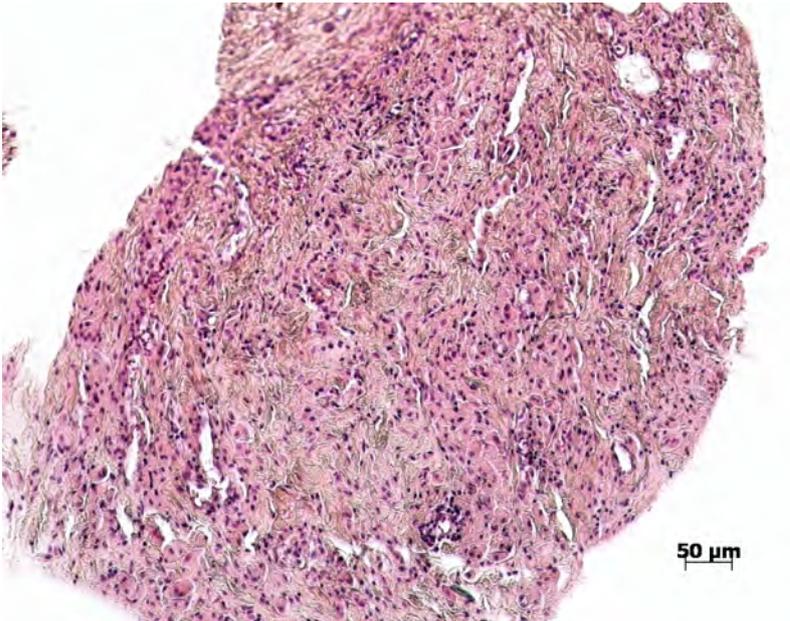


Bild 3.4

Zwölf Wochen nach Verabreichung der $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Suspension zeigte sich eine mittelgradige chronische diffuse granulomatöse Entzündung mit Granulationsgewebsbildung. Probe D294, HE

Die Untersuchung der Applikationsstellen nach Verabreichung der **isotonischen Kochsalzlösung** (siehe Tabelle 3.3) wurde an jeweils drei Tieren eine Woche, vier Wochen, zwölf und vierundzwanzig Wochen nach der Injektion durchgeführt. Bei den zwölf untersuchten Proben nach Verabreichung der isotonischen Kochsalzlösung konnte nur in einer Probe eine Woche nach Verabreichung der Injektion eine geringgradige fokale fibrosierende Entzündung festgestellt werden. Die anderen elf Proben wiesen keinen besonderen Befund auf.

Die Untersuchung der Hautproben der **unbehandelten Tiere** zu den Untersuchungszeitpunkten eine Woche (Bild 3.5) und zwölf Wochen (Bild 3.6) nach Versuchsbeginn erbrachte keinen besonderen Befund.

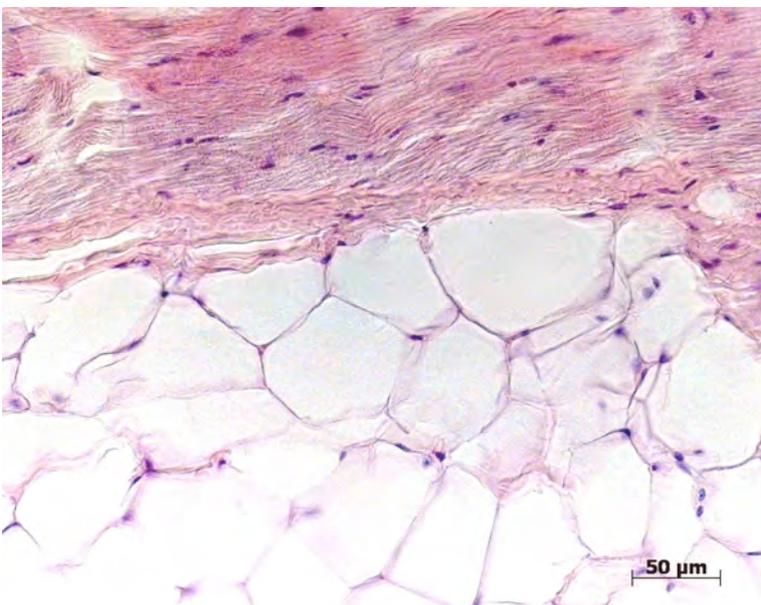


Bild 3.5

Die Hautprobe des unbehandelten Tieres war zum Untersuchungszeitpunkt in der ersten Woche ohne besonderen Befund. Probe D169, HE

Ergebnisse

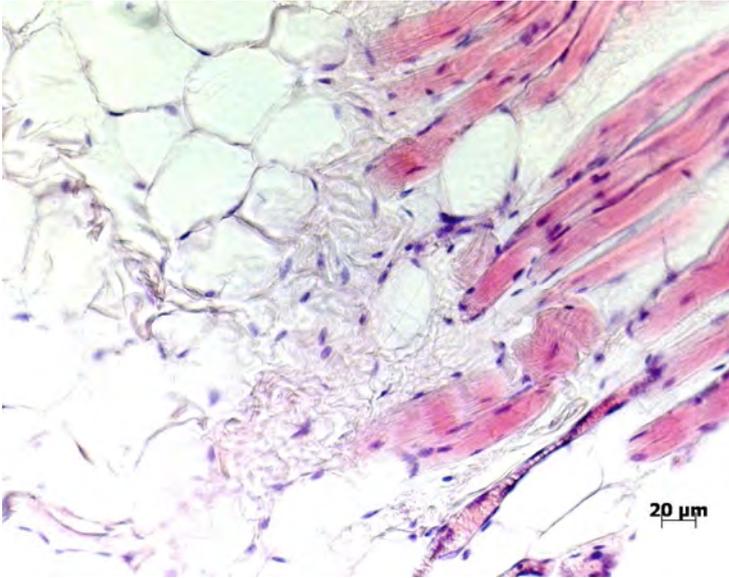


Bild 3.6

Die Hautprobe des unbehandelten Tieres war zum Untersuchungszeitpunkt in der 12. Woche ohne besonderen Befund. Probe D303, HE

3.2.2.2. Befunde der zweiten Versuchsserie

In der Versuchsserie 2 (siehe 3.1.1) wurden eine Woche, vier und zwölf Wochen nach der Impfung mit den Tollwut-Impfstoffen 2, 3 und 4 sowie dem Staupe-Impfstoff (siehe Tabelle 3.3) die Applikationsstellen und eine Probe aus dem unbehandelten linken Lendenbereich im histologischen Schnitt nach der Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE) untersucht (siehe Tabellen 3.8 bis 3.12).

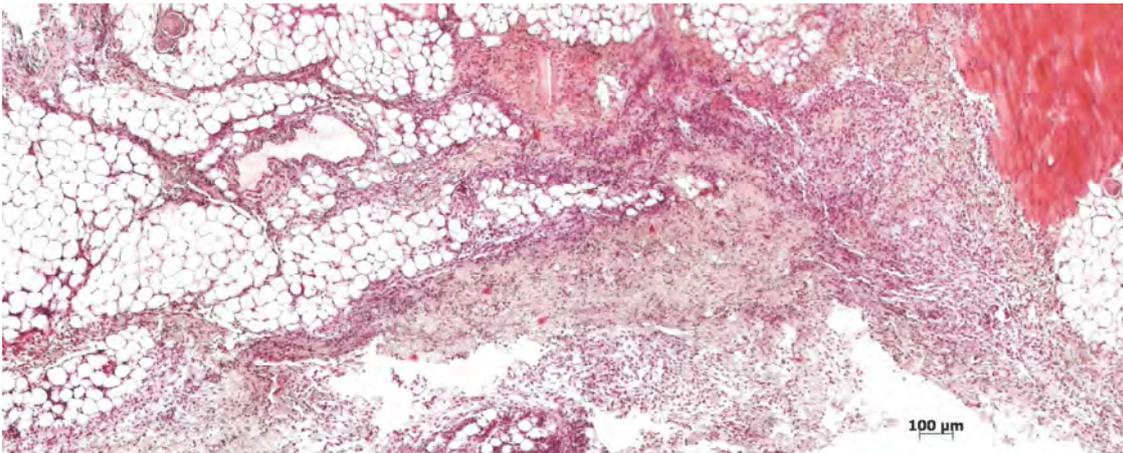


Bild 3.7

Eine Woche nach Verabreichung des Tollwut-Impfstoffes 2 [Stamm Flury-LEP mit $\text{Al}(\text{OH})_3$] konnte eine mittelgradige subakute diffuse lymphohistiozytäre Entzündung mit Granulationsgewebsbildung diagnostiziert werden. Die Abbildung wurde aus zwei Einzelbildern zusammengesetzt. Probe D918, HE

Ergebnisse

In den Proben nach Verabreichung des $\text{Al}(\text{OH})_3$ -haltigen **Tollwut-Impfstoffes 2** (Bilder 3.7 und 3.8) konnte in der 1., 4. und 12. Woche nach Verabreichung der Injektion eine Entzündung des granulomatösen Typs beobachtet werden. Nach Verabreichung des AlPO_4 -haltigen **Tollwut-Impfstoffes 3** (Bild 3.9) wurden überwiegend granulomatöse Entzündungen aber auch eitrige Entzündungen oder granulomatöse Entzündungen mit fokalen Eiterherden nachgewiesen. Die granulomatösen Entzündungen nach der Verabreichung der aluminiumadjuvanshaltigen Tollwut-Impfstoffe 2 und 3 waren mit den Entzündungen der Versuchsserie 1 nach Anwendung des $\text{Al}(\text{OH})_3$ -haltigen Tollwut-Impfstoffes 1 und der $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Suspension vergleichbar. Der Zellreichtum und die hohe Anzahl unterschiedlicher Zellen in den Entzündungsinfiltraten nach Verabreichung des Tollwut-Impfstoffes 3 setzten sich jedoch von den anderen Tollwut-Impfstoffen deutlich ab. Nach Verabreichung des Tollwut-Impfstoffes 2 konnten in der 12. Woche und nach Verabreichung des Tollwut-Impfstoffes 3 in der 4. und 12. Woche zum Teil mehrkernige Makrophagen in den Entzündungszellinfiltraten nachgewiesen werden. Alle Proben (24/24) bis zwölf Wochen nach Verabreichung der adjuvanshaltigen Tollwut-Impfstoffe 2 und 3 wiesen lokale Entzündungszellinfiltrate auf. Die Entzündungsreaktionen konnten im Unterhautfettgewebe und/oder in der Hautmuskulatur nachgewiesen werden.

Nach Verabreichung des adjuvansfreien **Tollwut-Impfstoffes 4** konnte im Zeitraum von einer bis zwölf Wochen in vier Proben (4/16) ein lokales Entzündungsinfiltrat nachgewiesen werden. Das Ausmaß der im Unterhautfettgewebe liegenden Entzündungszellinfiltrate war nach Verabreichung des adjuvansfreien Tollwut-Impfstoffes 4 geringer als nach Verabreichung der adjuvanshaltigen. In den Proben nach Verabreichung des adjuvansfreien Tollwut-Impfstoffes 4 wurden zu keinem Zeitpunkt mehrkernige Makrophagen nachgewiesen.

Die 23 Proben der **unbehandelten Haut** der Versuchsserie 2 waren zu keinem Zeitpunkt der Untersuchung auffällig.

Die Tabellen 3.8 bis 3.12 zeigen die Häufigkeit der histologischen Veränderungen und den Befund der Versuchsserie 2 (Versuchsserie 1 siehe Tabellen 3.4 - 3.7). Hierbei entspricht die Größe des Entzündungsherde: ggr.: bis 0,1 mm, mgr.: > 0,1-2 mm und hgr.: > 2 mm bis 1 cm. Der Anteil der Zellen am Entzündungszellinfiltrat verhält sich wie folgt: vereinzelt 1 - 10 %, wenig 11 - 20 %, viele 21 - 40 % und überwiegend > 40 %.

Ergebnisse

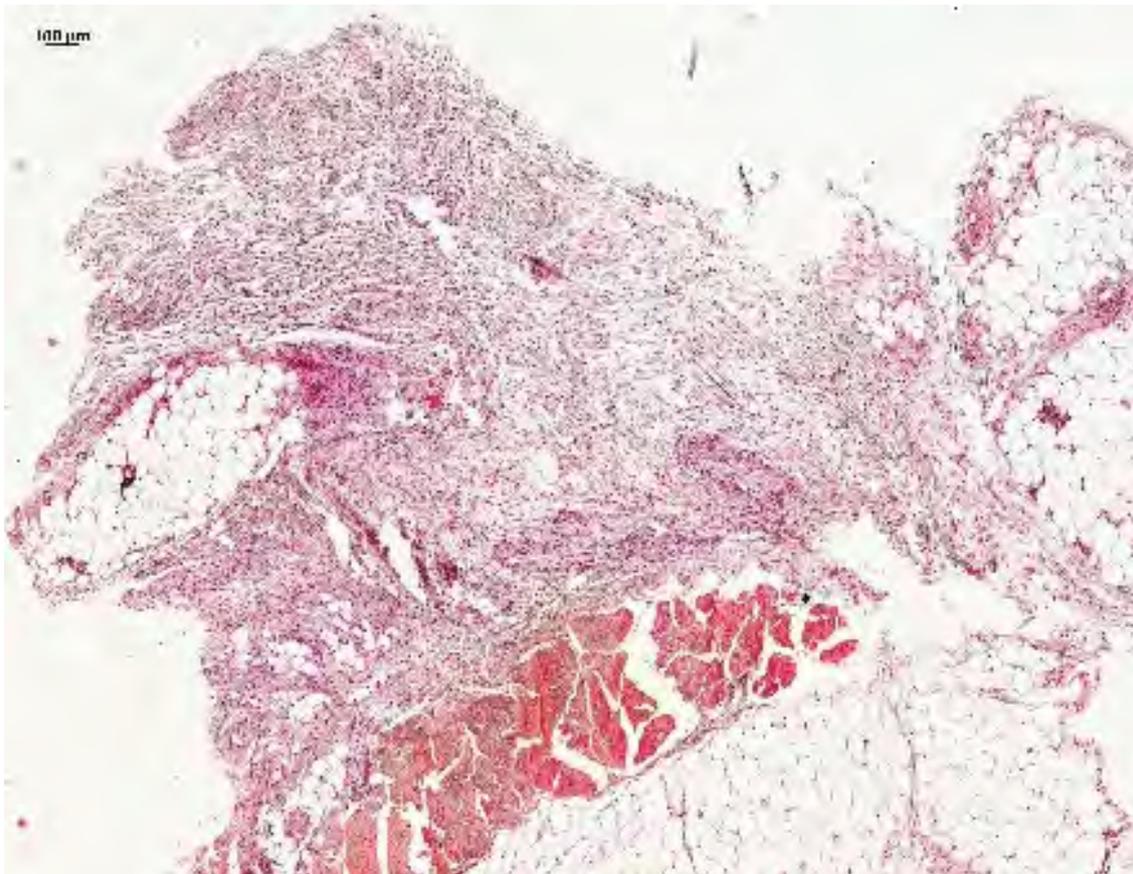


Bild 3.8

Vier Wochen nach Verabreichung des Tollwut-Impfstoffes 2 [Stamm Flury-LEP, mit $\text{Al}(\text{OH})_3$] zeigte sich eine mittelgradige chronische diffuse granulomatöse Entzündung. Die Abbildung wurde aus vier Einzelbildern zusammengesetzt. Probe E1, HE

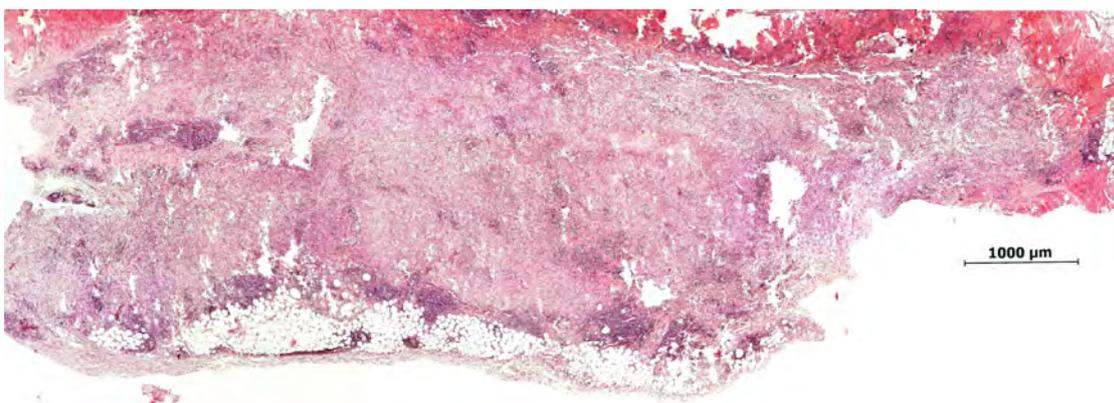


Bild 3.9

Vier Wochen nach Verabreichung des Tollwut-Impfstoffes 3 [Stamm Pasteur RIV mit AlPO_4] zeigte sich eine hochgradige chronische diffuse granulomatöse Entzündung mit fokalen Nekrosen und beginnender Granulationsgewebsbildung unter Beteiligung von Granulozyten. Die Abbildung wurde aus 18 Einzelbildern zusammengesetzt. Probe D983, HE

Tabelle 3.8 Histopathologische Befunde in der Versuchsserie 2; 1.-12. Woche Tollwut-Impfstoff 2 (alle Tiere weiblich)

Seite1/2

Histo-Nr.	Tier-Nr.	Wo	Lokalisation*	E-Grad	Alter	Begrenzung	Ly	Mak	nG	eG	PZ	RZ	Fb	Fz	Apt	Nek	Befund
D 918	71-0D05	1	Fgw. und Msk.	mittel	subakut	diffus	++	++	-	-	+	nein	+	-	-	nein	mgr. subakute diffuse lymphohistiozytäre Entzündung, Granulationsgewebsbildung
D 923	70-D797	1	Fgw.	gering	subakut	diffus	++	(+)	+	-	-	nein	(+)	-	-	nein	ggr. subakute diffuse lymphozytäre Entzündung, kleine fokale Eiterherde
D 928	6F-D372	1	Fgw.	mittel	subakut	diffus	+	(+)	-	-	-	nein	++	-	-	nein	mgr. subakute diffuse fibrosierende Entzündung
D 933	6F-D76E	1	Fgw.	mittel	akut	diffus	(+)	++	-	-	-	nein	+	-	+	ja	mgr. akute diffuse granulomatöse Entzündung, Granulationsgewebsbildung, diffuse Lymphozyteninfiltration im Fettgewebe, fokale Nekrose des Fettgewebes
D 959	6F-0191	4	Fgw.	mittel	chronisch	diffus	(+)	++	-	-	-	nein	+	++	-	nein	mgr. chronische diffuse granulomatöse Entzündung
E 1	6F-D315	4	Fgw.	mittel	chronisch	diffus	(+)	++	-	-	+	nein	+++	(+)	-	nein	mgr. chronische diffuse granulomatöse Entzündung

Apt: Apoptose
 Fgw: (Unterhaut-)Fettgewebe
 Histo-Nr.: Histologie-Nummer
 mgr.: mittelgradig
 Nr.: Nummer
 Wo: Woche nach Injektion
 eG: eosinophile Granulozyten
 Fz: Fibrozyten
 obB: ohne besonderen Befund
 Msk: (Haut-)Muskulatur
 PZ: Plasmazellen
 * Fettdruck = Hauptlokalisation der Entzündung
 E-Grad: Entzündungsgrad
 ggr.: geringgradig
 Ly: Lymphozyten
 Nek: Nekrose
 RZ: mehrkernige Riesenzellen
 Fb: Fibroblasten
 hgr.: hochgradig
 Mak: Makrophagen/Histiozyten
 nG: neutrophile Granulozyten
 Abkürzungen Zellzahl
 (+) vereinzelt
 + wenig
 ++ viele
 +++ überwiegend

Tabelle 3.8 Histopathologische Befunde in der Versuchsserie 2; 1.-12. Woche Tollwut-Impfstoff 2 (alle Tiere weiblich)
Fortsetzung Seite 2/2

Histo-Nr.	Tier-Nr.	Wo	Lokalisation*	E-Grad	Alter	Begrenzung	Ly	Mak	nG	eG	PZ	RZ	Fb	Fz	Apt	Nek	Befund
E 7	71-0EE7	4	Fgw.	mittel	chronisch	diffus	(+)	++	-	-	-	nein	++	-	-	nein	mgr. chronische diffuse granulomatöse Entzündung, perivaskuläre Lymphozyteninfiltration
E 90	70-E38A	4	Fgw. und Msk.	mittel	chronisch	diffus	(+)	+	-	-	+	nein	+++	-	+	nein	mgr. chronische diffuse fibrosierende Entzündung, kleiner Anteil granulomatöse Entzündung, Granulationsgewebsbildung
E 80	6F-D48F	12	Fgw.	gering	chronisch	diffus	-	+	-	-	-	nein	-	-	-	nein	ggr. chronische diffuse granulomatöse Entzündung
E 123	77-4FCE	12	Fgw.	hoch	chronisch	diffus	-	+++	-	-	-	ja	+	-	-	nein	hgr. chronische diffuse granulomatöse Entzündung
E 131	6F-CF9D	12	Fgw. und Msk.	mittel	chronisch	diffus	+	++	-	-	(+)	ja	+	-	-	nein	mgr. chronische diffuse granulomatöse Entzündung, perivaskuläre Lymphozyteninfiltration
E 148	71-0AB1	12	Fgw.	mittel	chronisch	diffus	(+)	++	-	-	-	ja	++	-	-	nein	mgr. chronische diffuse granulomatöse Entzündung, Granulationsgewebsbildung

Apt: Apoptose
 Fgw: (Unterhaut-)Fettgewebe
 Histo-Nr.: Histologie-Nummer
 mgr.: mittelgradig
 Nr.: Nummer
 Wo: Woche nach Injektion

eG: eosinophile Granulozyten
 Fz: Fibrozyten
 obB: ohne besonderen Befund
 Msk: (Haut-)Muskulatur
 PZ: Plasmazellen
 * Fettdruck = Hauptlokalisierung der Entzündung

E-Grad: Entzündungsgrad
 ggr.: geringgradig
 Ly: Lymphozyten
 Nek: Nekrose
 RZ: mehrkernige Riesenzellen

Fb: Fibroblasten
 hgr.: hochgradig
 Mak: Makrophagen/Histiozyten
 nG: neutrophile Granulozyten
 überwiegend

Abkürzungen Zellzahl
 (+) einzelt
 + wenig
 ++ viele
 +++ überwiegend

Tabelle 3.9 Histopathologische Befunde in der Versuchsserie 2; 1.-12. Woche Tollwut-Impfstoff 3

(alle Tiere weiblich)

Histo-Nr.	Tier-Nr.	Wo	Lokalisation*	E-Grad	Alter	Begrenzung	Ly	Mak	nG	eG	PZ	RZ	Fb	Fz	Apt	Nek	Befund
D 938	70-E4D0	1	Fgw.	mittel	akut	diffus	++	+	+++	-	-	nein	+	-	+++	ja	mgr. akute diffuse eitrige Entzündung, fokale Nekrose des Fettgewebes
D 943	71-103A	1	Fgw.	mittel	akut	diffus	+	+	++	-	-	nein	(+)	-	++	nein	mgr. akute diffuse pyo-granulomatöse Entzündung, Granulationsgewebsbildung
D 948	70-DF31	1	Fgw. und Msk.	mittel	subakut	diffus	Aufgrund von Präparationsartefakten nicht näher differenzierbar										mgr. subakute diffuse Entzündung, nicht näher differenzierbar
D 953	6F-DDEC	1	Fgw.	mittel	akut	diffus	+	+	+++	(+)	(+)	nein	+	-	(+)	ja	mgr. akute diffuse eitrige Entzündung, fokale Fettgewebsnekrose
D 977	70-D315	4	Fgw. und Msk.	hoch	chronisch	diffus	+	+++	-	-	++	nein	++	-	+	nein	hgr. chronische diffuse granulomatöse Entzündung, perivaskuläre Lymphozyteninfiltration, Granulationsgewebsbildung
D 983	6F-CF21	4	Fgw. und Msk.	hoch	chronisch	diffus	++	+++	+	(+)	+++	ja	+	-	++	ja	hgr. chronische diffuse granulomatöse Entzündung, fokale Nekrosen, beginnende Granulationsgewebsbildung

Apt: Apoptose

Fgw: (Unterhaut-)Fettgewebe

Histo-Nr.: Histologie-Nummer

mgr.: mittelgradig

Nr.: Nummer

Wo: Woche nach Injektion

eG: eosinophile Granulozyten

Fz: Fibrozyten

hgr.: ohne besonderen Befund

Msk: (Haut-)Muskulatur

PZ: Plasmazellen

* Fettdruck = Hauptlokalisierung der Entzündung

E-Grad: Entzündungsgrad

ggr.: geringgradig

Ly: Lymphozyten

Nek: Nekrose

RZ: mehrkernige Riesenzellen

Abkürzungen Zellzahl

(+) vereinzelt

+ wenig

++ viele

+++ überwiegend

Tabelle 3.9 Histopathologische Befunde in der Versuchsserie 2; 1.-12. Woche Tollwut-Impfstoff 3

Fortsetzung (alle Tiere weiblich)

Seite 2/2

Histo-Nr.	Tier-Nr.	Wo	Lokalisation*	E-Grad	Alter	Begrenzung	Ly	Mak	nG	eG	PZ	RZ	Fb	Fz	Apt	Nek	Befund
D 989	70-CDEE	4	Fgw.	hoch	chronisch	diffus	+	+++	-	-	++	nein	++	(+)	+	nein	hgr. chronische diffuse granulomatöse Entzündung, perivaskuläre Lymphozyteninfiltration, Granulationsgewebsbildung
D 995	6F-D0AC	4	Fgw. und Msk.	hoch	chronisch	diffus	++	++	+++	+	+++	ja	++	-	+	nein	hgr. chronische diffuse pyo-granulomatöse Entzündung, perivaskuläre Lymphozyteninfiltration, Granulationsgewebsbildung
E 98	70-D6C7	12	Fgw. und Msk.	hoch	chronisch	diffus	+	+++	-	-	++	nein	++	(+)	-	nein	hgr. chronische diffuse granulomatöse Entzündung, Granulationsgewebsbildung
E 107	71-0CD7	12	Fgw.	mittel	chronisch	diffus	+	++	-	-	+	nein	++	-	-	nein	mgr. chronische diffuse granulomatöse Entzündung, perivaskuläre Lymphozyteninfiltration, randständige Granulationsgewebsbildung
E 114	77-4DD0	12	Fgw.	mittel	chronisch	diffus	+	+++	-	-	+	nein	++	-	-	nein	mgr. chronische diffuse granulomatöse Entzündung
E 139	6F-D974	12	Fgw.	mittel	chronisch	diffus	-	++	-	-	-	-	++	-	-	nein	mgr. chronische diffuse granulomatöse Entzündung

Apt: Apoptose
 Fgw: (Unterhaut-)Fettgewebe
 Histo-Nr.: Histologie-Nummer
 mgr.: mittelgradig
 Nr.: Nummer
 Wo: Woche nach Injektion

eG: eosinophile Granulozyten
 Fz: Fibrozyten
 obB: ohne besonderen Befund
 Msk: (Haut-)Muskulatur
 PZ: Plasmazellen
 * Fettdruck = Hauptlokalisierung der Entzündung

E-Grad: Entzündungsgrad
 ggr.: geringgradig
 Ly: Lymphozyten
 Nek: Nekrose
 RZ: mehrkernige Riesenzellen

Fb: Fibroblasten
 hgr.: hochgradig
 Mak: Makrophagen/Histiozyten
 nG: neutrophile Granulozyten
 +++ überwiegend

Abkürzungen Zellzahl
 (+) vereinzelt
 + wenig
 ++ viele
 +++ überwiegend

Tabelle 3.10a Histopathologische Befunde in der Versuchsserie 2; 1. Woche Tollwut-Impfstoff 4 (alle Tiere weiblich)

Histo-Nr.	Tier-Nr.	Wo	Lokalisation	E-Grad	Alter	Begrenzung	Ly	Mak	nG	eG	PZ	RZ	Fb	Fz	Apt	Nek	Befund
D 919	71-0D05	1	Fgw.	gering	subakut	diffus	+	(+)	(+)	-	(+)	nein	++	-	-	nein	ggr. subakute fokale fibrosierende Entzündung
D 924	70-D797	1	Fgw.	gering	subakut	diffus	+	+	-	-	-	nein	++	-	-	nein	ggr. subakute fokale nicht eitrige Entzündung
D 930	6F-D372	1	Fgw.	gering	subakut	diffus	(+)	++	-	-	-	nein	+	-	-	nein	ggr. subakute diffuse granulomatöse Entzündung
D 935	6F-D76E	1	Fgw.	mittel	subakut	diffus	(+)	++	-	-	-	nein	+	-	-	nein	mgr. subakute diffuse granulomatöse Entzündung
D 940	70-E4D0	1	Fgw.	gering	subakut	fokal	+	(+)	-	-	-	nein	(+)	-	-	nein	ggr. subakute fokale lymphozytäre Entzündung
D 945	71-103A	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nein	-	-	-	nein	obB
D 950	70-DF31	1	Gefäße im Fgw.	gering	subakut	perivaskulär	+	-	-	-	-	nein	-	-	-	nein	ggr. perivaskuläre Lymphozyteninfiltration im Fettgewebe
D 955	6F-DDEC	1	Fgw.	gering	subakut	diffus	(+)	-	-	-	-	nein	++	-	-	nein	ggr. subakute fokale fibrosierende Entzündung

Apt: Apoptose
 Fgw: (Unterhaut-)Fettgewebe
 Histo-Nr.: Histologie-Nummer
 mgr.: mittelgradig
 Nr.: Nummer
 Wo: Woche nach Injektion
 eG: eosinophile Granulozyten
 Fz: Fibrozyten
 obB: ohne besonderen Befund
 Msk: (Haut-)Muskulatur
 PZ: Plasmazellen
 E-Grad: Entzündungsgrad
 ggr.: geringgradig
 Ly: Lymphozyten
 Nek: Nekrose
 RZ: mehrkernige Riesenzellen
 Fb: Fibroblasten Msk.
 hgr.: hochgradig
 Mak: Makrophagen/Histiozyten
 nG: neutrophile Granulozyten
 Abkürzungen Zellzahl
 (+) vereinzelt
 + wenig
 ++ viele
 +++ überwiegend

Tabelle 3.10b Histopathologische Befunde in der Versuchsserie 2; 4. Woche Tollwut-Impfstoff 4 (alle Tiere weiblich)

Histo-Nr.	Tier-Nr.	Wo	Lokalisation	E-Grad	Alter	Begrenzung	Ly	Mak	nG	eG	PZ	RZ	Fb	Fz	Apt	Nek	Befund
D 961	6F-0191	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nein	-	-	-	nein	obB
D 979	70-D315	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nein	-	-	-	nein	obB
D 985	6F-CF21	4	Fgw.	gering	chronisch	perivaskulär	+	-	-	-	-	nein	-	-	-	nein	ggr. chronische perivaskuläre Lymphozyteninfiltration
D 991	70-CDEE	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nein	-	-	-	nein	obB
D997	6F-D0AC	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nein	-	-	-	nein	obB
E 4	6F-D315	4	Fgw.	gering	chronisch	fokal	+	-	-	-	-	nein	+	-	-	nein	ggr. chronische fokale fibrosierende Entzündung
E 9	71-0EE7	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nein	-	-	-	nein	obB
E 94	70-E38A	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nein	-	-	-	nein	obB

Apt: Apoptose eG: eosinophile Granulozyten E-Grad: Entzündungsgrad Fb: Fibroblasten Abkürzungen Zellzahl
 Fgw: (Unterhaut-)Fettgewebe Fz: Fibrozyten ggr.: geringgradig hgr.: hochgradig (+) vereinzelt
 Histo-Nr.: Histologie-Nummer obB: ohne besonderen Befund Ly: Lymphozyten Mak: Makrophagen/Histiozyten + wenig
 mgr.: mittelgradig Msk: (Haut-)Muskulatur Nek: Nekrose nG: neutrophile Granulozyten ++ viele
 Nr.: Nummer PZ: Plasmazellen RZ: mehrkernige Riesenzellen +++ überwiegend
 Wo: Woche nach Injektion

Tabelle 3.10c Histopathologische Befunde in der Versuchsserie 2; 12. Woche Tollwut-Impfstoff 4

(alle Tiere weiblich)

Histo-Nr.	Tier-Nr.	Wo	Lokalisation	E-Grad	Alter	Begrenzung	Ly	Mak	nG	eG	PZ	RZ	Fb	Fz	Apt	Nek	Befund
E 84	6F-D48F	12	Gefäße im Fgw.	gering	chronisch	vaskulär	-	-	-	-	-	nein	-	-	-	nein	aktivierte Gefäße, sonst obB
E 102	70-D6C7	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nein	-	-	-	nein	obB
E 110	71-0CD7	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nein	-	-	-	nein	obB
E 118	77-4DD0	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nein	-	-	-	nein	obB
E 126	77-4FCE	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nein	-	-	-	nein	obB
E 134	6F-CF9D	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nein	-	-	-	nein	obB
E 142	6F-D974	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nein	-	-	-	nein	obB
E 152	71-0AB1	12	Fgw.	gering	chronisch	fokal	+	(+)	-	-	-	nein	-	-	-	nein	ggr. chronische fokale lymphohistiozytäre Entzündung

Apt: Apoptose
 Fgw: (Unterhaut-)Fettgewebe
 Histo-Nr.: Histologie-Nummer
 mgr.: mittelgradig
 Nr.: Nummer
 Wo: Woche nach Injektion

eG: eosinophile Granulozyten
 Fz: Fibrozyten
 obB: ohne besonderen Befund
 Msk: (Haut-)Muskulatur
 PZ: Plasmazellen

E-Grad: Entzündungsgrad
 ggr.: geringgradig
 Ly: Lymphozyten
 Nek: Nekrose
 RZ: mehrkernige Riesenzellen

Fb: Fibroblasten
 hgr.: hochgradig
 Mak: Makrophagen/Histiozyten
 nG: neutrophile Granulozyten

Abkürzungen Zellzahl
 (+) vereinzelt
 + wenig
 ++ viele
 +++ überwiegend

Tabelle 3.11a Histopathologische Befunde in der Versuchsserie 2; 1. Woche Staupen-Impfstoff (alle Tiere weiblich)

Histo-Nr.	Tier-Nr.	Wo	Lokalisation	E-Grad	Alter	Begrenzung	Ly	Mak	nG	eG	PZ	RZ	Fb	Fz	Apt	Nek	Befund
D 920	71-0D05	1	Fgw.	gering	subakut	diffus	+	(+)	-	-	-	nein	(+)	-	-	nein	ggr. subakute diffuse lymphozytäre Infiltration des Fettgewebes
D 925	70-D797	1	Fgw.	gering	subakut	diffus	(+)	(+)	-	-	-	nein	+	-	-	nein	ggr. subakute fokale fibrosierende Entzündung
D 929	6F-D372	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nein	-	-	-	nein	obB
D 934	6F-D76E	1	Fgw.	gering	subakut	diffus	+	+	-	-	(+)	nein	(+)	(+)	-	nein	ggr. subakute diffuse lymphohistiozytäre Entzündung; nur Randbereich der Entzündung
D 939	70-E4D0	1	Fgw.	gering	subakut	perivaskulär	+	-	-	-	-	nein	-	-	-	nein	ggr. subakute perivaskuläre Lymphozyteninfiltration
D 944	71-103A	1	Fgw.	mittel	subakut	diffus	++	(+)	-	-	-	nein	++	++	-	nein	mgr. subakute diffuse fibrosierende Entzündung, perivaskuläre Lymphozyteninfiltration, Granulationsgewebsbildung
D 949	70-DF31	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nein	-	-	-	nein	obB
D 954	6F-DDEC	1	Fgw.	gering	subakut	diffus	+	-	-	-	-	nein	+	-	-	nein	ggr. subakute diffuse fibroblastische Entzündung, ggr. perivaskuläre Lymphozyteninfiltration

Apt: Apoptose
 Fgw: (Unterhaut-)Fettgewebe
 Histo-Nr.: Histologie-Nummer
 mgr.: mittelgradig
 Nr.: Nummer
 Wo: Woche nach Injektion
 eG: eosinophile Granulozyten
 Fz: Fibrozyten
 obB: ohne besonderen Befund
 Msk: (Haut-)Muskulatur
 PZ: Plasmazellen
 E-Grad: Entzündungsgrad
 ggr.: geringgradig
 Ly: Lymphozyten
 Nek: Nekrose
 nG: nekrotische Riesenzellen
 E-Grad: Entzündungsgrad
 ggr.: geringgradig
 Ly: Lymphozyten
 Nek: Nekrose
 nG: nekrotische Riesenzellen
 Fb: Fibroblasten
 Msk.: hochgradig
 Mak: Makrophagen/Histiozyten
 neutrophile Granulozyten
 überwiegend
 Abkürzungen Zellzahl
 (+) vereinzelt
 + wenig
 ++ viele
 +++ überwiegend

Tabelle 3.11b Histopathologische Befunde der Versuchsserie 2; 4. Woche Staupe-Impfstoff (alle Tiere weiblich)

Histo-Nr.	Tier-Nr.	Wo	Lokalisation	E-Grad	Alter	Begrenzung	Ly	Mak	nG	eG	PZ	RZ	Fb	Fz	Apt	Nek	Befund
D 960	6F-0191	4	(Fgw.)	-	-	-	(+)	-	-	-	-	nein	-	-	-	Nein	obB (nur zwei fokale ggr. lymphozytäre Infiltrationen im Fettgewebe)
D 978	70-D315	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nein	-	-	-	Nein	obB
D 984	6F-CF21	4	Fgw.	gering	chronisch	fokal	+	-	-	-	-	nein	-	-	-	Nein	ggr. chronische fokale lymphozytäre Infiltration im Fettgewebe; an zwei Stellen perivaskulär
D 990	70-CDEE	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nein	-	-	-	Nein	obB
D 996	6F-D0AC	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nein	-	-	-	Nein	obB
E 2	6F-D315	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nein	-	-	-	Nein	obB
E 8	71-0EE7	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nein	-	-	-	Nein	obB
E 91	70-E38A	4	Fgw.	gering	chronisch	fokal	+	-	-	-	-	nein	-	-	-	Nein	ggr. chronische fokale lymphozytäre Entzündung

Apt: Apoptose eG: eosinophile Granulozyten E-Grad: Entzündungsgrad Fb: Fibroblasten Abkürzungen Zellzahl
 Fgw: (Unterhaut-)Fettgewebe Fz: Fibrozyten ggr.: geringgradig hgr.: hochgradig (+) vereinzelt
 Histo-Nr.: Histologie-Nummer obB: ohne besonderen Befund Ly: Lymphozyten Mak: Makrophagen/Histiozyten + wenig
 mgr.: mittelgradig Msk: (Haut-)Muskulatur Nek: Nekrose nG: neutrophile Granulozyten ++ viele
 Nr.: Nummer PZ: Plasmazellen RZ: mehrkernige Riesenzellen +++ überwiegend
 Wo: Woche nach Injektion

Tabelle 3.11c Histopathologische Befunde in der Versuchsserie 2; 12. Woche Staupe-Impfstoff (alle Tiere weiblich)

Histo-Nr.	Tier-Nr.	Wo	Lokalisation	E-Grad	Alter	Begrenzung	Ly	Mak	nG	eG	PZ	RZ	Fb	Fz	Apt	Nek	Befund
E 83	6F-D48F	12	Fgw.	gering	chronisch	fokal	+	-	-	-	-	nein	-	-	-	nein	ggr. chronische fokale Lymphozyteninfiltration im Fettgewebe
E 100	70-D6C7	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nein	-	-	-	nein	obB
E 108	71-0CD7	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nein	-	-	-	nein	obB
E 116	77-4DD0	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nein	-	-	-	nein	obB
E 124	77-4FCE	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nein	-	-	-	nein	obB
E 132	6F-CF9D	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nein	-	-	-	nein	obB
E 140	6F-D974	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nein	-	-	-	nein	obB
E 149	71-0AB1	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nein	-	-	-	nein	obB

Apt: Apoptose
 Fgw: (Unterhaut-)Fettgewebe
 Histo-Nr.: Histologie-Nummer
 mgr.: mittelgradig
 Nr.: Nummer
 Wo: Woche nach Injektion
 eG: eosinophile Granulozyten
 Fz: Fibrozyten
 obB: ohne besonderen Befund
 Msk: (Haut-)Muskulatur
 PZ: Plasmazellen
 E-Grad: Entzündungsgrad
 ggr.: geringgradig
 Ly: Lymphozyten
 Nek: Nekrose
 RZ: mehrkernige Riesenzellen
 Fb: Fibroblasten
 hgr.: hochgradig
 Mak: Makrophagen/Histiozyten
 nG: neutrophile Granulozyten
 Abkürzungen Zellzahl
 (+) vereinzelt
 + wenig
 ++ viele
 +++ überwiegend

Tabelle 3.12 Histopathologische Befunde in der Versuchsserie 2; 1.-12. Woche unbehandelt (alle Tiere weiblich)

Histo-Nr.	Tier-Nr.	Woche	Befund
D 921	71-0D05	1	obB
D 926	70-D797	1	obB
D 931	6F-D372	1	obB
D 936	6F-D76E	1	obB
D 941	70-E4D0	1	obB
D 946	71-103A	1	obB
D 951	70-DF31	1	obB
D 956	6F-DDDEC	1	obB

Histo-Nr.	Tier-Nr.	Woche	Befund
D 980	70-D315	4	obB
D 986	6F-CF21	4	obB
D 992	70-CDEE	4	obB
D 998	6F-D0AC	4	obB
E 6	6F-D315	4	obB
E 10	71-0EE7	4	obB
E 96	70-E38A	4	obB

Histo-Nr.	Tier-Nr.	Woche	Befund
E 88	6F-D48F	12	obB
E 104	70-D6C7	12	obB
E 112	71-0CD7	12	obB
E 120	77-4DD0	12	obB
E 128	77-4FCE	12	obB
E 136	6F-CF9D	12	obB
E 144	6F-D974	12	obB
E 153	71-0AB1	12	obB

Histo: Histologie
 Nr.: Nummer
 obB: ohne besonderen Befund
 Woche: Woche nach der Injektion

3.2.2.3. Befunde im Bereich der Markierungen

In der vierten und zwölften Woche nach Aufbringen der farbigen Markierungen (Eosin/Pikrinsäure) wurde jeweils eine Probe dieser Hautbereiche untersucht. Es konnte keine Veränderung aufgrund der Markierung festgestellt werden.

3.2.2.4. Vergleichende Darstellung der Untersuchungsbefunde

Hier sollen die quantitativen und qualitativen Aspekte der zuvor genannten Befunde noch einmal zusammenfassend dargestellt werden:

Wie unter 3.2.2 beschrieben, wurden die Entzündungen der ersten Woche nach Verabreichung der Injektion unabhängig vom verabreichten Mittel als „akut“ oder „subakut“ eingestuft. Die der vierten und zwölften Woche als „chronisch“ (siehe Tabellen 3.4 bis 3.12). Die chronischen Entzündungen der vierten und zwölften Woche wurden in der nachfolgenden Betrachtung zu einer Gruppe der chronischen Entzündungen zusammengefasst.

3.2.2.4.1 Betrachtung der Entzündung – Ansätze zu einer quantitativen Analyse

In der Versuchsserie 2 erfolgte die Applikation der Tollwut-Impfstoffe 2, 3 und 4 (siehe Tabelle 3.3) wie die Verabreichung des Tollwut-Impfstoffes 1, der Al(OH)₃-Suspension und der isotonischen Kochsalzlösung (siehe Tabelle 3.3) in der Versuchsserie 1 subkutan an der seitlichen Brustwand. Um das Ineinandergreifen der Lokalreaktionen bei gleichzeitiger Verabreichung von drei Impfstoffen in der Versuchsserie 2 ausschließen zu können, wurde der adjuvansfreie Staupe-Impfstoff nicht in der gleichen Körperregion wie die Tollwut-Impfstoffe, sondern dorsolateral im rechten Lendenbereich verabreicht. Daher können die Befunde dieser Untersuchungen nicht ohne Einschränkung mit denen der anderen Impfstoffe bzw. Mittel verglichen werden. Dies begründet sich einerseits in der beim Frettchen sehr locker aufliegenden Haut im Lendenbereich, die eine leichtere und dadurch schnellere Verteilung des Impfstoffes zuließ als die Haut im Bereich der seitlichen Brustwand. Andererseits befand sich bei den Frettchen in der Lendengegend, von der Körpergröße und dem Ernährungszustand abhängig, ein sehr unterschiedlich ausgeprägtes Unterhautfettgewebe, das bei der Herstellung der Paraffinschnitte sehr brüchig wurde. So ist es möglich, dass Bereiche mit geringen Anzeichen einer Entzündung bei der Präparation aufgrund der Brüchigkeit des fixierten Fettgewebes ausbrachen und sich daher nicht im histologischen Schnitt darstellten.

Ergebnisse

Da die Untersuchungen der Versuchsserie 2 (siehe 3.1.1) nur bis zur zwölften Woche stattfanden, wurden die drei Proben aus der vierundzwanzigsten Woche der Versuchsserie 1 nicht mit in die statistische Bewertung einbezogen.

Aus der Versuchsserie 1 (siehe 3.1.1) gab es zwei Proben unbehandelter Tiere. Aus der Versuchsserie 2 wurden die Proben „unbehandelt“ im dorsalen Bereich der linken Lende entnommen. Dort war keine Injektion durchgeführt worden. Bei allen als „unbehandelt“ (n = 25) eingestuften Proben der beiden Versuchsserien, wurde zu keinem Zeitpunkt ein besonderer Befund erhoben. Den Anteil an entzündlichen Lokalreaktionen zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt bezogen auf die verabreichten Mittel gibt die Tabelle 3.13 wieder.

Tabelle 3.13 Anteil und Grad von entzündlichen Reaktionen an der Applikationsstelle verschiedener Impfstoffe zu unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten

Impfstoff / Mittel	1. Woche				4. Woche				12. Woche			
	n	ggr	mgr	hgr	n	ggr	mgr	hgr	n	ggr	mgr	hgr
Staupe	6/8*	5	1	0	2/8	2	0	0	1/8	1	0	0
Al-Susp.	1/1	1	0	0	1/1	0	0	1	1/1	0	1	0
Tollwut 1	2/2	0	1	1	2/2	0	0	2	2/2	0	0	2
Tollwut 2	4/4	1	3	0	4/4	0	4	0	4/4	1	2	1
Tollwut 3	4/4	0	4	0	4/4	0	0	4	4/4	0	3	1
Tollwut 4	7/8	6	1	0	2/8	2	0	0	1/8	1	0	0
NaCl-Lsg.	1/3	1	0	0	0/3	0	0	0	0/3	0	0	0
unbehandelt	0/9	0	0	0	0/7	0	0	0	0/9	0	0	0
Gesamt	25/39				15/37				13/39			

* 6 von 8 Proben wiesen eine Entzündungsreaktion auf

E: Entzündung n: Probenzahl Al-Susp.: Al(OH)₃-Suspension
ggr: geringgradig mgr: mittelgradig NaCl-Lsg.: isotonische Kochsalzlösung
hgr: hochgradig Tollwut 1 (bis 4): Tollwut-Impfstoff 1 (bis 4; siehe Tabelle 3.3)

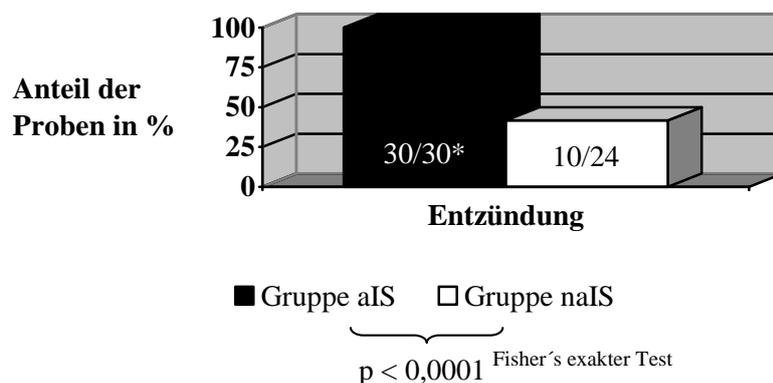
Nach Verabreichung der adjuvanshaltigen Tollwut-Impfstoffe 1, 2 und 3 sowie nach Verabreichung der Al(OH)₃-Suspension konnten in allen Proben (33/33) der 1. bis 12. Woche Entzündungszellinfiltrate an der Applikationsstelle nachgewiesen werden. Bis zur zwölften Woche wurden überwiegend mittel- und hochgradige Entzündungen des granulomatösen Typs ermittelt. In elf der zweiundzwanzig Proben der 4. und 12. Woche konnten mehrkernige Riesenzellen nachgewiesen werden.

Ergebnisse

Im Gegensatz dazu verringerte sich die Häufigkeit der Entzündungszellinfiltrate nach Verabreichung des adjuvansfreien Tollwut-Impfstoffes 4 und des adjuvansfreien Staupe-Impfstoffes im zeitlichen Verlauf deutlich. Nach Applikation dieser Impfstoffe konnten - mit zwei Ausnahmen in der ersten Woche - nur geringgradige Entzündungen des lymphozytären oder des lymphohistiozytären und des fibrosierenden Typs nachgewiesen werden. Zu keinem Zeitpunkt wurden Riesenzellen in den Entzündungen ermittelt.

Für die weitere Betrachtung wurden die Werte der Proben nach Verabreichung der aluminiumadjuvanshaltigen Tollwut-Impfstoffe 1, 2 und 3 ($n = 30$) zur Gruppe der adjuvanshaltigen Tollwut-Impfstoffe (Gruppe aIS) zusammengefasst. Die Werte der Proben nach Verabreichung des adjuvansfreien Tollwut-Impfstoffes 4 ($n = 24$) bildeten die Gruppe des adjuvansfreien Tollwut-Impfstoffes (Gruppe naIS). Im Vergleich dieser beiden Gruppen sollte geklärt werden, ob die adjuvanshaltigen Tollwut-Impfstoffe nach Verabreichung häufiger eine lokale Entzündung verursachen als der adjuvansfreie. Das Diagramm 3.1 zeigt diesen Vergleich mit Angabe des p-Wertes. Es konnte ein signifikanter Unterschied bezüglich des betrachteten Kriteriums ermittelt werden.

Diagramm 3.1 Häufigkeit der Entzündung in der 1. - 12. Woche nach Verabreichung der Tollwut-Impfstoffe



Gruppe aIS: Al-adjuvanshaltige Tollwut-Impfstoffe 1, 2 und 3

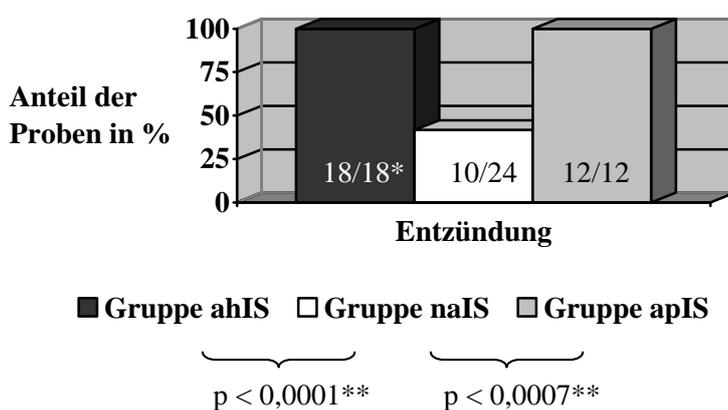
Gruppe naIS: adjuvansfreier Tollwut-Impfstoff 4

* 30 von 30 Proben wiesen eine Entzündung auf.

Ergebnisse

Die Gruppe aIS, die sowohl die Werte der $\text{Al}(\text{OH})_3$ -haltigen Tollwut-Impfstoffe 1 und 2 als auch die Werte des AlPO_4 -haltigen Tollwut-Impfstoffes 3 enthält, wurde wie folgt geteilt: Gruppe ahIS: $\text{Al}(\text{OH})_3$ -haltige Tollwut-Impfstoffe 1 und 2 und Gruppe apIS: AlPO_4 -haltiger Tollwut-Impfstoff 3. Ihre Werte wurden miteinander und mit den Werten des adjuvansfreien Tollwut-Impfstoffes 4 bezüglich der Entzündungshäufigkeit nach Verabreichung der Injektion verglichen. Das Diagramm 3.2. zeigt die bildliche Darstellung dieses Vergleiches. Der Unterschied zwischen den Gruppen ahIS und apIS war nicht signifikant (nicht ausgewertet, da alle Werte in einer Klasse vorliegen). Die p-Werte signifikanter Unterschiede werden in der Legende ausgewiesen.

Diagramm 3.2 Häufigkeit der Entzündung in der 1. - 12. Woche nach Verabreichung der Tollwut-Impfstoffe



Gruppe ahIS: $\text{Al}(\text{OH})_3$ -haltige Tollwut-Impfstoffe 1 und 2

Gruppe naIS: adjuvansfreier Tollwut-Impfstoff 4

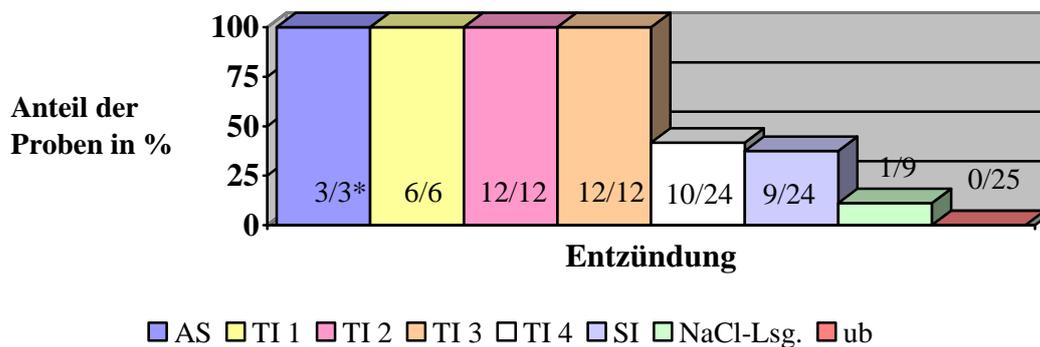
Gruppe apIS: AlPO_4 -haltiger Tollwut-Impfstoff 3

* 18 von 18 Proben wiesen eine Entzündung auf.

** Fisher's exakter Test, korrigiert nach Holm für multiple Vergleiche

Außerdem wurden die Werte der Proben nach Verabreichung aller Tollwut-Impfstoffe, der $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Suspension, der isotonischen Kochsalzlösung, des Staupe-Impfstoffes und der unbehandelten Proben bezüglich der Existenz einer Entzündung untereinander verglichen (Diagramm 3.3). Die exakten p-Werte der Untersuchung sind aufgrund der Übersichtlichkeit in der Tabelle 3.14 aufgeführt.

Diagramm 3.3 Häufigkeit der Entzündung in der 1. - 12. Woche nach Verabreichung der jeweiligen Injektion



* 3 von 3 Proben wiesen eine Entzündung auf.

AS: Al(OH)₃-Suspension TI: Tollwut-Impfstoff SI: Staupe-Impfstoff

ub: unbehandelt

NaCl-Lsg.: isotonische Kochsalzlösung

p-Werte siehe Tabelle 3.14

Tabelle 3.14 Prüfung auf signifikante Unterschiede bezüglich der Entzündungshäufigkeit* nach Verabreichung der jeweiligen Injektion im Zeitraum der 1. - 12. Woche

Vergleich		p-Wert ¹
Al(OH) ₃ -Suspension	isotonische Kochsalzlösung	0,2545
Al(OH) ₃ -Suspension	Staupe-Impfstoff	0,8274
Al(OH) ₃ -Suspension	Tollwut-Impfstoff 1	0,5714
Al(OH) ₃ -Suspension	Tollwut-Impfstoff 2	1,0000
Al(OH) ₃ -Suspension	Tollwut-Impfstoff 3	1,0000
Al(OH) ₃ -Suspension	Tollwut-Impfstoff 4	0,9778
Al(OH) ₃ -Suspension	unbehandelt	0,0061
unbehandelt	isotonische Kochsalzlösung	1,0000
Staupe-Impfstoff	isotonische Kochsalzlösung	1,0000
Staupe-Impfstoff	unbehandelt	0,0121
Tollwut-Impfstoff 1	isotonische Kochsalzlösung	0,0224
Tollwut-Impfstoff 1	Staupe-Impfstoff	0,2529
Tollwut-Impfstoff 1	Tollwut-Impfstoff 2	1,0000
Tollwut-Impfstoff 1	Tollwut-Impfstoff 3	1,0000
Tollwut-Impfstoff 1	Tollwut-Impfstoff 4	0,2411
Tollwut-Impfstoff 1	unbehandelt	<0,0001
Tollwut-Impfstoff 2	isotonische Kochsalzlösung	0,0011
Tollwut-Impfstoff 2	Staupe-Impfstoff	0,0055
Tollwut-Impfstoff 2	Tollwut-Impfstoff 3	1,0000
Tollwut-Impfstoff 2	Tollwut-Impfstoff 4	0,0124
Tollwut-Impfstoff 2	unbehandelt	<0,0001
Tollwut-Impfstoff 3	isotonische Kochsalzlösung	0,0011
Tollwut-Impfstoff 3	Staupe-Impfstoff	0,0055
Tollwut-Impfstoff 3	Tollwut-Impfstoff 4	0,0124
Tollwut-Impfstoff 3	unbehandelt	<0,0001
Tollwut-Impfstoff 4	isotonische Kochsalzlösung	1,0000
Tollwut-Impfstoff 4	Staupe-Impfstoff	1,0000
Tollwut-Impfstoff 4	unbehandelt	0,0055

Alle Vergleiche mit p-Werten < 0,05 sind statistisch signifikant zum (multiplen) Test-niveau $\alpha = 0,05$.

¹ Fisher's exakter Test, korrigiert nach Holm für multiple Vergleiche

*siehe Tabelle 3.13

Ergebnisse

Im Vergleich der zeitlichen Abhängigkeit der Entzündungshäufigkeit innerhalb der jeweiligen Behandlungsgruppe konnten signifikante Unterschiede ermittelt werden. Zur Durchführung des Vergleichs wurden die Werte der 4. und 12. Woche zusammengefasst und mit den Werten der 1. Woche verglichen. Die entsprechenden p-Werte sind in der Tabelle 3.15 aufgeführt. Ein deutlicher zeitlich abhängiger Rückgang der Entzündungsreaktionen konnte nach Verabreichung des adjuvansfreien Tollwut-Impfstoffes 4 und nach Verabreichung des adjuvansfreien Staupe-Impfstoffes beobachtet werden.

Tabelle 3.15 Vergleich des Auftretens der akuten Entzündung* (weiß unterlegt) mit dem Auftreten der chronischen Entzündung (grau unterlegt) (Angabe der Probenzahl)**

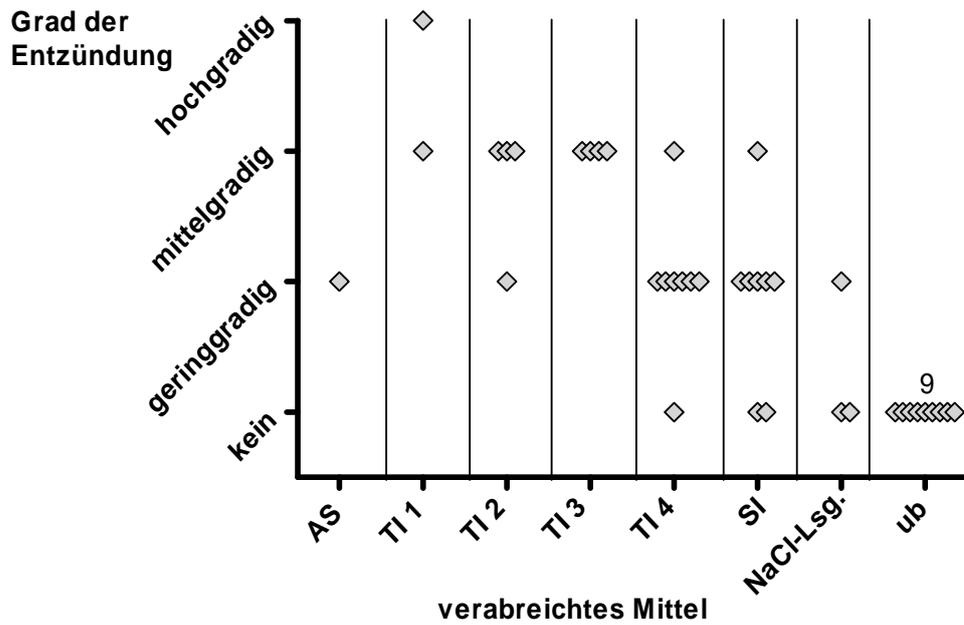
Injektion	keine Entzündung	Entzündung	p-Wert ¹
Al(OH) ₃ -Suspension		1	n.a.
		2	
Tollwut-Impfstoff 1		2	n.a.
		4	
Tollwut-Impfstoff 2		4	n.a.
		8	
Tollwut-Impfstoff 3		4	n.a.
		8	
Tollwut-Impfstoff 4	1	7	0,0023
	13	3	
Staupe-Impfstoff	2	6	0,0215
	13	3	
isotonische Kochsalzlösung	2	1	0,3333
	6		
unbehandelt	9		n.a.
	16		

¹ Fisher´s exakter Test * nach einer Woche ** nach 4 und 12 Wochen
n.a.: nicht ausgewertet, da alle Werte in einer Klasse vorliegen; kein signifikanter Unterschied

Der Grad der Entzündung wurde bereits unter 3.2.2.4.1, Tabelle 3.13 aufgeführt. Der folgende Graph 3.1 zeigt die Häufigkeit der Entzündungsgrade für die erste Woche, der Graph 3.2 die der 4. und 12. Woche.

Ergebnisse

Graph 3.1 Grad der akuten Entzündung nach einer Woche

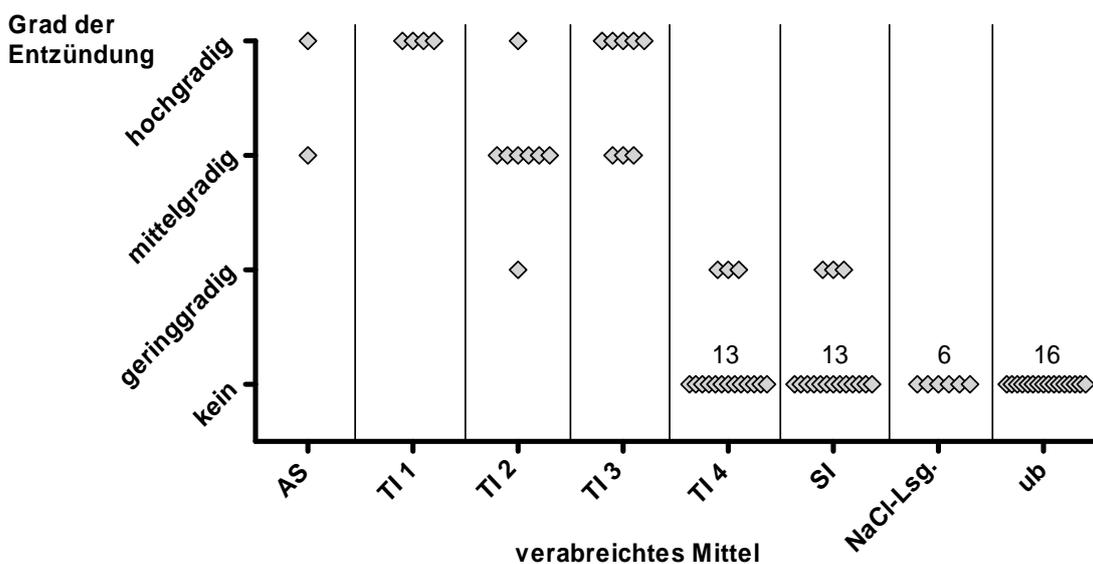


Graph 3.1 Grad der akuten Entzündung in den unbehandelten Proben und nach Verabreichung der jeweiligen Injektion in der ersten Woche.

Legende für Graph 3.1 und 3.2:

AS: Al(OH)₃-Suspension TI: Tollwut-Impfstoff SI: Staupe-Impfstoff
 ub: unbehandelt NaCl-Lsg.: isotonische Kochsalzlösung

Graph 3.2 Grad der chronischen Entzündung nach 4 und 12 Wochen

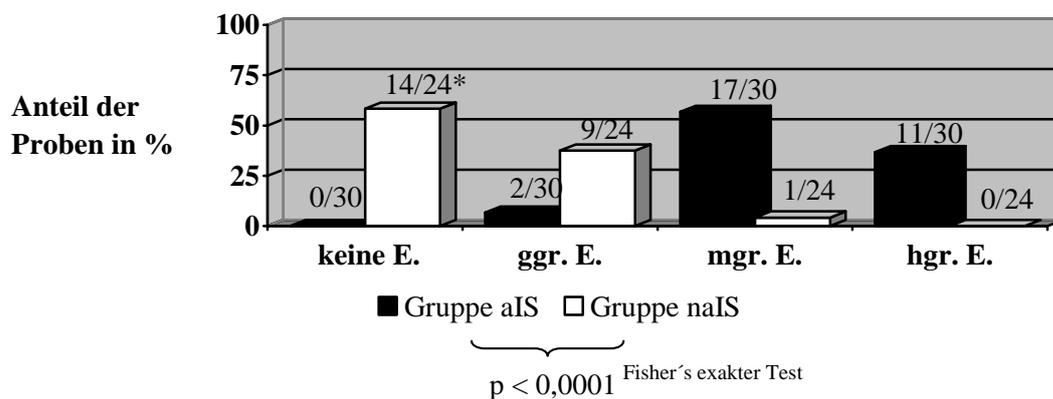


Graph 3.2 Grad der chronischen Entzündung in den unbehandelten Proben und nach Verabreichung der jeweiligen Injektion in der 4. und 12. Woche.

Ergebnisse

Für die Untersuchung der Häufigkeit des Entzündungsgrades wurden wieder die Gruppe aIS und die Gruppe naIS (siehe Legende Diagramm 3.4) miteinander verglichen. Im Vergleich dieser Gruppen sollte geklärt werden, ob adjuvanshaltige Tollwut-Impfstoffe nach Verabreichung häufiger eine hochgradige lokale Entzündung verursachen als adjuvansfreie. Eine Übersicht mit Angabe des p-Wertes des signifikanten Unterschieds der beiden Gruppen zeigt das Diagramm 3.4.

Diagramm 3.4 Vergleich der Schweregrade der Entzündungen in der 1. - 12. Woche nach Verabreichung der Tollwut-Impfstoffe



Gruppe aIS: Al-adjuvanshaltige Tollwut-Impfstoffe 1, 2 und 3

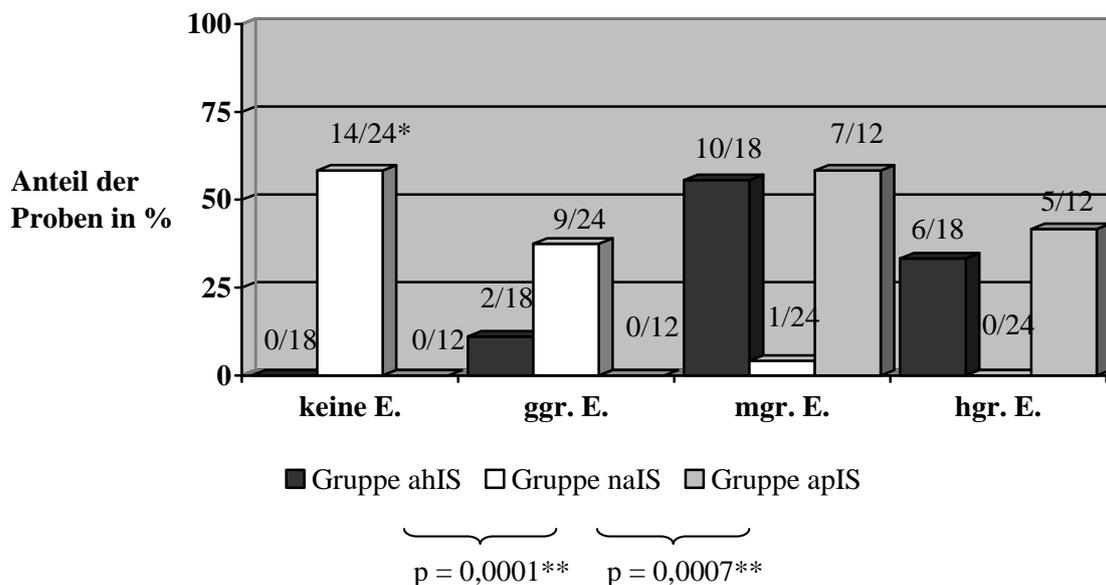
Gruppe naIS: adjuvansfreier Tollwut-Impfstoff 4

ggr.: geringgradig mgr.: mittelgradig hgr.: hochgradig E.: Entzündung

* 14 von 24 Proben wiesen die entsprechende Entzündung auf.

Die Gruppe aIS, die sowohl die Werte der Al(OH)₃-haltigen Tollwut-Impfstoffe 1 und 2 als auch die Werte des AlPO₄-haltigen Tollwut-Impfstoffes 3 enthält, wurde wie folgt geteilt: Gruppe ahIS: Al(OH)₃-haltige Tollwut-Impfstoffe 1 und 2 und Gruppe apIS: AlPO₄-haltiger Tollwut-Impfstoff 3. Ihre Werte wurden miteinander und mit den Werten des adjuvansfreien Tollwut-Impfstoffes 4 (Gruppe naIS) verglichen und der Vergleich im Diagramm 3.5 dargestellt. Der Unterschied zwischen der Gruppe ahIS und der Gruppe apIS bezüglich des Schweregrades der Entzündung war nicht signifikant (p = 0,7194). Die p-Werte signifikanter Unterschiede werden in der Legende ausgewiesen.

Diagramm 3.5 Vergleich der Schweregrade der Entzündungen in der 1. - 12. Woche nach Verabreichung der Tollwut-Impfstoffe



Gruppe ahIS: Al(OH)₃-haltige Tollwut-Impfstoffe 1 und 2

Gruppe naIS: adjuvansfreier Tollwut-Impfstoff 4

Gruppe apIS: AlPO₄-haltiger Tollwut-Impfstoff 3

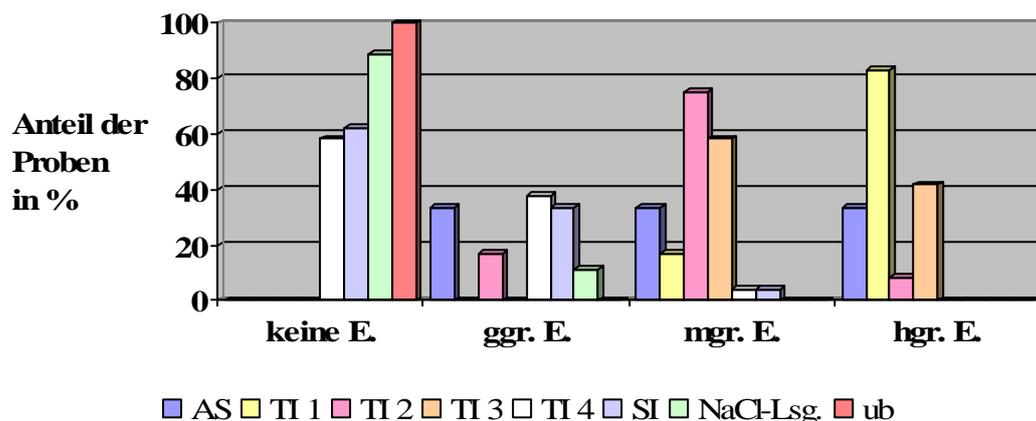
ggr.: geringgradig mgr.: mittelgradig hgr.: hochgradig E.: Entzündung

* 14 von 24 Proben wiesen die entsprechende Entzündung auf.

** Fisher's exakter Test, korrigiert nach Holm für multiple Vergleiche

Die Werte der Proben nach Verabreichung aller Tollwut-Impfstoffe, der Al(OH)₃-Suspension, des Staupe-Impfstoffes, der isotonischen Kochsalzlösung und der unbehandelten Proben wurden bezüglich der Schweregrade der Entzündungen untereinander verglichen. Berechnungen mit Fisher's exaktem Test, korrigiert nach Holm für multiple Vergleiche, führten zur Ermittlung signifikanter Unterschiede im Grad der Entzündung bezüglich der jeweiligen Injektionen. Die exakten Daten zur Häufigkeit und die p-Werte wurden zur Erhaltung der Übersicht nicht im Diagramm 3.6 aufgeführt. Die Häufigkeit des Schweregrades der Entzündung kann der Tabelle 3.13 entnommen werden. Die exakten p-Werte zeigt die Tabelle 3.16. Die Schweregrade der Entzündungen nach Verabreichung der adjuvanshaltigen Tollwut-Impfstoffe 2 und 3 (überwiegend mittel- und hochgradig) unterschieden sich im Vergleich der Schweregrade der Entzündungen nach Verabreichung des adjuvansfreien Tollwut-Impfstoffes 4 und des adjuvansfreien Staupe-Impfstoffes (überwiegend geringgradig) signifikant. Auch der Unterschied der Schweregrade nach Verabreichung der adjuvanshaltigen Tollwut-Impfstoffe 1, 2 und 3 im Vergleich mit den Schweregraden der Entzündung nach Verabreichung der isotonischen Kochsalzlösung war signifikant.

Diagramm 3.6 Vergleich der Schweregrade der Entzündungen in der 1. - 12. Woche nach Verabreichung der jeweiligen Injektion



NaCl-Lsg.: isotonische Kochsalzlösung AS: Al(OH)₃-Suspension TI: Tollwut-Impfstoff
 SI: Staupe-Impfstoff ub: unbehandelt E.: Entzündung
 ggr.: geringgradig mgr.: mittelgradig hgr.: hochgradig
 p-Werte siehe Tabelle 3.16

Tabelle 3.16 Prüfung auf signifikante Unterschiede bezüglich der Häufigkeit* der Entzündungsgrade nach Verabreichung der jeweiligen Injektion im Zeitraum der 1. - 12. Woche

Vergleich		p-Wert ¹
Al(OH) ₃ -Suspension	isotonische Kochsalzlösung	0,1818
Al(OH) ₃ -Suspension	Staupe-Impfstoff	0,1764
Al(OH) ₃ -Suspension	Tollwut-Impfstoff 1	1,0000
Al(OH) ₃ -Suspension	Tollwut-Impfstoff 2	1,0000
Al(OH) ₃ -Suspension	Tollwut-Impfstoff 3	1,0000
Al(OH) ₃ -Suspension	Tollwut-Impfstoff 4	0,1692
Al(OH) ₃ -Suspension	unbehandelt	0,0049
unbehandelt	isotonische Kochsalzlösung	1,0000
Staupe-Impfstoff	isotonische Kochsalzlösung	1,0000
Staupe-Impfstoff	unbehandelt	0,0089
Tollwut-Impfstoff 1	isotonische Kochsalzlösung	0,0060
Tollwut-Impfstoff 1	Staupe-Impfstoff	0,0001
Tollwut-Impfstoff 1	Tollwut-Impfstoff 2	0,0616
Tollwut-Impfstoff 1	Tollwut-Impfstoff 3	1,0000
Tollwut-Impfstoff 1	Tollwut-Impfstoff 4	0,0001
Tollwut-Impfstoff 1	unbehandelt	<0,0001
Tollwut-Impfstoff 2	isotonische Kochsalzlösung	0,0003
Tollwut-Impfstoff 2	Staupe-Impfstoff	<0,0001
Tollwut-Impfstoff 2	Tollwut-Impfstoff 3	0,7549
Tollwut-Impfstoff 2	Tollwut-Impfstoff 4	<0,0001
Tollwut-Impfstoff 2	unbehandelt	<0,0001
Tollwut-Impfstoff 3	isotonische Kochsalzlösung	0,0001
Tollwut-Impfstoff 3	Staupe-Impfstoff	<0,0001
Tollwut-Impfstoff 3	Tollwut-Impfstoff 4	<0,0001
Tollwut-Impfstoff 3	unbehandelt	<0,0001
Tollwut-Impfstoff 4	isotonische Kochsalzlösung	1,0000
Tollwut-Impfstoff 4	Staupe-Impfstoff	1,0000
Tollwut-Impfstoff 4	unbehandelt	0,0041

Alle Vergleiche mit p-Werten < 0,05 sind statistisch signifikant zum (multiplen) Test-niveau $\alpha = 0,05$.

¹ Fisher's exakter Test, korrigiert nach Holm für multiple Vergleiche

*siehe Tabelle 3.13

Ergebnisse

Im Vergleich der Häufigkeit des Grades der Entzündung innerhalb der jeweiligen Behandlungsgruppe konnten im zeitlichen Verlauf signifikante Unterschiede ermittelt werden. Zur Durchführung des Vergleichs wurden die Werte der 4. und 12. Woche zusammengefasst und mit den Werten der 1. Woche der selben Behandlungsgruppe verglichen. Die entsprechenden p-Werte sind in der Tabelle 3.17 aufgeführt. Eine deutliche Umverteilung des Schweregrades im zeitlichen Verlauf wurde nach Verabreichung des adjuvansfreien Tollwut-Impfstoffes 4 ($p < 0,0023$) und nach Verabreichung des adjuvansfreien Staupe-Impfstoffes ($p < 0,0127$) beobachtet.

Tabelle 3.17 Vergleich der Häufigkeit des Grades der akuten Entzündung* (weiß unterlegt) mit der Häufigkeit des Grades der chronischen Entzündung (grau unterlegt) (Angabe der Probenzahl)**

Injektion	kein	ggr.	mgr.	hgr.	p-Wert ¹
Al(OH) ₃ -Suspension		1			n.a. ²
Tollwut-Impfstoff 1			1	1	n.a. ²
Tollwut-Impfstoff 2		1	3		1,0000
Tollwut-Impfstoff 3		1	4		0,0808
Tollwut-Impfstoff 4	1	6	1		0,0023
Staupe-Impfstoff	2	5	1		0,0127
isotonische Kochsalzlösung	2	1			0,3333
unbehandelt	9				n.a. ³

¹ Fisher's exakter Test * nach einer Woche ** nach 4 und 12 Wochen

ggr.: geringgradig mgr.: mittelgradig hgr.: hochgradig

n.a.²: nicht ausgewertet, da für den Vergleich zu schwach besetzt

n.a.³: nicht ausgewertet, da alle Werte in einer Klasse vorliegen; kein signifikanter Unterschied

3.2.2.4.2 Betrachtung der Entzündung bezüglich der Zellart, des Zelltodes und der Granulationsgewebsbildung

Nach Verabreichung der isotonischen Kochsalzlösung ($n = 9$) konnte in einer Probe (1/9) eine ggr. subakute fokale fibrosierende Entzündung nachgewiesen werden. Die Verabreichung des adjuvansfreien Staupe-Impfstoffes ist in einer anderen Körperregion als die der anderen Injektionen durchgeführt worden (siehe 3.2.2.4.1). Trotzdem wurden die Werte der Staupe-Impfung in die vergleichende Betrachtung einbezogen.

Ergebnisse

Die Verteilung der Anzahl der im Anschluss aufgeführten Zellen wurde in der folgenden Beschreibung für den Zeitraum der 1. bis 12. Woche zusammengefasst. Die Häufigkeit der entsprechenden Zellen bezüglich der akuten Entzündungen der ersten und der chronischen Entzündungen der 4. und 12. Woche kann den jeweils erwähnten Tabellen, Graphen oder Diagrammen entnommen werden.

Das Vorkommen von **Makrophagen** (Bild 3.10) war bei den Entzündungsreaktionen nach Verabreichung aluminiumhaltiger Produkte besonders in der chronischen Entzündung deutlich höher als in den Proben nach Verabreichung des adjuvansfreien Tollwut-Impfstoffes 4 und des adjuvansfreien Staupe-Impfstoffes (siehe Diagramm 3.7 - 3.9).

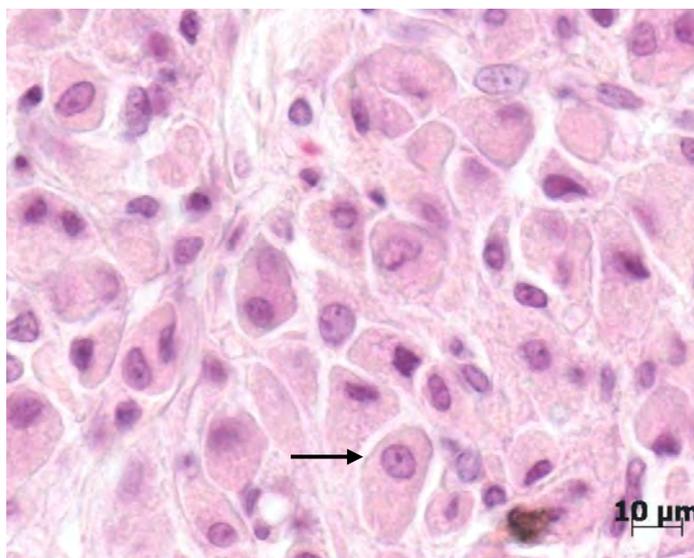
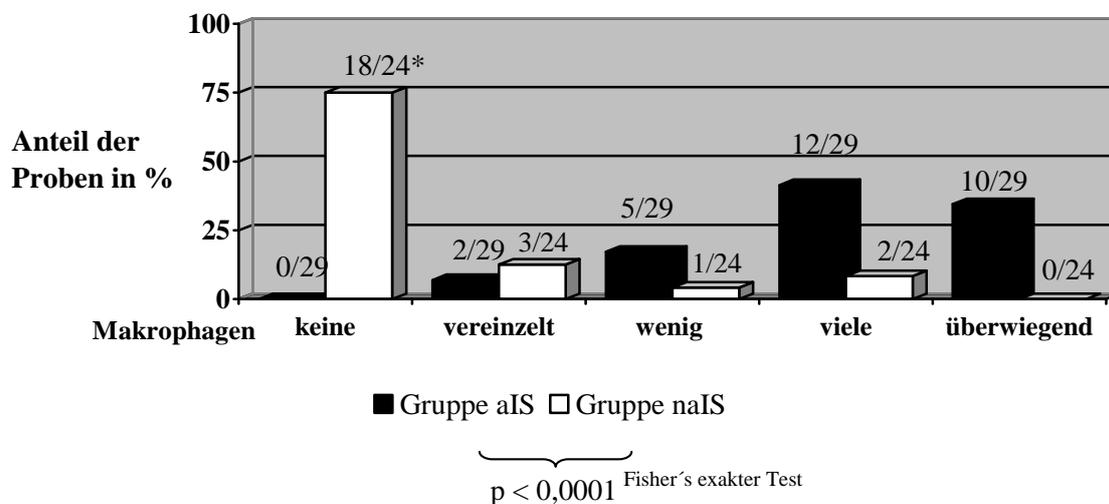


Bild 3.10 Makrophage (Pfeil) in der chronischen Entzündung zwölf Wochen nach Verabreichung des Tollwut-Impfstoffes 3 (Stamm Pasteur RIV mit AlPO_4). Probe E148, HE

Diagramm 3.7 Vergleich des Auftretens von Makrophagen im Entzündungszellinfiltrat in der 1. - 12. Woche nach Verabreichung der Tollwut-Impfstoffe

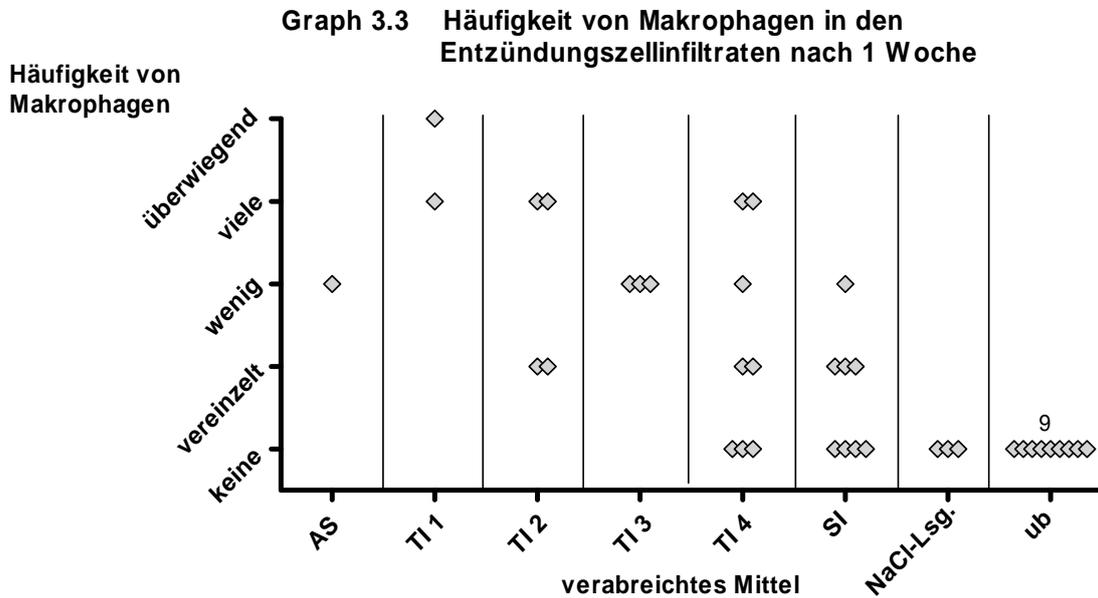


Gruppe aIS: Al-adjuvanshaltige Tollwut-Impfstoffe 1, 2 und 3
 Gruppe naIS: adjuvansfreier Tollwut-Impfstoff 4

* 18 von 24 Proben wiesen die entsprechende Häufigkeit von Makrophagen auf.

Ergebnisse

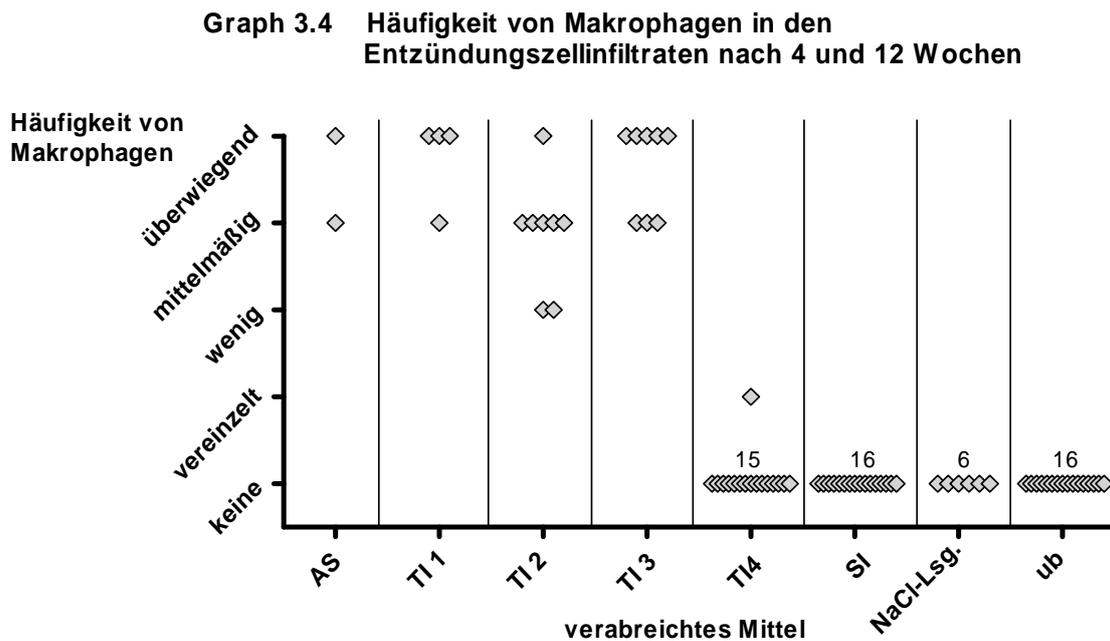
Der Graph 3.3 zeigt die Häufigkeit von Makrophagen in der akuten Entzündung in der ersten Woche nach Verabreichung der entsprechenden Injektion, der Graph 3.4 die Häufigkeit von Makrophagen in der chronischen Entzündung in der 4. und 12. Woche.



Graph 3.3 Häufigkeit von Makrophagen in den unbehandelten Proben und nach Verabreichung der unterschiedlichen Injektionen in den Proben nach einer Woche.

Legende für die Graphen 3.3 und 3.4:

AS: Al(OH)₃-Suspension TI: Tollwut-Impfstoff SI: Staupe-Impfstoff
 ub: unbehandelt NaCl-Lsg.: isotonische Kochsalzlösung



Graph 3.4 Häufigkeit von Makrophagen in den unbehandelten Proben nach Verabreichung der jeweiligen Injektion nach vier und zwölf Wochen.

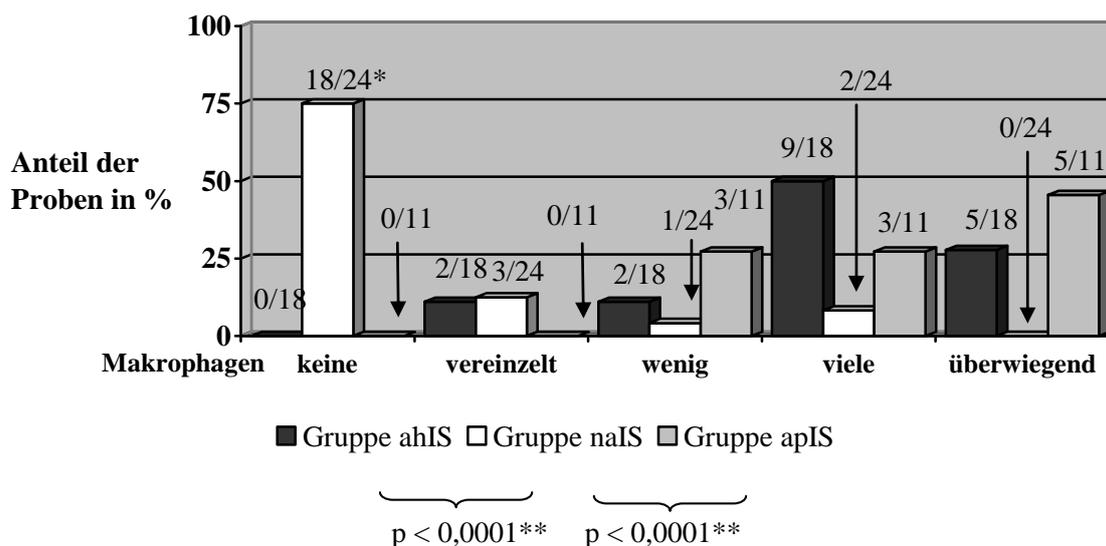
Ergebnisse

Wieder wurde die Gruppe der adjuvanshaltigen Tollwut-Impfstoffe 1, 2 sowie 3 (Gruppe aIS; n = 29*) und die Gruppe des adjuvansfreien Tollwut-Impfstoffes 4 (Gruppe naIS; n = 24) gebildet und bezüglich der Häufigkeit von Makrophagen in den Entzündungsinfiltraten miteinander verglichen.

* Da bei einer Probe durch Präparationsartefakte die Zellmorphologie beeinträchtigt wurde, konnte dieses Entzündungszellinfiltrat nicht näher bestimmt werden. Aus diesem Grund reduziert sich die Gesamtzahl der Proben aller folgenden Untersuchungen bezüglich der Häufigkeit der Zellen der Gruppe aIS (n = 29 anstelle von n = 30) und der Gruppe apIS (n = 11 anstelle von n = 12) um eins.

Durch den Vergleich der Gruppe ahIS und der Gruppe apIS mit der Gruppe naIS konnten ebenfalls signifikante Unterschiede bezüglich der Häufigkeit der Makrophagen ermittelt werden (siehe Diagramm 3.8). Die Gruppe ahIS und die Gruppe apIS unterschieden sich nicht signifikant bezüglich der Häufigkeit von Makrophagen (p = 0,3833). Die p-Werte signifikanter Unterschiede bezüglich der Häufigkeit von Makrophagen sind im Diagramm 3.8 aufgeführt.

Diagramm 3.8 Vergleich des Auftretens von Makrophagen im Entzündungszellinfiltrat in der 1. - 12. Woche nach Verabreichung der Tollwut-Impfstoffe



Gruppe ahIS: Al(OH)₃-haltige Tollwut-Impfstoffe 1 und 2

Gruppe naIS: adjuvansfreier Tollwut-Impfstoff 4

Gruppe apIS: AlPO₄-haltiger Tollwut-Impfstoff 3

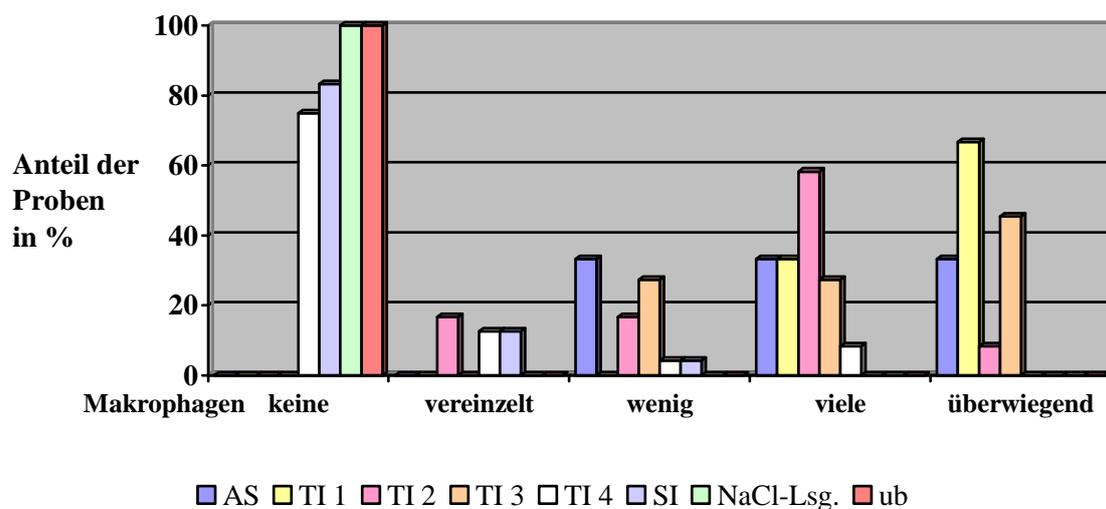
* 18 von 24 Proben wiesen die entsprechende Häufigkeit von Makrophagen auf.

** Fisher's exakter Test, korrigiert nach Holm für multiple Vergleiche

Ergebnisse

Die Untersuchung bezüglich der Häufigkeiten von Makrophagen in den Entzündungszellinfiltraten nach Verabreichung der jeweiligen Injektion ergab signifikante Unterschiede. Die Entzündungszellinfiltrate nach Verabreichung der adjuvanshaltigen Tollwut-Impfstoffe 1, 2 und 3 unterschieden sich bezüglich der Häufigkeit von Makrophagen signifikant von deren Häufigkeit in den Entzündungszellinfiltraten nach Verabreichung des adjuvansfreien Tollwut-Impfstoffes 4 und des adjuvansfreien Staupe-Impfstoffes (siehe Tabelle 3.18). Dagegen ergab der Vergleich der Werte nach Verabreichung des adjuvansfreien Tollwut-Impfstoffes 4 mit den Werten nach Verabreichung des adjuvansfreien Staupe-Impfstoffes keinen signifikanten Unterschied ($p = 1,0000$). Eine graphische Darstellung zeigt das Diagramm 3.9. Zur Erhaltung der Übersicht wurde auf das Eintragen der p-Werte innerhalb des Diagramms verzichtet und diese in der Tabelle 3.18 hinterlegt.

Diagramm 3.9 Vergleich des Auftretens von Makrophagen im Entzündungszellinfiltrat in der 1. - 12. Woche nach Verabreichung der jeweiligen Injektion



AS: Al(OH)₃-Suspension TI: Tollwut-Impfstoff SI: Staupe-Impfstoff
 ub: unbehandelt NaCl-Lsg.: isotonische Kochsalzlösung
 p-Werte siehe Tabelle 3.18

Tabelle 3.18 Prüfung auf signifikante Unterschiede bezüglich des Auftretens* von Makrophagen nach Verabreichung der jeweiligen Injektion im Zeitraum der 1. - 12. Woche

Vergleich		p-Wert ¹
Al(OH) ₃ -Suspension	isotonische Kochsalzlösung	0,0591
Al(OH) ₃ -Suspension	Staupe-Impfstoff	0,0239
Al(OH) ₃ -Suspension	Tollwut-Impfstoff 1	1,0000
Al(OH) ₃ -Suspension	Tollwut-Impfstoff 2	1,0000
Al(OH) ₃ -Suspension	Tollwut-Impfstoff 3	1,0000
Al(OH) ₃ -Suspension	Tollwut-Impfstoff 4	0,1467
Al(OH) ₃ -Suspension	unbehandelt	0,0046
unbehandelt	isotonische Kochsalzlösung	n.a.
Staupe-Impfstoff	isotonische Kochsalzlösung	1,0000
Staupe-Impfstoff	unbehandelt	0,5015
Tollwut-Impfstoff 1	isotonische Kochsalzlösung	0,0032
Tollwut-Impfstoff 1	Staupe-Impfstoff	0,0001
Tollwut-Impfstoff 1	Tollwut-Impfstoff 2	0,8465
Tollwut-Impfstoff 1	Tollwut-Impfstoff 3	1,0000
Tollwut-Impfstoff 1	Tollwut-Impfstoff 4	0,0015
Tollwut-Impfstoff 1	unbehandelt	<0,0001
Tollwut-Impfstoff 2	isotonische Kochsalzlösung	0,0002
Tollwut-Impfstoff 2	Staupe-Impfstoff	<0,0001
Tollwut-Impfstoff 2	Tollwut-Impfstoff 3	0,8279
Tollwut-Impfstoff 2	Tollwut-Impfstoff 4	0,0002
Tollwut-Impfstoff 2	unbehandelt	<0,0001
Tollwut-Impfstoff 3	isotonische Kochsalzlösung	0,0001
Tollwut-Impfstoff 3	Staupe-Impfstoff	<0,0001
Tollwut-Impfstoff 3	Tollwut-Impfstoff 4	<0,0001
Tollwut-Impfstoff 3	unbehandelt	<0,0001
Tollwut-Impfstoff 4	isotonische Kochsalzlösung	1,0000
Tollwut-Impfstoff 4	Staupe-Impfstoff	1,0000
Tollwut-Impfstoff 4	unbehandelt	0,1155

Alle Vergleiche mit p-Werten < 0,05 sind statistisch signifikant zum (multiplen) Test-niveau $\alpha = 0,05$.

¹ Fisher's exakter Test, korrigiert nach Holm für multiple Vergleiche

n.a.: nicht ausgewertet, da alle Werte in einer Klasse vorliegen; kein signifikanter Unterschied

*siehe Tabelle 6.2 im Kapitel 6. Tabellen

Die Untersuchung zur zeitlich abhängigen Anwesenheit von Makrophagen in der akuten und chronischen Entzündung innerhalb der gleichen Behandlungsgruppe ergab signifikante Unterschiede nach Verabreichung des Tollwut-Impfstoffes 3, des Tollwut-Impfstoffes 4 und des Staupe-Impfstoffes (siehe Tabelle 3.19).

Tabelle 3.19 Vergleich des Auftretens von Makrophagen in der akuten Entzündung (weiß unterlegt) mit deren Auftreten in der chronischen Entzündung (grau unterlegt) (Angabe der Probenzahl)**

Injektion	keine	vereinzelt	wenig	viele	überwiegend	p-Wert ¹
Al(OH) ₃ -Suspension			1			n.a. ²
Tollwut-Impfstoff 1				1	1	n.a. ²
Tollwut-Impfstoff 2		2		2		0,1798
Tollwut-Impfstoff 3			3			0,0121
Tollwut-Impfstoff 4	3	2	1	2		0,0069
Staupe-Impfstoff	4	3	1			0,0066
isotonische Kochsalzlösung	3					n.a. ³
unbehandelt	9					n.a. ³

¹ Fisher's exakter Test * nach einer Woche ** nach 4 und 12 Wochen

n.a.²: nicht ausgewertet, da für den Vergleich zu schwach besetzt

n.a.³: nicht ausgewertet, da alle Werte in einer Klasse vorliegen; kein signifikanter Unterschied

Unabhängig vom injizierten Mittel gab es in der akuten Entzündung keine mehrkernige **Riesenzellen** (Bild 3.11). Da diese sich erst nach einem länger anhaltenden Reiz bilden, wurde deren Anwesenheit nur bei den chronischen Entzündungen betrachtet. Die Summe der Proben nach Verabreichung aluminiumadjuvanshaltiger Impfstoffe (n = 20) und der Al(OH)₃-Suspension (n = 2) aus der vierten und zwölften Woche beträgt zweiundzwanzig (n = 22). In allen Proben (n = 22) dieser Zeitpunkte konnte eine chronische Entzündung nachgewiesen werden. In der Hälfte dieser Proben (11/22) wurden mehrkernige Riesenzellen nachgewiesen.

Ergebnisse

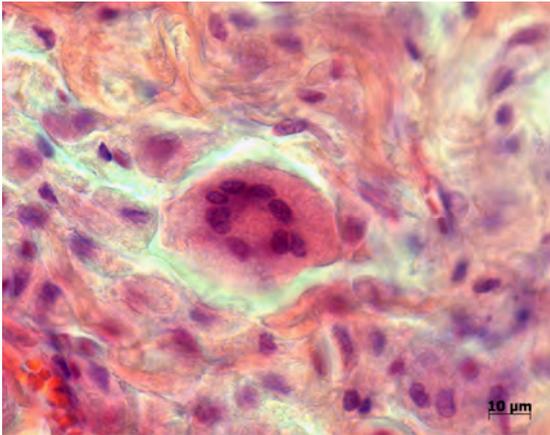


Bild 3.11a mehrkernige Riesenzelle

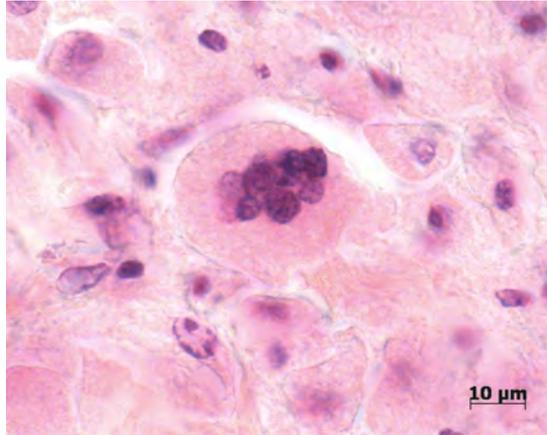
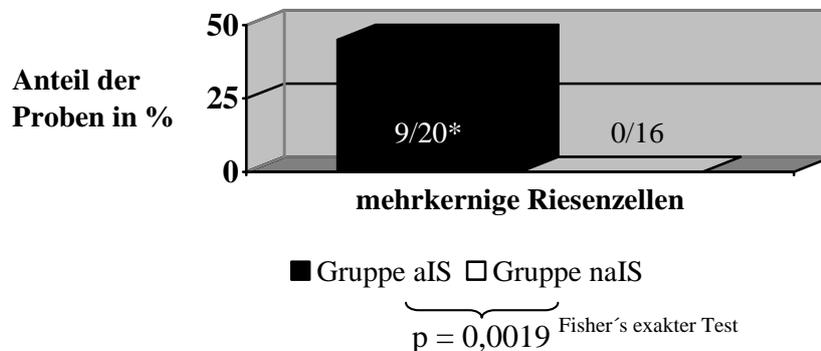


Bild 3.11b mehrkernige Riesenzelle

Mehrkernige Riesenzellen einer chronischen Entzündung zwölf Wochen nach Verabreichung des Tollwut-Impfstoffes 1 [Virus fixe, Stamm G52 mit Al(OH)₃]. Probe D274/275, HE

Das Vorkommen der mehrkernigen Riesenzellen nach Verabreichung der adjuvanshaltigen und adjuvansfreien Tollwut-Impfstoffe wurde statistisch untersucht (siehe Diagramm 3.10). Der p-Wert des statistisch signifikanten Unterschieds wird im zugehörigen Diagramm aufgeführt.

Diagramm 3.10 Auftreten von mehrkernigen Riesenzellen in der chronischen Entzündung nach Verabreichung der Tollwut-Impfstoffe



Gruppe aIS: Al-adjuvanshaltige Tollwut-Impfstoffe 1, 2 und 3

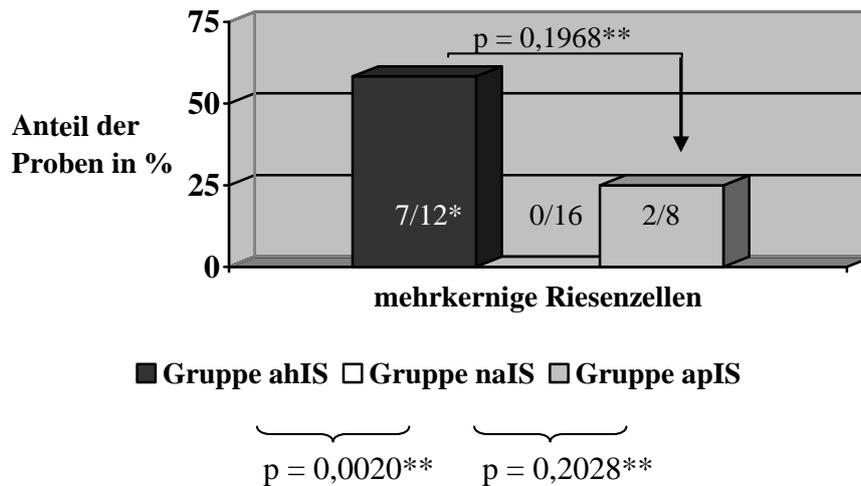
Gruppe naIS: adjuvansfreier Tollwut-Impfstoff 4

* 9 von 20 Proben wiesen mehrkernige Riesenzellen auf.

Im Vergleich der drei Adjuvansgruppen konnte ein signifikanter Unterschied bezüglich der Anwesenheit von mehrkernigen Riesenzellen in den Entzündungszell-infiltraten ermittelt werden (siehe Diagramm 3.11).

Ergebnisse

Diagramm 3.11 Auftreten von mehrkernigen Riesenzellen in der chronischen Entzündung nach Verabreichung der Tollwut-Impfstoffe



Gruppe ahIS: Al(OH)₃-haltige Tollwut-Impfstoffe 1 und 2

Gruppe naIS: adjuvansfreier Tollwut-Impfstoff 4

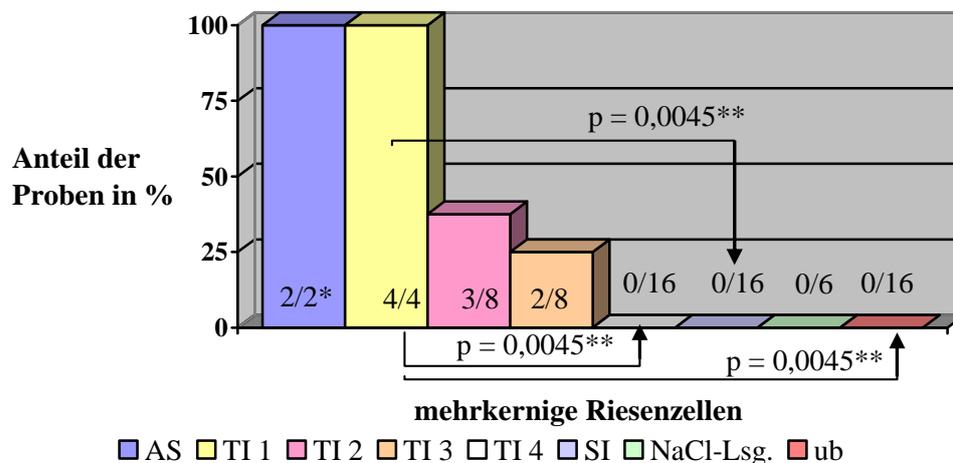
Gruppe apIS: AlPO₄-haltiger Tollwut-Impfstoff 3

* 7 von 12 Proben wiesen mehrkernige Riesenzellen auf.

** Fisher's exakter Test, korrigiert nach Holm für multiple Vergleiche

Bei der Betrachtung der Unterschiede zum Vorkommen von mehrkernigen Riesenzellen in den Entzündungszellinfiltraten nach Verabreichung der jeweiligen Injektion wurden signifikante Unterschiede festgestellt (siehe Diagramm 3.12). Die genauen p-Werte der Vergleiche können der Tabelle 3.20 entnommen werden.

Diagramm 3.12 Auftreten von mehrkernigen Riesenzellen in der chronischen Entzündung nach Verabreichung der jeweiligen Injektion



* 2 von 2 Proben wiesen mehrkernige Riesenzellen auf.

** Fisher's exakter Test, korrigiert nach Holm für multiple Vergleiche

AS: Al(OH)₃-Suspension TI: Tollwut-Impfstoff SI: Staupe-Impfstoff

ub: unbehandelt

NaCl-Lsg.: isotonische Kochsalzlösung

p-Werte siehe Tabelle 3.20

Tabelle 3.20 Prüfung auf signifikante Unterschiede bezüglich des Auftretens* von mehrkernigen Riesenzellen nach Verabreichung der jeweiligen Injektion zum Zeitpunkt der 4. und 12. Woche

Vergleich		p-Wert ¹
Al(OH) ₃ -Suspension	isotonische Kochsalzlösung	0,4643
Al(OH) ₃ -Suspension	Staupe-Impfstoff	0,1176
Al(OH) ₃ -Suspension	Tollwut-Impfstoff 1	1,0000
Al(OH) ₃ -Suspension	Tollwut-Impfstoff 2	1,0000
Al(OH) ₃ -Suspension	Tollwut-Impfstoff 3	0,9333
Al(OH) ₃ -Suspension	Tollwut-Impfstoff 4	0,1176
Al(OH) ₃ -Suspension	unbehandelt	0,1176
unbehandelt	isotonische Kochsalzlösung	n.a.
Staupe-Impfstoff	isotonische Kochsalzlösung	n.a.
Staupe-Impfstoff	unbehandelt	n.a.
Tollwut-Impfstoff 1	isotonische Kochsalzlösung	0,0952
Tollwut-Impfstoff 1	Staupe-Impfstoff	0,0045
Tollwut-Impfstoff 1	Tollwut-Impfstoff 2	0,8889
Tollwut-Impfstoff 1	Tollwut-Impfstoff 3	0,7273
Tollwut-Impfstoff 1	Tollwut-Impfstoff 4	0,0045
Tollwut-Impfstoff 1	unbehandelt	0,0045
Tollwut-Impfstoff 2	isotonische Kochsalzlösung	1,0000
Tollwut-Impfstoff 2	Staupe-Impfstoff	0,4150
Tollwut-Impfstoff 2	Tollwut-Impfstoff 3	1,0000
Tollwut-Impfstoff 2	Tollwut-Impfstoff 4	0,4150
Tollwut-Impfstoff 2	unbehandelt	0,4150
Tollwut-Impfstoff 3	isotonische Kochsalzlösung	1,0000
Tollwut-Impfstoff 3	Staupe-Impfstoff	0,9130
Tollwut-Impfstoff 3	Tollwut-Impfstoff 4	0,9130
Tollwut-Impfstoff 3	unbehandelt	0,9130
Tollwut-Impfstoff 4	isotonische Kochsalzlösung	n.a.
Tollwut-Impfstoff 4	Staupe-Impfstoff	1,0000
Tollwut-Impfstoff 4	unbehandelt	n.a.

Alle Vergleiche mit p-Werten < 0,05 sind statistisch signifikant zum (multiplen) Testniveau $\alpha = 0,05$.

¹ Fisher's exakter Test, korrigiert nach Holm für multiple Vergleiche

n.a.: nicht ausgewertet, da alle Werte in einer Klasse vorliegen; kein signifikanter Unterschied

* siehe Diagramm 3.12

Der Nachweis von **neutrophilen Granulozyten** (Bild 3.12) konnte in einigen Entzündungszellinfiltraten erbracht werden (siehe Graph 3.5).

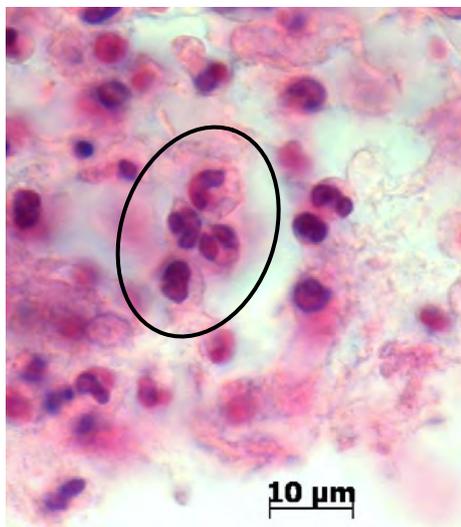
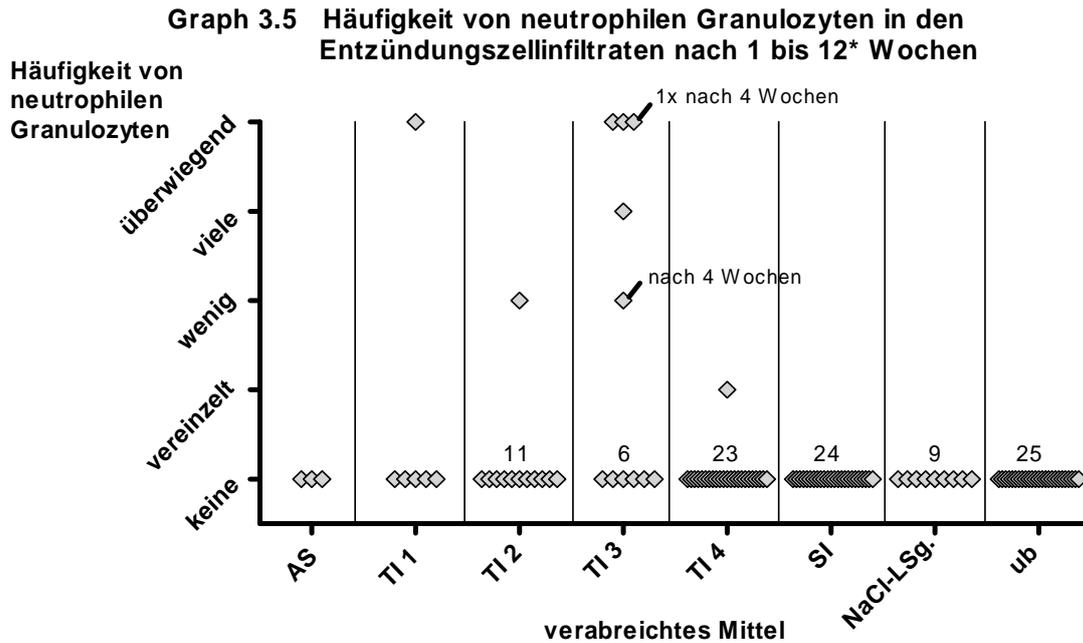


Bild 3.12

Neutrophile Granulozyten (Kreis) in der akuten Entzündung eine Woche nach Verabreichung des Tollwut-Impfstoffes 3 (Stamm Pasteur RIV mit AlPO₄). Probe D938, HE

Ergebnisse



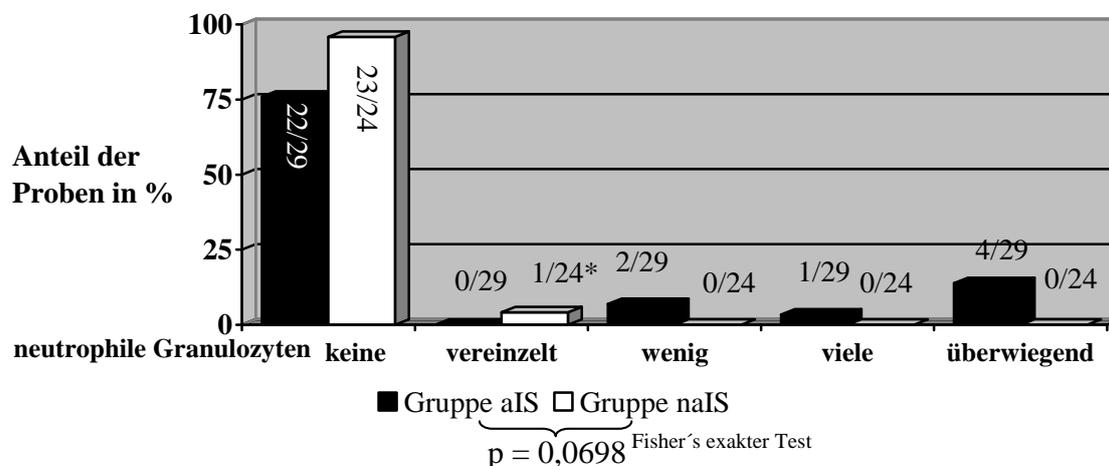
Graph 3.5 Auftreten von neutrophilen Granulozyten in den unbehandelten Proben und nach Verabreichung der jeweiligen Injektion in der ersten bis zwölften Woche.

* In der 12. Woche konnten keine neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden. Die Werte der 4. Woche wurden im Graph markiert. Alle unmarkierten Rauten außerhalb der Klasse „keine“ entsprechen den Werten der 1. Woche.

AS: Al(OH)₃-Suspension TI: Tollwut-Impfstoff SI: Staupe-Impfstoff
 ub: unbehandelt NaCl-Lsg.: isotonische Kochsalzlösung

Der Unterschied zwischen der Gruppe aIS und der Gruppe naIS (siehe Legende von Diagramm 3.13) bezüglich der Häufigkeit der neutrophilen Granulozyten war nach dem zweiseitigen Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ nicht signifikant ($p = 0,0698$). Der p-Wert weist jedoch darauf hin, dass sich bei einer größeren Probenzahl ein signifikanter Unterschied ergeben könnte, da die neutrophilen Granulozyten nach Verabreichung der adjuvanshaltigen Tollwut-Impfstoffe im Vergleich zum adjuvansfreien vermehrt aufgetreten sind.

Diagramm 3.13 Auftreten von neutrophilen Granulozyten im Entzündungszellinfiltrat in der 1. - 12. Woche nach Verabreichung der Tollwut-Impfstoffe



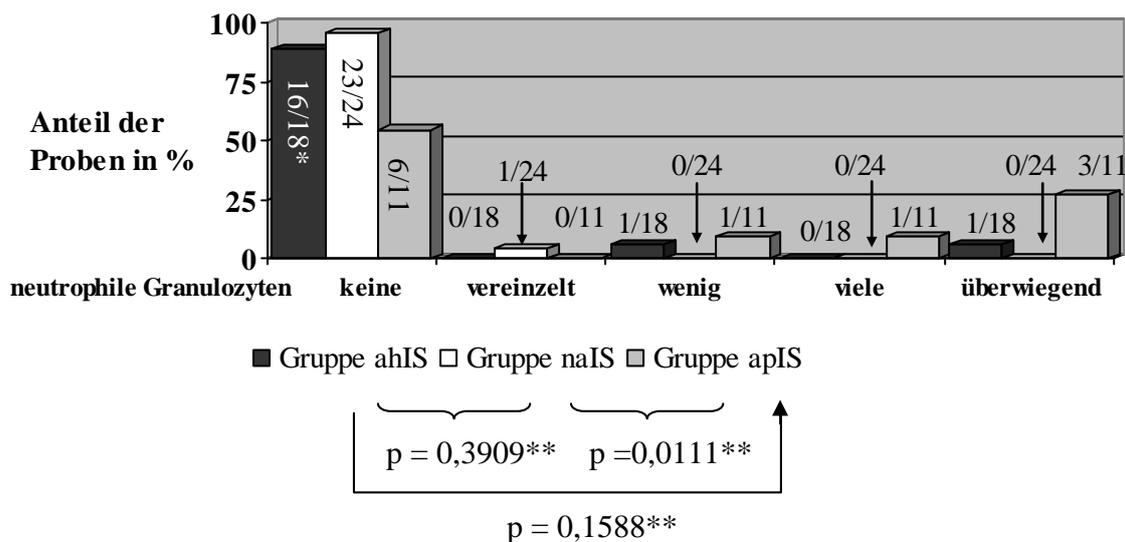
Gruppe aIS: Al-Adjuvanshaltige Tollwut-Impfstoffe 1, 2 und 3

Gruppe naIS: adjuvansfreier Tollwut-Impfstoff 4

* 1 von 24 Proben wies die entsprechende Häufigkeit von neutrophilen Granulozyten auf.

Auch im Vergleich der drei Adjuvansgruppen bezüglich der Häufigkeit von neutrophilen Granulozyten nach Verabreichung der entsprechenden Injektion konnte ein signifikanter Unterschied ermittelt werden (siehe Diagramm 3.14).

Diagramm 3.14 Auftreten von neutrophilen Granulozyten im Entzündungszellinfiltrat in der 1. - 12. Woche nach Verabreichung der Tollwut-Impfstoffe



Gruppe ahIS: Al(OH)₃-haltige Tollwut-Impfstoffe 1 und 2

Gruppe naIS: adjuvansfreier Tollwut-Impfstoff 4

Gruppe apIS: AlPO₄-haltiger Tollwut-Impfstoff 3

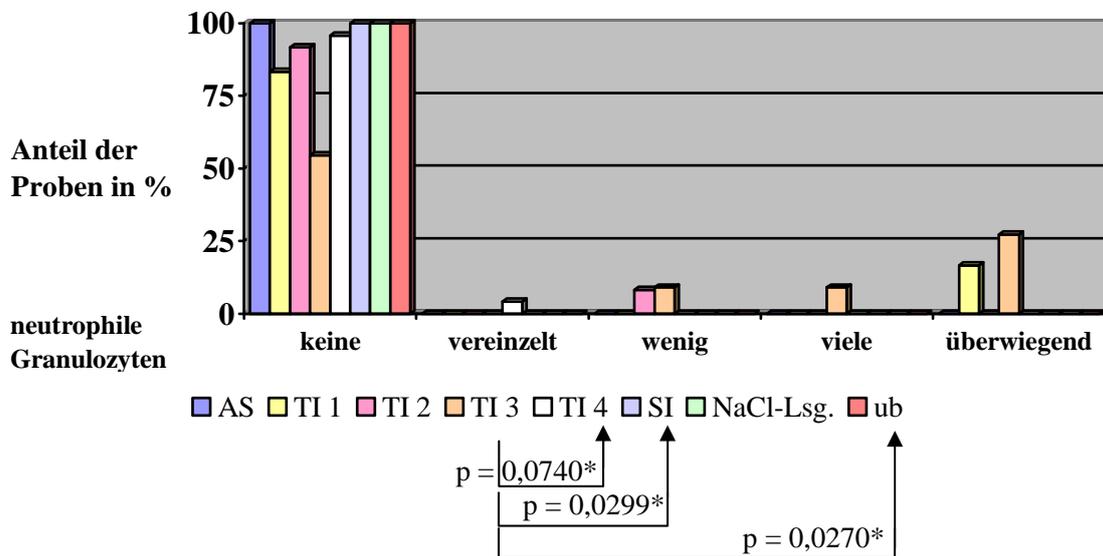
* 16 von 18 Proben wiesen neutrophile Granulozyten auf.

** Fisher's exakter Test, korrigiert nach Holm für multiple Vergleiche

Ergebnisse

Nur in den Vergleichen der Proben nach Verabreichung des Tollwut-Impfstoffes 3 mit den Proben nach Verabreichung des Staupe-Impfstoffes ($p = 0,0299$) sowie mit unbehandeltem Gewebe ($p = 0,0279$) konnte ein signifikanter Unterschied zur Häufigkeit von neutrophilen Granulozyten in den Entzündungszellinfiltraten ermittelt werden. Im Vergleich der Proben nach Verabreichung des $AlPO_4$ -haltigen Tollwut-Impfstoffes 3 mit den Proben nach Verabreichung des adjuvansfreien Tollwut-Impfstoffes 4 zeigt sich eine Tendenz, aber keine Signifikanz bezüglich der Anwesenheit von neutrophilen Granulozyten im Entzündungszellinfiltrat (siehe Diagramm 3.15, p-Werte siehe Tabelle 3.21).

Diagramm 3.15 Auftreten von neutrophilen Granulozyten im Entzündungszellinfiltrat in der 1. - 12. Woche nach Verabreichung der jeweiligen Injektion



AS: $Al(OH)_3$ -Suspension TI: Tollwut-Impfstoff SI: Staupe-Impfstoff
 ub: unbehandelt NaCl-Lsg.: isotonische Kochsalzlösung
 * Fisher's exakter Test, korrigiert nach Holm für multiple Vergleiche
 p-Werte siehe Tabelle 3.21

Tabelle 3.21 Prüfung auf signifikante Unterschiede bezüglich des Auftretens* von neutrophilen Granulozyten nach Verabreichung der jeweiligen Injektionen im Zeitraum der 1. - 12. Woche

Vergleich		p-Wert ¹
Al(OH) ₃ -Suspension	isotonische Kochsalzlösung	n.a.
Al(OH) ₃ -Suspension	Staupe-Impfstoff	n.a.
Al(OH) ₃ -Suspension	Tollwut-Impfstoff 1	1,0000
Al(OH) ₃ -Suspension	Tollwut-Impfstoff 2	1,0000
Al(OH) ₃ -Suspension	Tollwut-Impfstoff 3	1,0000
Al(OH) ₃ -Suspension	Tollwut-Impfstoff 4	1,0000
Al(OH) ₃ -Suspension	unbehandelt	n.a.
unbehandelt	isotonische Kochsalzlösung	n.a.
Staupe-Impfstoff	isotonische Kochsalzlösung	n.a.
Staupe-Impfstoff	unbehandelt	n.a.
Tollwut-Impfstoff 1	isotonische Kochsalzlösung	1,0000
Tollwut-Impfstoff 1	Staupe-Impfstoff	1,0000
Tollwut-Impfstoff 1	Tollwut-Impfstoff 2	1,0000
Tollwut-Impfstoff 1	Tollwut-Impfstoff 3	1,0000
Tollwut-Impfstoff 1	Tollwut-Impfstoff 4	1,0000
Tollwut-Impfstoff 1	unbehandelt	1,0000
Tollwut-Impfstoff 2	isotonische Kochsalzlösung	1,0000
Tollwut-Impfstoff 2	Staupe-Impfstoff	1,0000
Tollwut-Impfstoff 2	Tollwut-Impfstoff 3	1,0000
Tollwut-Impfstoff 2	Tollwut-Impfstoff 4	1,0000
Tollwut-Impfstoff 2	unbehandelt	1,0000
Tollwut-Impfstoff 3	isotonische Kochsalzlösung	1,0000
Tollwut-Impfstoff 3	Staupe-Impfstoff	0,0299
Tollwut-Impfstoff 3	Tollwut-Impfstoff 4	0,0740
Tollwut-Impfstoff 3	unbehandelt	0,0270
Tollwut-Impfstoff 4	isotonische Kochsalzlösung	1,0000
Tollwut-Impfstoff 4	Staupe-Impfstoff	1,0000
Tollwut-Impfstoff 4	unbehandelt	1,0000

Alle Vergleiche mit p-Werten < 0,05 sind statistisch signifikant zum (multiplen) Testniveau $\alpha = 0,05$.

¹ Fisher's exakter Test, korrigiert nach Holm für multiple Vergleiche

n.a.: nicht ausgewertet, da alle Werte in einer Klasse vorliegen; kein signifikanter Unterschied

* siehe Tabelle 6.3 im Kapitel **6. Tabellen**

Die Werte der 4. und 12. Woche wurden zusammengefasst und mit den Werten der ersten Woche der selben Behandlungsgruppe verglichen, um die zeitliche Abhängigkeit zum Vorkommen von neutrophilen Granulozyten zu prüfen. Die entsprechenden p-Werte sind in der Tabelle 3.22 aufgeführt.

Tabelle 3.22 Vergleich des Auftretens von neutrophilen Granulozyten in der akuten Entzündung* (weiß unterlegt) mit deren Auftreten in der chronischen Entzündung (grau unterlegt) (Angabe der Probenzahl)**

Injektion	keine	vereinzelt	wenig	viele	überwiegend	p-Wert ¹
Al(OH) ₃ - Suspension	1 2					n.a.
Tollwut-Impfstoff 1	1 4				1	0,3333
Tollwut-Impfstoff 2	3 8		1			0,3333
Tollwut-Impfstoff 3	6 6		1 1	1	2 1	0,0606
Tollwut-Impfstoff 4	7 16	1				0,3333
Staupe-Impfstoff	8 16					n.a.
isotonische Kochsalzlösung	3 6					n.a.
unbehandelt	9 16					n.a.

¹ Fisher's exakter Test * nach einer Woche ** nach 4 und 12 Wochen
n.a.: nicht ausgewertet, da alle Werte in einer Klasse vorliegen; kein signifikanter Unterschied

In den Entzündungsinfiltraten nach Verabreichung des AlPO₄-haltigen Tollwut-Impfstoffes 3 konnten nach einer (1/3) und nach vier Wochen (2/4) **eosinophile Granulozyten** nachgewiesen werden.

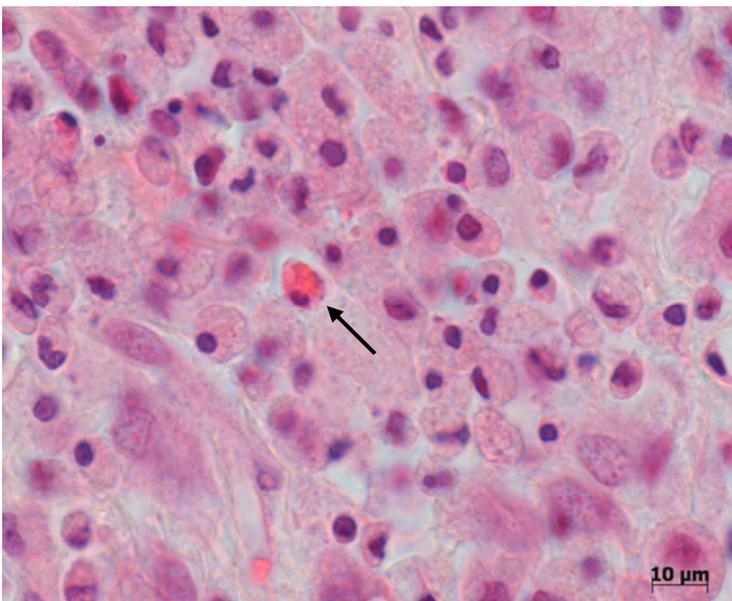
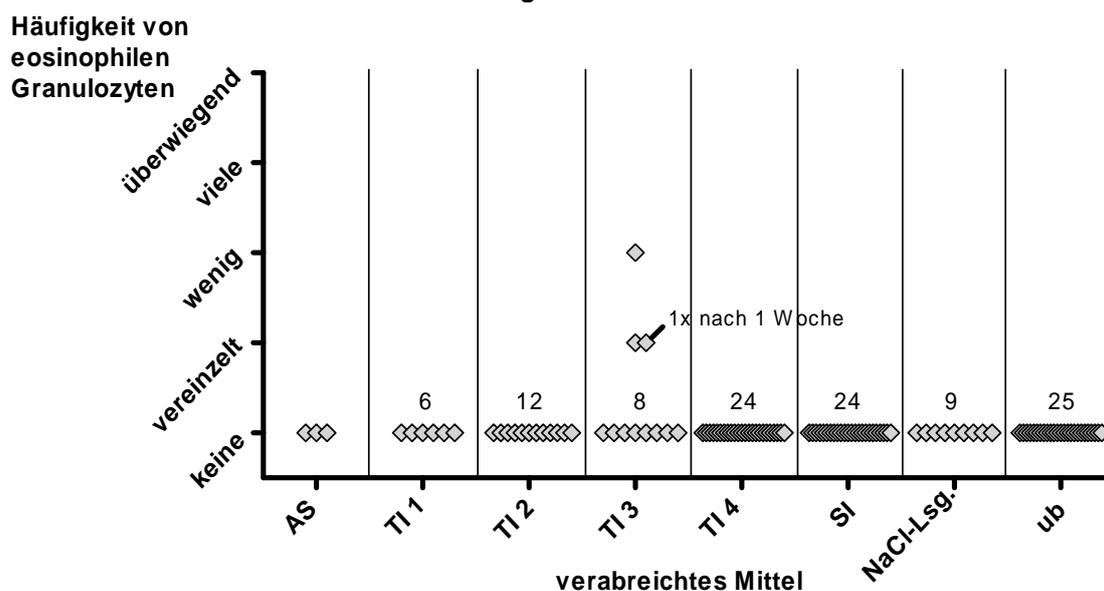


Bild 3.13
Eosinophiler Granulozyt (Pfeil) in der akuten Entzündung eine Woche nach Verabreichung des Tollwut-Impfstoffes 3 (Stamm Pasteur RIV mit AlPO₄). Probe D938, HE

Graph 3.6 Häufigkeit von eosinophilen Granulozyten in den Entzündungszellinfiltraten nach 1 bis 12* Wochen



Graph 3.6 Auftreten von eosinophilen Granulozyten in den unbehandelten Proben und nach Verabreichung der jeweiligen Injektion in der ersten bis zwölften Woche.

* In der 12. Woche konnten keine eosinophilen Granulozyten nachgewiesen werden. Der Wert der 1. Woche ist im Graph beschrieben. Alle unmarkierten Rauten außerhalb der Klasse „keine“ entsprechen den Werten der 4. Woche.

AS: Al(OH)₃-Suspension TI: Tollwut-Impfstoff SI: Staupe-Impfstoff
 ub: unbehandelt NaCl-Lsg.: isotonische Kochsalzlösung

In allen Untersuchungen bezüglich des Auftretens von eosinophilen Granulozyten in den Entzündungszellinfiltraten konnte kein signifikanter Unterschied ermittelt werden (siehe Tabelle 3.23 bis 3.25.) Der p-Wert der Untersuchung der Gruppe apIS im Vergleich zur Gruppe naIS weist jedoch darauf hin, dass bei einer größeren Probenzahl ein signifikanter Unterschied nachweisbar sein könnte (p = 0,0504). Dies begründet sich im vermehrten Vorkommen eosinophiler Granulozyten in den Proben nach Verabreichung des AlPO₄-haltigen Tollwut-Impfstoffes 3 im Vergleich zu den Proben nach Verabreichung des adjuvansfreien Tollwut-Impfstoffes 4.

Tabelle 3.23 Prüfung auf signifikante Unterschiede bezüglich des Auftretens* von eosinophilen Granulozyten im Entzündungszellinfiltrat nach 1 bis 12 Wochen

Vergleich		p-Wert	Test
Gruppe aIS	Gruppe naIS	0,4949	Fisher's exakter Test
Gruppe ahIS	Gruppe naIS	n.a.**	Fisher's exakter Test, korrigiert nach Holm für multiple Vergleiche
Gruppe apIS	Gruppe naIS	0,0504	
Gruppe ahIS	Gruppe apIS	n.a.**	

Gruppe aIS: aluminiumadjuvanshaltige Tollwut Impfstoffe 1, 2 und 3

Gruppe naIS: adjuvansfreier Tollwut-Impfstoff 4

Gruppe ahIS: Al(OH)₃-haltiger Tollwut-Impfstoff 1 und 2

Gruppe apIS: AlPO₄-haltiger Tollwut-Impfstoff 3

* siehe Tabelle 6.4 im Kapitel **6. Tabellen**

n.a.**: nicht ausgewertet, da alle Werte in einer Klasse vorliegen; kein signifikanter Unterschied

Tabelle 3.24 Prüfung auf signifikante Unterschiede bezüglich des Auftretens* Teil 1/2 von eosinophilen Granulozyten nach Verabreichung der jeweiligen Injektionen im Zeitraum der 1. - 12. Woche

Vergleich		p-Wert ¹
Al(OH) ₃ -Suspension	isotonische Kochsalzlösung	n.a.
Al(OH) ₃ -Suspension	Staupe-Impfstoff	n.a.
Al(OH) ₃ -Suspension	Tollwut-Impfstoff 1	1,0000
Al(OH) ₃ -Suspension	Tollwut-Impfstoff 2	1,0000
Al(OH) ₃ -Suspension	Tollwut-Impfstoff 3	1,0000
Al(OH) ₃ -Suspension	Tollwut-Impfstoff 4	1,0000
Al(OH) ₃ -Suspension	unbehandelt	n.a.
unbehandelt	isotonische Kochsalzlösung	n.a.
Staupe-Impfstoff	isotonische Kochsalzlösung	n.a.
Staupe-Impfstoff	unbehandelt	n.a.
Tollwut-Impfstoff 1	isotonische Kochsalzlösung	n.a.
Tollwut-Impfstoff 1	Staupe-Impfstoff	n.a.
Tollwut-Impfstoff 1	Tollwut-Impfstoff 2	1,0000
Tollwut-Impfstoff 1	Tollwut-Impfstoff 3	1,0000
Tollwut-Impfstoff 1	Tollwut-Impfstoff 4	1,0000
Tollwut-Impfstoff 1	unbehandelt	n.a.
Tollwut-Impfstoff 2	isotonische Kochsalzlösung	n.a.
Tollwut-Impfstoff 2	Staupe-Impfstoff	1,0000
Tollwut-Impfstoff 2	Tollwut-Impfstoff 3	1,0000
Tollwut-Impfstoff 2	Tollwut-Impfstoff 4	1,0000
Tollwut-Impfstoff 2	unbehandelt	n.a.
Tollwut-Impfstoff 3	isotonische Kochsalzlösung	1,0000
Tollwut-Impfstoff 3	Staupe-Impfstoff	0,3403
Tollwut-Impfstoff 3	Tollwut-Impfstoff 4	0,3403
Tollwut-Impfstoff 3	unbehandelt	0,3466
Tollwut-Impfstoff 4	isotonische Kochsalzlösung	n.a.
Tollwut-Impfstoff 4	Staupe-Impfstoff	1,0000
Tollwut-Impfstoff 4	unbehandelt	n.a.

Alle Vergleiche mit p-Werten < 0,05 sind statistisch signifikant zum (multiplen) Test-niveau $\alpha = 0,05$.

n.a.: nicht ausgewertet, da nur Werte einer Klasse vorhanden sind; kein signifikanter Unterschied

¹ Fisher's exakter Test, korrigiert nach Holm für multiple Vergleiche.

* siehe Tabelle 6.4 in Kapitel **6. Tabellen**

Ergebnisse

Im Vergleich des Auftretens von eosinophilen Granulozyten in der akuten und in der chronischen Entzündung innerhalb eines verabreichten Mittels konnte kein signifikanter Unterschied ermittelt werden (siehe Tabelle 3.25).

Tabelle 3.25 Vergleich des Auftretens der eosinophilen Granulozyten in der akuten Entzündung (weiß unterlegt)* mit deren Auftreten in der chronischen Entzündung (grau unterlegt)**

Injektion	keine	vereinzelt	wenig	viele	überwiegend	p-Wert ¹
Al(OH) ₃ -Suspension	1					n.a.
	2					
Tollwut-Impfstoff 1	2					n.a.
	4					
Tollwut-Impfstoff 2	4					n.a.
	8					
Tollwut-Impfstoff 3	2	1				1,0000
	6	1	1			
Tollwut-Impfstoff 4	8					n.a.
	16					
Staupe-Impfstoff	8					n.a.
	16					
isotonische Kochsalzlösung	3					n.a.
	6					
unbehandelt	9					n.a.
	16					

¹ Fisher's exakter Test

* nach einer Woche

** nach 4 und 12 Wochen

n. a.: nicht ausgewertet, da alle Werte in einer Klasse vorliegen; kein signifikanter Unterschied

Fibroblasten (Bild 3.14) waren in unterschiedlicher Häufigkeit in vielen Entzündungen vertreten (siehe Graph 3.7 und Graph 3.8).

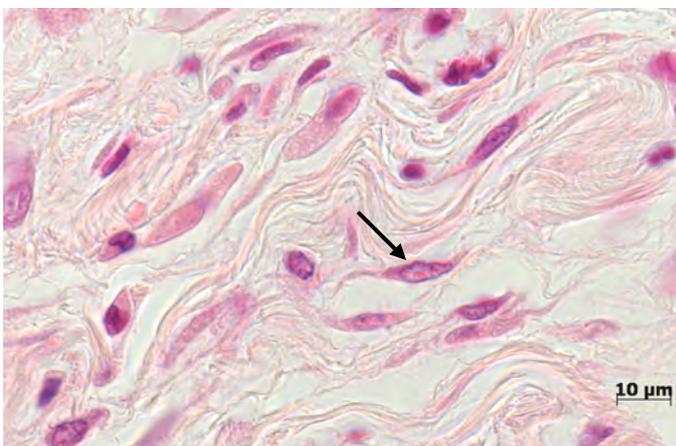
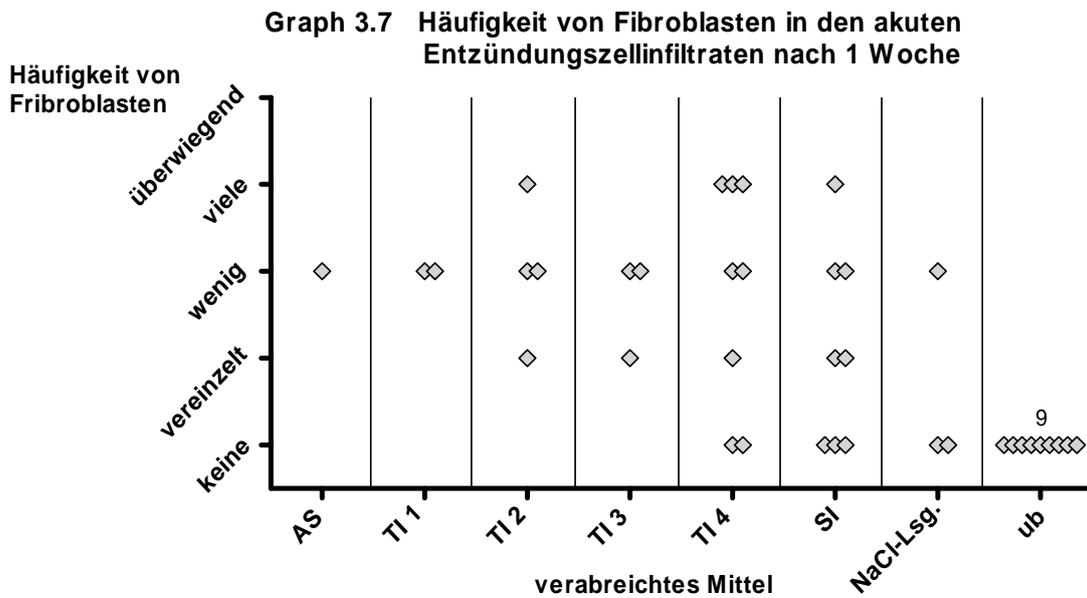


Bild 3.14

Fibroblast (Pfeil) in der chronischen Entzündung vier Wochen nach Verabreichung des Tollwut-Impfstoffes 3 (Stamm Pasteur RIV mit AlPO₄) Probe D983, HE

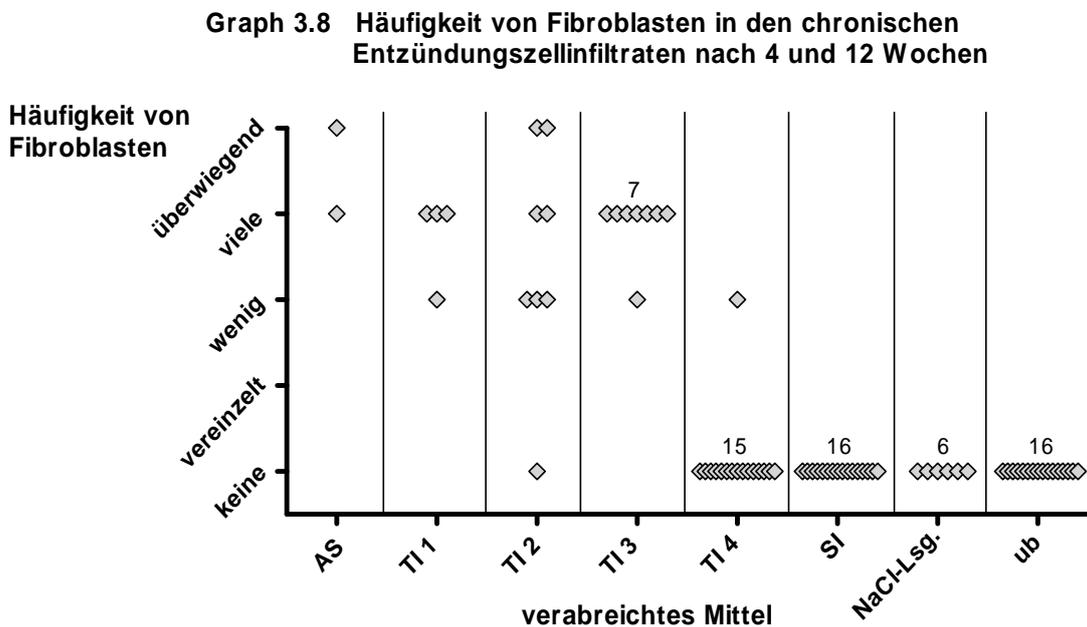
Ergebnisse



Graph 3.7 Auftreten von Fibroblasten in den unbehandelten Proben und nach Verabreichung der jeweiligen Injektion in der ersten Woche.

Legende für Graph 3.7 und 3.8:

AS: Al(OH)₃-Suspension TI: Tollwut-Impfstoff SI: Staupe-Impfstoff
 ub: unbehandelt NaCl-Lsg.: isotonische Kochsalzlösung

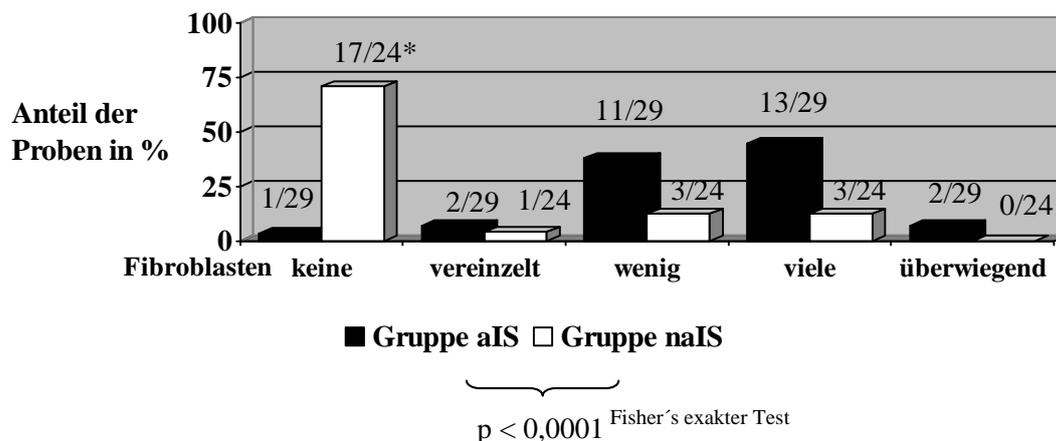


Graph 3.8 Auftreten von Fibroblasten in den unbehandelten Proben und nach Verabreichung der jeweiligen Injektion in der vierten und zwölften Woche.

Im Vergleich der Adjuvansgruppen der Tollwut-Impfstoffe konnten signifikante Unterschiede bezüglich des Auftretens von Fibroblasten ermittelt werden (siehe Diagramm 3.16 bis 3.18).

Ergebnisse

Diagramm 3.16 Auftreten von Fibroblasten im Entzündungszellinfiltrat in der 1. - 12. Woche nach Verabreichung der Tollwut-Impfstoffe

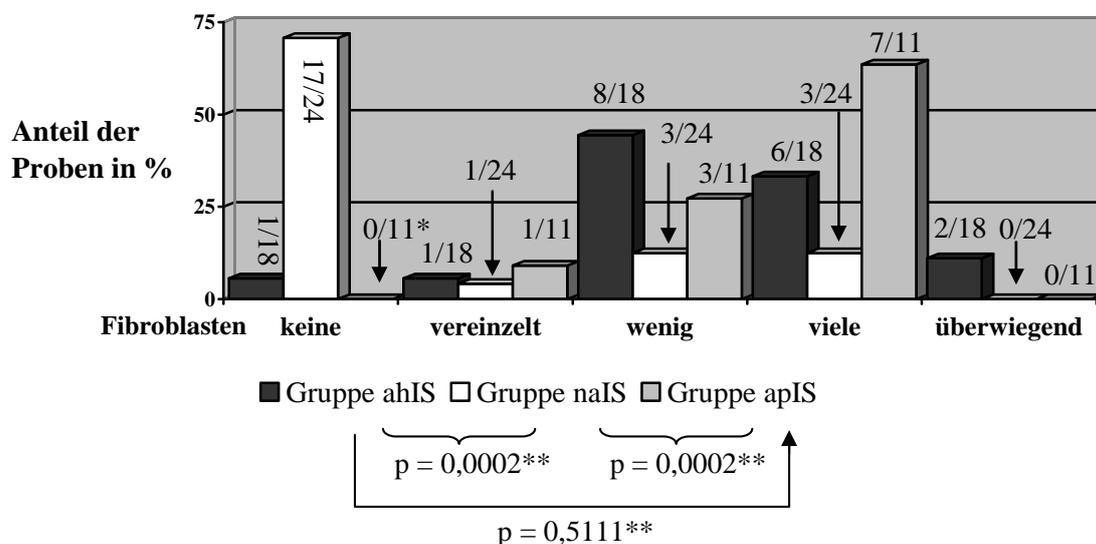


Gruppe aIS: Al-adjuvanshaltige Tollwut-Impfstoffe 1, 2 und 3

Gruppe naIS: adjuvansfreier Tollwut-Impfstoff 4

* 17 von 24 Proben wies die entsprechende Häufigkeit von Fibroblasten auf.

Diagramm 3.17 Auftreten von Fibroblasten im Entzündungszellinfiltrat in der 1. - 12. Woche nach Verabreichung der Tollwut-Impfstoffe



Gruppe ahIS: Al(OH)₃-haltige Tollwut-Impfstoffe 1 und 2

Gruppe naIS: adjuvansfreier Tollwut-Impfstoff 4

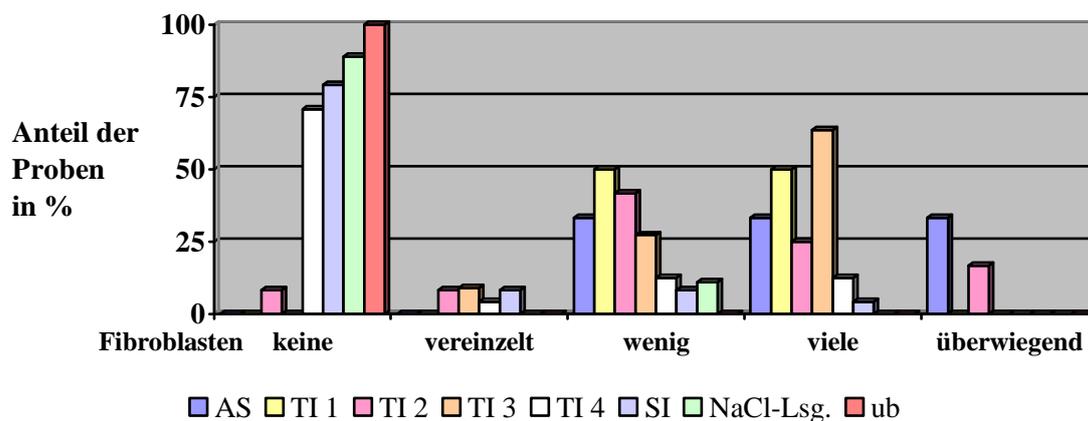
Gruppe apIS: AlPO₄-haltiger Tollwut-Impfstoff 3

* 0 von 11 Proben wiesen die entsprechende Häufigkeit von Fibroblasten auf.

** Fisher's exakter Test, korrigiert nach Holm für multiple Vergleiche

Im Vergleich der Werte nach Verabreichung der jeweiligen Injektionen konnten signifikante Unterschiede ermittelt werden (siehe Diagramm 3.18 und Tabelle 3.26). Zur Erhaltung der Übersichtlichkeit wurde auf das Eintragen der signifikanten p-Werte im Diagramm 3.18 verzichtet.

Diagramm 3.18 Auftreten von Fibroblasten im Entzündungszellinfiltrat in der 1. - 12. Woche nach Verabreichung der jeweiligen Injektion



AS: Al(OH)₃-Suspension TI: Tollwut-Impfstoff SI: Staupe-Impfstoff
 ub: unbehandelt NaCl-Lsg.: isotonische Kochsalzlösung
 p-Werte siehe Tabelle 3.17

Tabelle 3.26 Prüfung auf signifikante Unterschiede bezüglich des Auftretens* von Fibroblasten nach Verabreichung der jeweiligen Injektion im Zeitraum der 1. - 12. Woche

Vergleich		p-Wert ¹
Al(OH) ₃ -Suspension	isotonische Kochsalzlösung	0,2364
Al(OH) ₃ -Suspension	Staupe-Impfstoff	0,2106
Al(OH) ₃ -Suspension	Tollwut-Impfstoff 1	1,0000
Al(OH) ₃ -Suspension	Tollwut-Impfstoff 2	1,0000
Al(OH) ₃ -Suspension	Tollwut-Impfstoff 3	1,0000
Al(OH) ₃ -Suspension	Tollwut-Impfstoff 4	0,2708
Al(OH) ₃ -Suspension	unbehandelt	0,0064
unbehandelt	isotonische Kochsalzlösung	1,0000
Staupe-Impfstoff	isotonische Kochsalzlösung	1,0000
Staupe-Impfstoff	unbehandelt	0,2675
Tollwut-Impfstoff 1	isotonische Kochsalzlösung	0,0252
Tollwut-Impfstoff 1	Staupe-Impfstoff	0,0087
Tollwut-Impfstoff 1	Tollwut-Impfstoff 2	1,0000
Tollwut-Impfstoff 1	Tollwut-Impfstoff 3	1,0000
Tollwut-Impfstoff 1	Tollwut-Impfstoff 4	0,0614
Tollwut-Impfstoff 1	unbehandelt	<0,0001
Tollwut-Impfstoff 2	isotonische Kochsalzlösung	0,0372
Tollwut-Impfstoff 2	Staupe-Impfstoff	0,0017
Tollwut-Impfstoff 2	Tollwut-Impfstoff 3	1,0000
Tollwut-Impfstoff 2	Tollwut-Impfstoff 4	0,0157
Tollwut-Impfstoff 2	unbehandelt	<0,0001
Tollwut-Impfstoff 3	isotonische Kochsalzlösung	0,0013
Tollwut-Impfstoff 3	Staupe-Impfstoff	0,0001
Tollwut-Impfstoff 3	Tollwut-Impfstoff 4	0,0023
Tollwut-Impfstoff 3	unbehandelt	<0,0001
Tollwut-Impfstoff 4	isotonische Kochsalzlösung	1,0000
Tollwut-Impfstoff 4	Staupe-Impfstoff	1,0000
Tollwut-Impfstoff 4	unbehandelt	0,0645

Alle Vergleiche mit p-Werten < 0,05 sind statistisch signifikant zum (multiplen) Test-niveau $\alpha = 0,05$.

¹ Fisher's exakter Test, korrigiert nach Holm für multiple Vergleiche.

* siehe Tabelle 6.5 im Kapitel **6. Tabellen**

Ergebnisse

Auch bezüglich des Auftretens von Fibroblasten in der akuten und chronischen Entzündung innerhalb einer Behandlungsgruppe gab es signifikante Unterschiede (siehe Tabelle 3.27). Während sich das Vorkommen von Fibroblasten in den Entzündungszellinfiltraten nach Verabreichung des AlPO₄-haltigen Tollwut-Impfstoffes 3 in den chronischen Entzündungen gegenüber den akuten steigerte, verringerte sich die Häufigkeit in den chronischen Entzündungen nach Verabreichung des adjuvansfreien Tollwut-Impfstoffes 4 und des adjuvansfreien Staupe-Impfstoffes signifikant.

Tabelle 3.27 Vergleich des Auftretens von Fibroblasten in der akuten Entzündung* (weiß unterlegt) mit deren Auftreten in der chronischen Entzündung (grau unterlegt) (Angabe der Probenzahl)**

Injektion	keine	vereinzelt	wenig	viele	überwiegend	p-Wert ¹
Al(OH) ₃ -Suspension			1			n.a. ²
Tollwut-Impfstoff 1			2			n.a. ²
Tollwut-Impfstoff 2		1	2	1		0,8788
Tollwut-Impfstoff 3		1	2			0,0242
Tollwut-Impfstoff 4	2	1	2	3		0,0013
Staupe-Impfstoff	3	2	2	1		0,0013
isotonische Kochsalzlösung	2		1			0,3333
unbehandelt	9					n.a. ³

¹ Fisher's exakter Test * nach einer Woche ** nach 4 und 12 Wochen
n.a.²: nicht ausgewertet, da für den Vergleich zu schwach besetzt
n.a.³: nicht ausgewertet, da alle Werte in einer Klasse vorliegen; kein signifikanter Unterschied

Auf alle Proben bezogen, waren **Fibrozyten** (Bild 3.15) relativ selten vermehrt im Gewebe vertreten (siehe Graph 3.9 und Graph 3.10). Bewertet wurden Fibrozyten, die zirkulär um das Entzündungszellinfiltrat lagen.

Ergebnisse

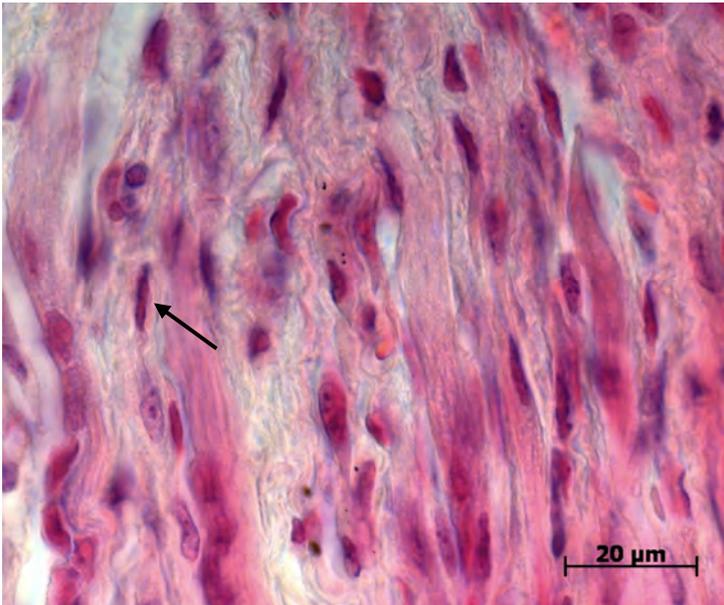
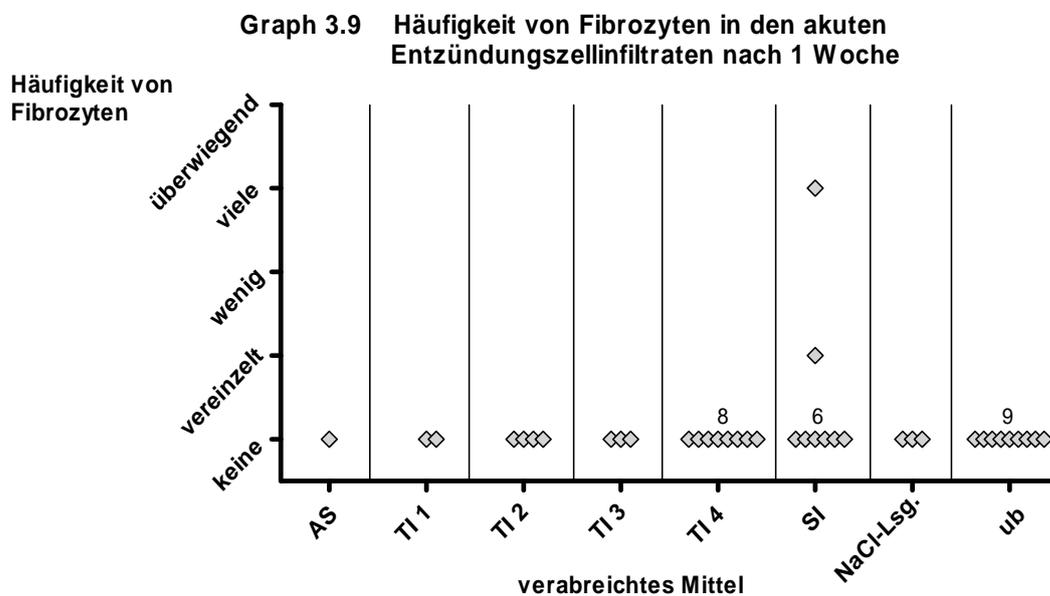


Bild 3.15

Fibrozyt (Pfeil) in der akuten Entzündung eine Woche nach Verabreichung der $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Suspension. Probe D157, HE



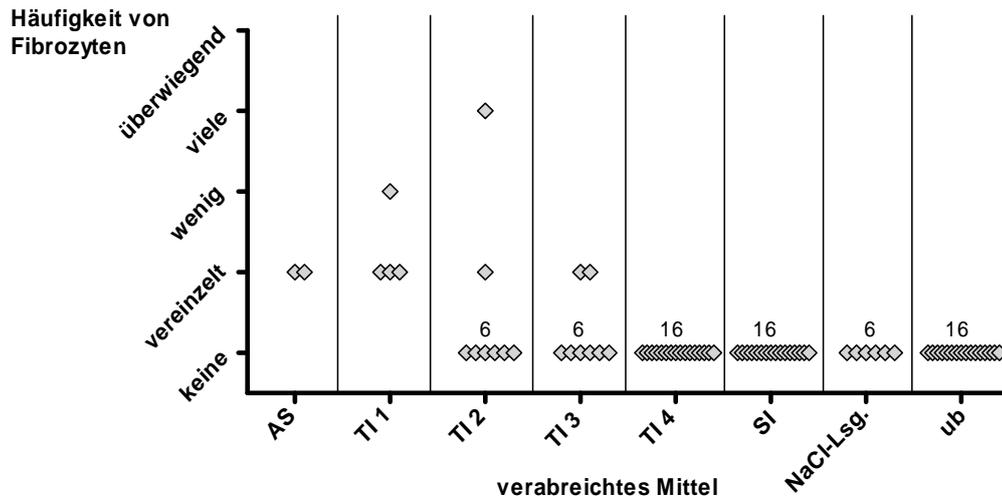
Graph 3.9 Auftreten von Fibrozyten in den unbehandelten Proben und nach Verabreichung der jeweiligen Injektion in der ersten Woche. Bewertet wurden Fibrozyten, die zirkulär um das Entzündungszellinfiltrat lagen.

AS: $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Suspension TI: Tollwut-Impfstoff SI: Staupe-Impfstoff
ub: unbehandelt NaCl-Lsg.: isotonische Kochsalzlösung

Unter Berücksichtigung der im Entzündungszellinfiltrat vorgefundenen gerichtet gelegenen Fibrozyten stellt sich bei Betrachtung dieser Befunde die Frage, wie die Zellen innerhalb von einer Woche proliferieren und wieder in den Ruhezustand kommen können und somit als Fibrozyten im Entzündungszellinfiltrat nachgewiesen werden. Aus diesem Grund kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Ansammlung der Fibrozyten in der ersten Woche von einem Reiz hervorgerufen wurde, der vor der Impfung stattgefunden hat.

Ergebnisse

Graph 3.10 Häufigkeit von Fibrozyten in den chronischen Entzündungszellinfiltraten nach 4 und 12 Wochen

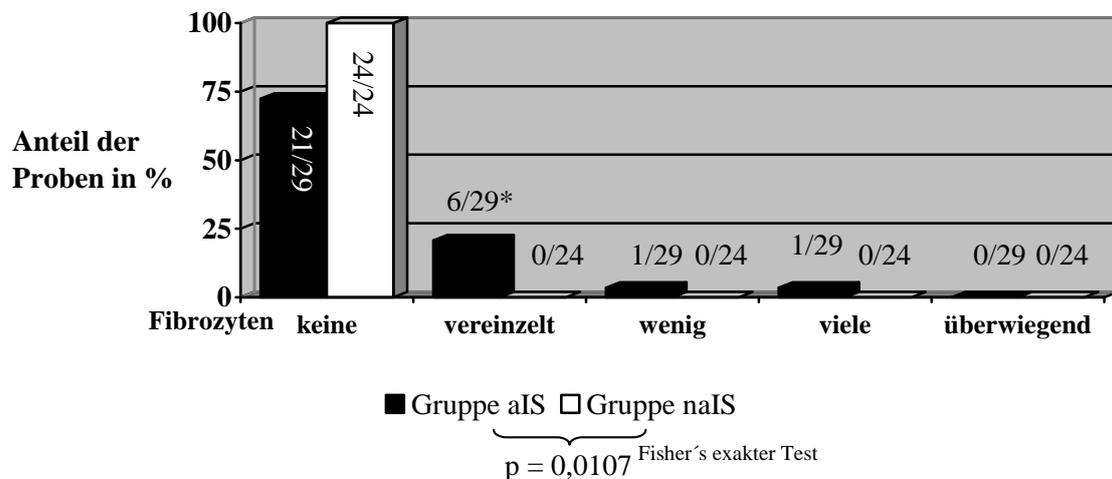


Graph 3.10 Auftreten von Fibrozyten in den unbehandelten Proben und nach Verabreichung der jeweiligen Injektion in der vierten und zwölften Woche. Bewertet wurden Fibrozyten, die zirkulär um das Entzündungszellinfiltrat lagen.

AS: Al(OH)₃-Suspension TI: Tollwut-Impfstoff SI: Staupe-Impfstoff
ub: unbehandelt NaCl-Lsg.: isotonische Kochsalzlösung

Im Vergleich der unterschiedlichen Adjuvansgruppen der Tollwut-Impfstoffe gab es bezüglich des Auftretens von Fibrozyten signifikante Unterschiede (siehe Diagramm 3.19 und 3.20).

Diagramm 3.19 Auftreten von Fibrozyten im Entzündungszellinfiltrat in der 1. - 12. Woche nach Verabreichung der Tollwut-Impfstoffe



Gruppe aIS: Al-adjuvanshaltige Tollwut-Impfstoffe 1, 2 und 3

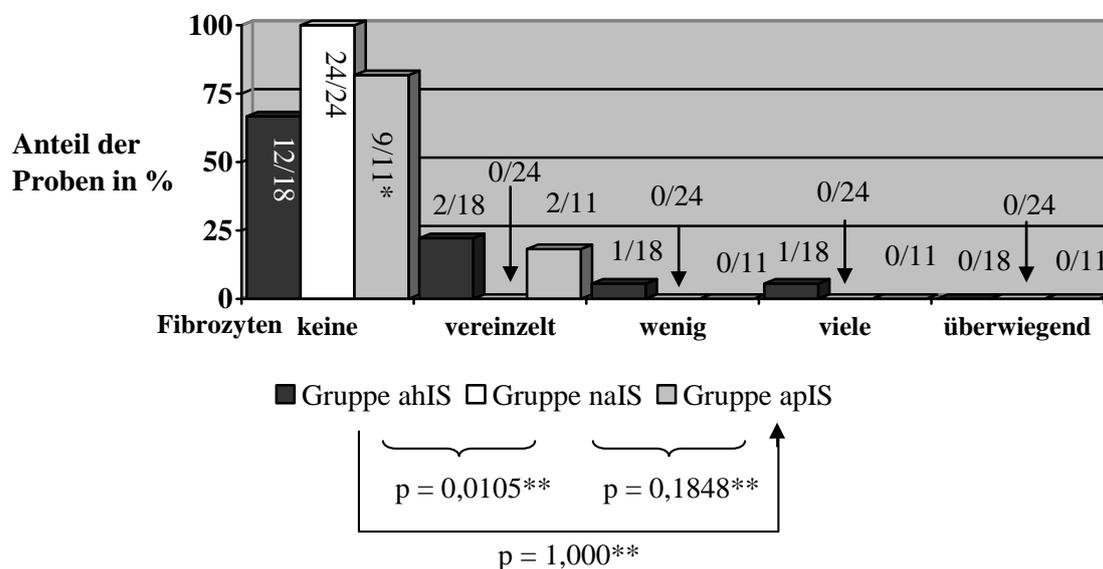
Gruppe naIS: adjuvansfreier Tollwut-Impfstoff 4

* 6 von 29 Proben wiesen die entsprechende Häufigkeit von Fibrozyten auf. Bewertet wurden Fibrozyten, die zirkulär um das Entzündungszellinfiltrat lagen.

Ergebnisse

Der Vergleich zeigt, dass sich nach Verabreichung der aluminiumadjuvanshaltigen Tollwut-Impfstoffe deutlich mehr Fibrozyten im Bereich der Applikationsstelle befanden als nach Verabreichung des adjuvansfreien Tollwut-Impfstoffes. Bei Betrachtung der einzelnen Adjuvansgruppen konnte der signifikante Unterschied bezüglich des Vorkommens von Fibrozyten dem Vergleich der Proben nach Verabreichung der Al(OH)₃-haltigen Tollwut-Impfstoffe 1 und 2 mit den Proben nach Verabreichung des adjuvansfreien Tollwut-Impfstoffes 4 zugeordnet werden (siehe Diagramm 3.20).

Diagramm 3.20 Auftreten von Fibrozyten im Entzündungszellinfiltrat in der 1. - 12. Woche nach Verabreichung der Tollwut-Impfstoffe



Gruppe ahIS: Al(OH)₃-haltige Tollwut-Impfstoffe 1 und 2

Gruppe naIS: adjuvansfreier Tollwut-Impfstoff 4

Gruppe apIS: AlPO₄-haltiger Tollwut-Impfstoff 3

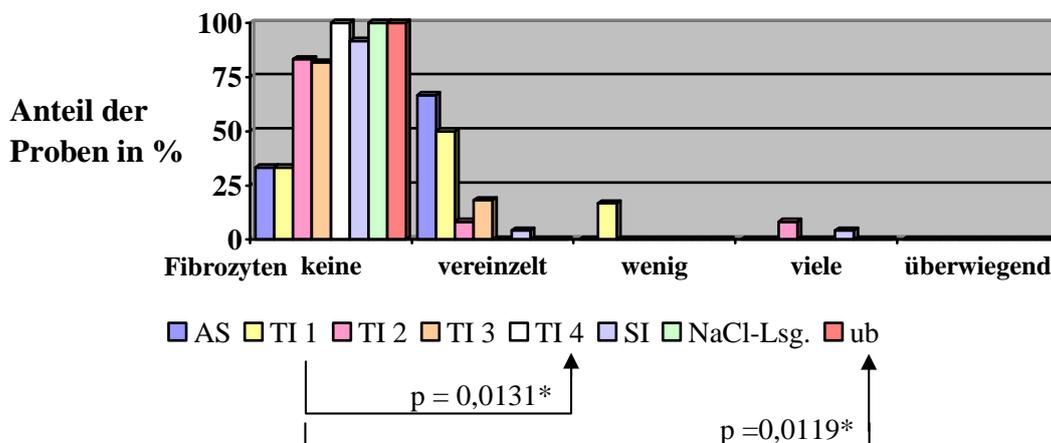
* 9 von 11 Proben wiesen die entsprechende Häufigkeit von Fibrozyten auf.

** Fisher's exakter Test, korrigiert nach Holm für multiple Vergleiche

Bewertet wurden Fibrozyten, die zirkulär um das Entzündungszellinfiltrat lagen.

Bei der Untersuchung zum Vorkommen von Fibrozyten in den Entzündungszellinfiltraten der 1.-12. Woche nach Verabreichung der jeweiligen Injektionen konnten für den Vergleich der Proben nach Verabreichung des Al(OH)₃-haltigen Tollwut-Impfstoffes 1 mit den Proben nach Verabreichung des adjuvansfreien Tollwut-Impfstoffes 4 ($p = 0,0131$) sowie mit den unbehandelten Proben ($p = 0,0119$) signifikante Unterschiede ermittelt werden (siehe Diagramm 3.21 und Tabelle 3.28).

Diagramm 3.21 Auftreten von Fibrozyten im Entzündungszellinfiltrat in der 1. - 12. Woche nach Verabreichung der jeweiligen Injektion



Bewertet wurden Fibrozyten, die zirkulär um das Entzündungszellinfiltrat lagen.
 * Fisher's exakter Test, korrigiert nach Holm für multiple Vergleiche
 AS: Al(OH)₃-Suspension TI: Tollwut-Impfstoff SI: Staupe-Impfstoff
 ub: unbehandelt NaCl-Lsg.: isotonische Kochsalzlösung
 p-Werte siehe Tabelle 3.28

Tabelle 3.28 Prüfung auf signifikante Unterschiede bezüglich des Auftretens* von Fibrozyten nach Verabreichung der jeweiligen Injektion im Zeitraum der 1. - 12. Woche
 Teil 1/2

Vergleich		p-Wert ¹
Al(OH)-Suspension	isotonische Kochsalzlösung	0,8182
Al(OH)-Suspension	Staupe-Impfstoff	0,8253
Al(OH)-Suspension	Tollwut-Impfstoff 1	1,0000
Al(OH)-Suspension	Tollwut-Impfstoff 2	1,0000
Al(OH)-Suspension	Tollwut-Impfstoff 3	1,0000
Al(OH)-Suspension	Tollwut-Impfstoff 4	0,1795
Al(OH)-Suspension	unbehandelt	0,1746
unbehandelt	isotonische Kochsalzlösung	n.a.
Staupe-Impfstoff	isotonische Kochsalzlösung	1,0000
Staupe-Impfstoff	unbehandelt	1,0000
Tollwut-Impfstoff 1	isotonische Kochsalzlösung	0,2198
Tollwut-Impfstoff 1	Staupe-Impfstoff	0,1018
Tollwut-Impfstoff 1	Tollwut-Impfstoff 2	0,6827
Tollwut-Impfstoff 1	Tollwut-Impfstoff 3	1,0000
Tollwut-Impfstoff 1	Tollwut-Impfstoff 4	0,0131
Tollwut-Impfstoff 1	unbehandelt	0,0119
Tollwut-Impfstoff 2	isotonische Kochsalzlösung	1,0000
Tollwut-Impfstoff 2	Staupe-Impfstoff	1,0000
Tollwut-Impfstoff 2	Tollwut-Impfstoff 3	1,0000
Tollwut-Impfstoff 2	Tollwut-Impfstoff 4	1,0000
Tollwut-Impfstoff 2	unbehandelt	1,0000

Alle Vergleiche mit p-Werten < 0,05 sind statistisch signifikant zum (multiplen) Testniveau $\alpha = 0,05$.

n.a.: nicht ausgewertet, da alle Werte in einer Klasse vorliegen; kein signifikanter Unterschied

¹ Fisher's exakter Test, korrigiert nach Holm für multiple Vergleiche

* siehe Tabelle 6.6 im Kapitel **6. Tabellen**

Tabelle 3.28 Prüfung auf signifikante Unterschiede bezüglich des Auftretens* von Fibrozyten nach Verabreichung der jeweiligen Injektion im Zeitraum der 1. - 12. Woche

Vergleich		p-Wert ¹
Tollwut-Impfstoff 3	isotonische Kochsalzlösung	1,0000
Tollwut-Impfstoff 3	Staupe-Impfstoff	1,0000
Tollwut-Impfstoff 3	Tollwut-Impfstoff 4	1,0000
Tollwut-Impfstoff 3	unbehandelt	1,0000
Tollwut-Impfstoff 4	isotonische Kochsalzlösung	n.a.
Tollwut-Impfstoff 4	Staupe-Impfstoff	1,0000
Tollwut-Impfstoff 4	unbehandelt	n.a.

Alle Vergleiche mit p-Werten < 0,05 sind statistisch signifikant zum (multiplen) Testniveau $\alpha = 0,05$.

* siehe Tabelle 6.6 im Kapitel **6. Tabellen**

¹ Fisher's exakter Test, korrigiert nach Holm für multiple Vergleiche

n.a.: nicht ausgewertet, da alle Werte in einer Klasse vorliegen; kein signifikanter Unterschied

Der Vergleich der Infiltrate der akuten mit denen der chronischen Entzündungen innerhalb einer Behandlungsgruppe erbrachte keinen signifikanten Unterschied bezüglich des Auftretens von Fibrozyten (siehe Tabelle 3.29)

Tabelle 3.29 Vergleich des Auftretens von Fibrozyten in der akuten Entzündung* (weiß unterlegt) mit deren Auftreten in der chronischen Entzündung (grau unterlegt) (Angabe der Probenzahl)**

Injektion	keine	vereinzelt	wenig	viele	überwiegend	p-Wert ¹
Al(OH) ₃ -Suspension	1	2				0,3333
Tollwut-Impfstoff 1	2	3	1			0,0667
Tollwut-Impfstoff 2	4	6	1	1		1,0000
Tollwut-Impfstoff 3	3	6	2			1,0000
Tollwut-Impfstoff 4	8	16				n.a.
Staupe-Impfstoff	6	16	1	1		0,1014
isotonische Kochsalzlösung	3	6				n.a.
unbehandelt	9	16				n.a.

¹ Fisher's exakter Test

* nach einer Woche

** nach 4 und 12 Wochen

n.a.: nicht ausgewertet, da alle Werte in einer Klasse vorliegen; kein signifikanter Unterschied

Ergebnisse

In allen Entzündungen ist der Anteil der **Lymphozyten** (Bild 3.16) unabhängig vom Impfstoff in der akuten Entzündung höher als in der chronischen.

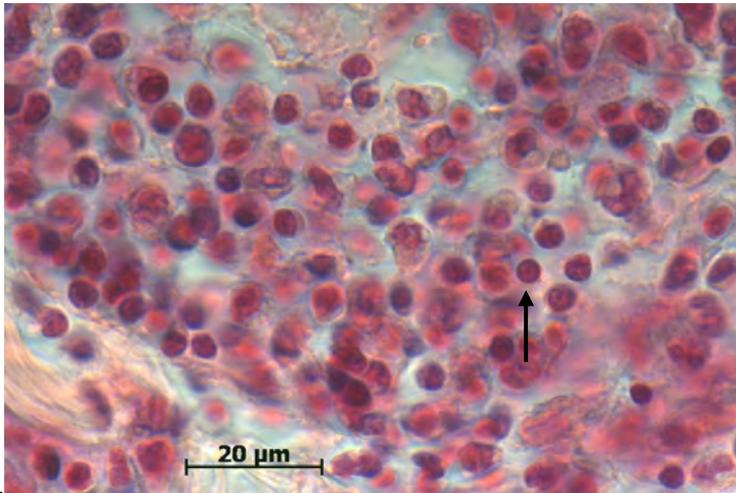
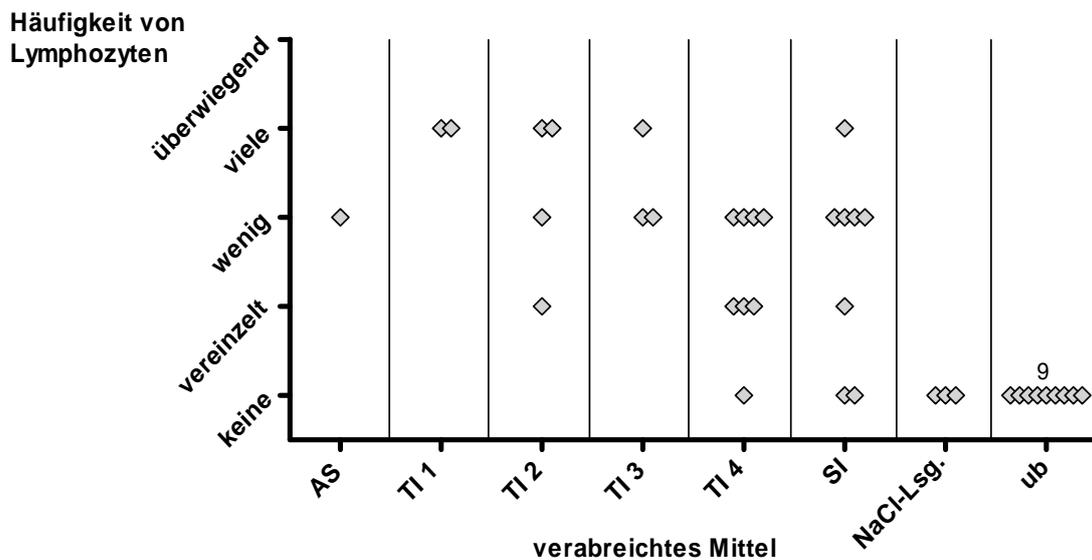


Bild 3.16

Lymphozyt (Pfeil) in der akuten Entzündung eine Woche nach Verabreichung des Tollwut-Impfstoffes 1 [Virus fixe, Stamm G52 mit $\text{Al}(\text{OH})_3$].
Probe D173, HE

Graph 3.11 Häufigkeit von Lymphozyten in den akuten Entzündungszellinfiltraten nach 1 Woche

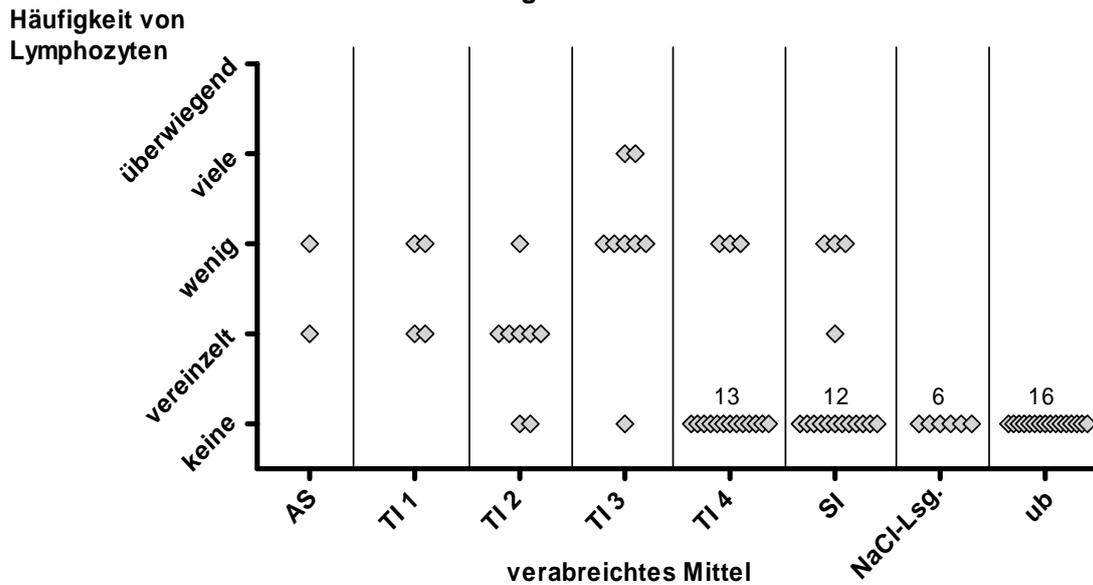


Graph 3.11 Auftreten von Lymphozyten in den unbehandelten Proben und nach Verabreichung der jeweiligen Injektion in der ersten Woche.

AS: $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Suspension TI: Tollwut-Impfstoff SI: Staupe-Impfstoff
ub: unbehandelt NaCl-Lsg.: isotonische Kochsalzlösung

Ergebnisse

Graph 3.12 Häufigkeit von Lymphozyten in den chronischen Entzündungszellinfiltraten nach 4 und 12 Wochen



Graph 3.13 Auftreten von Lymphozyten in den unbehandelten Proben und nach Verabreichung der jeweiligen Injektion in der vierten und zwölften Woche.

AS: Al(OH)₃-Suspension
ub: unbehandelt

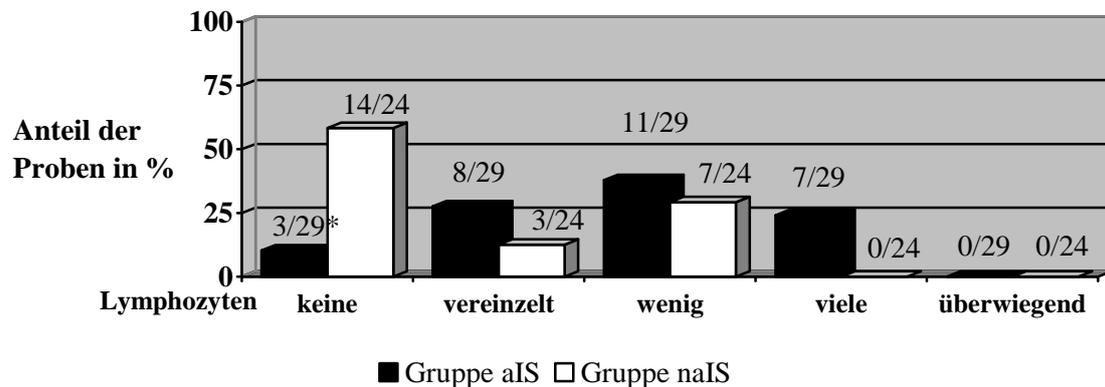
TI: Tollwut-Impfstoff

SI: Staupe-Impfstoff

NaCl-Lsg.: isotonische Kochsalzlösung

Beim Vergleich der Adjuvansgruppen der Tollwut-Impfstoffe konnten signifikante Unterschiede bezüglich der Anwesenheit von Lymphozyten im Entzündungsinfiltrat ermittelt werden (siehe Diagramm 3.22 und Diagramm 3.23).

Diagramm 3.22 Auftreten von Lymphozyten im Entzündungszellinfiltrat in der 1. - 12. Woche nach Verabreichung der Tollwut-Impfstoffe



p = 0,0004 Fisher's exakter Test

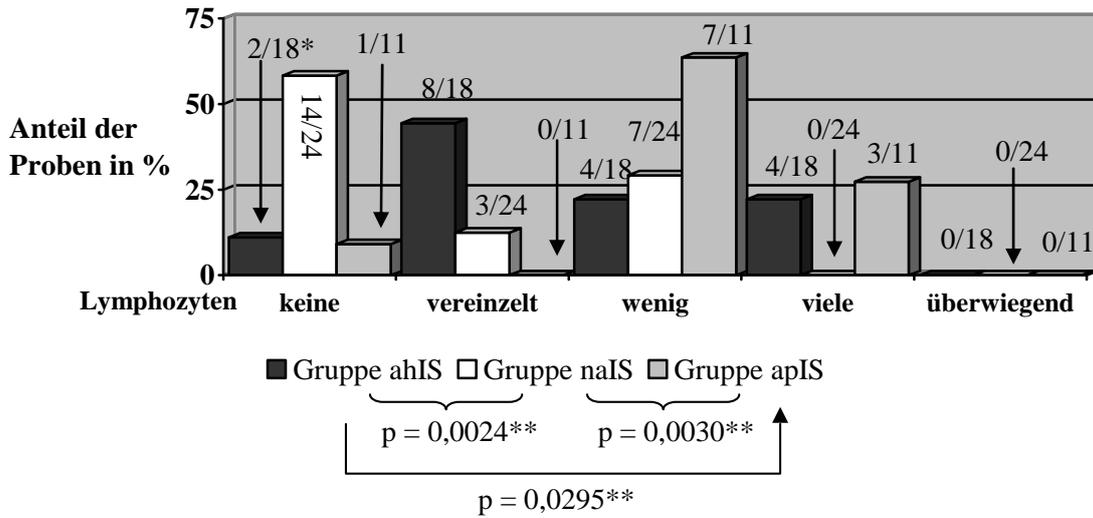
Gruppe aIS: Al-adjuvanshaltige Tollwut-Impfstoffe 1, 2 und 3

Gruppe naIS: adjuvansfreier Tollwut-Impfstoff 4

* 3 von 29 Proben wies die entsprechende Häufigkeit von Lymphozyten auf.

Ergebnisse

Diagramm 3.23 Auftreten von Lymphozyten im Entzündungszellinfiltrat in der 1.-12. Woche nach Verabreichung der Tollwut-Impfstoffe



Gruppe ahIS: Al(OH)₃-haltige Tollwut-Impfstoffe 1 und 2

Gruppe naIS: adjuvansfreier Tollwut-Impfstoff 4

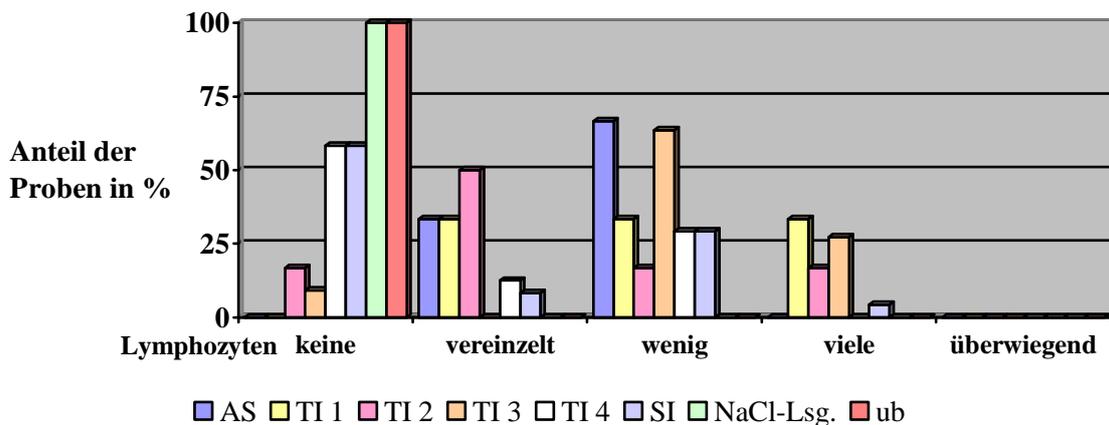
Gruppe apIS: AlPO₄-haltiger Tollwut-Impfstoff 3

* 2 von 18 Proben wiesen die entsprechende Häufigkeit von Lymphozyten auf.

** Fisher's exakter Test, korrigiert nach Holm für multiple Vergleiche

Beim Vergleich der Proben nach Verabreichung der jeweiligen Injektion konnten bezüglich des Auftretens von Lymphozyten signifikante Unterschiede ermittelt werden (siehe Diagramm 3.24 und Tabelle 3.30).

Diagramm 3.24 Auftreten von Lymphozyten im Entzündungszellinfiltrat in der 1. - 12. Woche nach Verabreichung der jeweiligen Injektion



AS: Al(OH)₃-Suspension

TI: Tollwut-Impfstoff

SI: Staupe-Impfstoff

ub: unbehandelt

NaCl-Lsg.: isotonische Kochsalzlösung

p-Werte siehe Tabelle 3.30

Ergebnisse

Im Vergleich der Werte nach Verabreichung der Al(OH)₃-Suspension mit den Werten nach Verabreichung der isotonischen Kochsalzlösung konnte eine Tendenz, aber keine Signifikanz ermittelt werden. Dies gilt auch für den Vergleich der Werte nach Verabreichung des Al(OH)₃-haltigen Tollwut-Impfstoffes 2 mit den Werten nach Verabreichung des adjuvansfreien Staupe- und des adjuvansfreien Tollwut-Impfstoffes 4. Auch nach Verabreichung des AlPO₄-haltigen Tollwut-Impfstoffes 3 gab es im Vergleich zum adjuvansfreien Staupe-Impfstoff eine Tendenz, aber keine Signifikanz (siehe Tabelle 3.30).

Tabelle 3.30 Prüfung auf signifikante Unterschiede bezüglich des Auftretens* von Lymphozyten nach Verabreichung der jeweiligen Injektion im Zeitraum der 1. - 12. Woche

Vergleich		p-Wert ¹
Al(OH) ₃ -Suspension	isotonische Kochsalzlösung	0,0727
Al(OH) ₃ -Suspension	Staupe-Impfstoff	1,0000
Al(OH) ₃ -Suspension	Tollwut-Impfstoff 1	1,0000
Al(OH) ₃ -Suspension	Tollwut-Impfstoff 2	1,0000
Al(OH) ₃ -Suspension	Tollwut-Impfstoff 3	1,0000
Al(OH) ₃ -Suspension	Tollwut-Impfstoff 4	1,0000
Al(OH) ₃ -Suspension	unbehandelt	0,0061
unbehandelt	isotonische Kochsalzlösung	n.a.
Staupe-Impfstoff	isotonische Kochsalzlösung	1,0000
Staupe-Impfstoff	unbehandelt	0,0051
Tollwut-Impfstoff 1	isotonische Kochsalzlösung	0,0046
Tollwut-Impfstoff 1	Staupe-Impfstoff	0,1105
Tollwut-Impfstoff 1	Tollwut-Impfstoff 2	1,0000
Tollwut-Impfstoff 1	Tollwut-Impfstoff 3	1,0000
Tollwut-Impfstoff 1	Tollwut-Impfstoff 4	0,0427
Tollwut-Impfstoff 1	unbehandelt	<0,0001
Tollwut-Impfstoff 2	isotonische Kochsalzlösung	0,0085
Tollwut-Impfstoff 2	Staupe-Impfstoff	0,0896
Tollwut-Impfstoff 2	Tollwut-Impfstoff 3	0,1817
Tollwut-Impfstoff 2	Tollwut-Impfstoff 4	0,0843
Tollwut-Impfstoff 2	unbehandelt	<0,0001
Tollwut-Impfstoff 3	isotonische Kochsalzlösung	0,0029
Tollwut-Impfstoff 3	Staupe-Impfstoff	0,0757
Tollwut-Impfstoff 3	Tollwut-Impfstoff 4	0,0268
Tollwut-Impfstoff 3	unbehandelt	<0,0001
Tollwut-Impfstoff 4	isotonische Kochsalzlösung	0,6908
Tollwut-Impfstoff 4	Staupe-Impfstoff	1,0000
Tollwut-Impfstoff 4	unbehandelt	0,0051

Alle Vergleiche mit p-Werten < 0,05 sind statistisch signifikant zum (multiplen) Test-niveau $\alpha = 0,05$.

¹ Fisher's exakter Test, korrigiert nach Holm für multiple Vergleiche

n.a.: nicht ausgewertet, da alle Werte in einer Klasse vorliegen; kein signifikanter Unterschied

* siehe Tabelle 6.7 im Kapitel **6. Tabellen.**

Im Vergleich der akuten Entzündung in der ersten Woche mit der chronischen Entzündung der 4. und 12. Woche innerhalb einer Behandlungsgruppe wurden signifikante Unterschiede bezüglich des Vorkommens von Lymphozyten ermittelt (siehe Tabelle 3.31).

Tabelle 3.31 Auftreten der Lymphozyten in der akuten Entzündung* weiß unterlegt) mit deren Auftreten in der chronischen Entzündung (grau unterlegt) (Angabe der Probenzahl)**

Injektion	keine	vereinzelt	wenig	viele	überwiegend	p-Wert ¹
Al(OH) ₃ -Suspension			1			n.a. ²
		1	1			
Tollwut-Impfstoff 1				2		n.a. ²
		2	2			
Tollwut-Impfstoff 2		1	1	2		0,1758
	2	5	1			
Tollwut-Impfstoff 3			2	1		1,0000
	1		5	2		
Tollwut-Impfstoff 4	1	3	4			0,0011
	13		3			
Staupe-Impfstoff	2	1	4	1		0,0520
	12	1	3			
isotonische Kochsalzlösung	3					n.a. ³
	6					
unbehandelt	9					n.a. ³
	16					

¹ Fishers exakter Test

* nach einer Woche

** nach 4 und 12 Wochen

n.a.²: nicht ausgewertet, da für den Vergleich zu schwach besetzt

n.a.³: nicht ausgewertet, da alle Werte in einer Klasse vorliegen; kein signifikanter Unterschied

Auffallend war auch die **perivaskuläre Lymphozyteninfiltration** (Bild 3.17 und Tabelle 3.32).

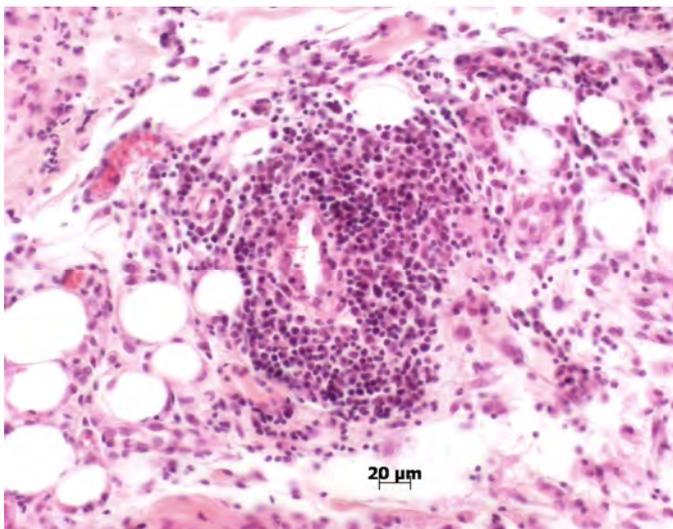


Bild 3.17

perivaskuläre Lymphozyteninfiltration in der akuten Entzündung eine Woche nach Verabreichung des Tollwut-Impfstoffes 1 [Virus fixe, Stamm G52 mit Al(OH)₃]. Probe D173, HE

Tabelle 3.32 Vorkommen von Lymphozyteninfiltraten nach Verabreichung der Al(OH)₃-Suspension und der Tollwut-Impfstoffe 1 - 4

Präparat	Ly.-Inf.	ja			nein			n	Adjuvans
	Woche	1	4	12	1	4	12		
Al(OH) ₃ -Suspension		-	-	-	1	1	1	3	Al(OH) ₃
Tollwut-Impfstoff 1		1	-	-	1	2	2	6	Al(OH) ₃
Tollwut-Impfstoff 2		1	1	1	3	3	3	12	Al(OH) ₃
Tollwut-Impfstoff 3		-	3	1	4	1	3	12	AlPO ₄
Tollwut-Impfstoff 4		1	1	-	7	7	8	24	--
unbehandelt		-	-	-	-	-	-	25	--

Ly.-Inf.: Lymphozyteninfiltrate n: Probenzahl

Auffallend viele **Plasmazellen** (Bild 3.18) konnten in den Entzündungszellinfiltraten nach Verabreichung des AlPO₄-haltigen Tollwut-Impfstoffes 3 nachgewiesen werden (siehe Graph 3.13 und Graph 3.14). Die Untersuchungen zum Vorkommen der Plasmazellen in den Entzündungszellinfiltraten nach Verabreichung der Tollwut-Impfstoffe 1 bis 4 werden in den Diagrammen 3.25 und 3.26 dargestellt.

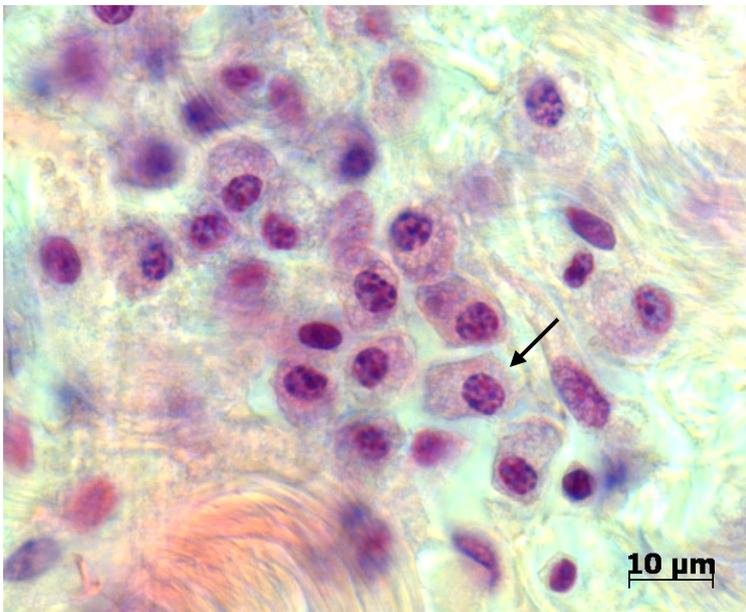
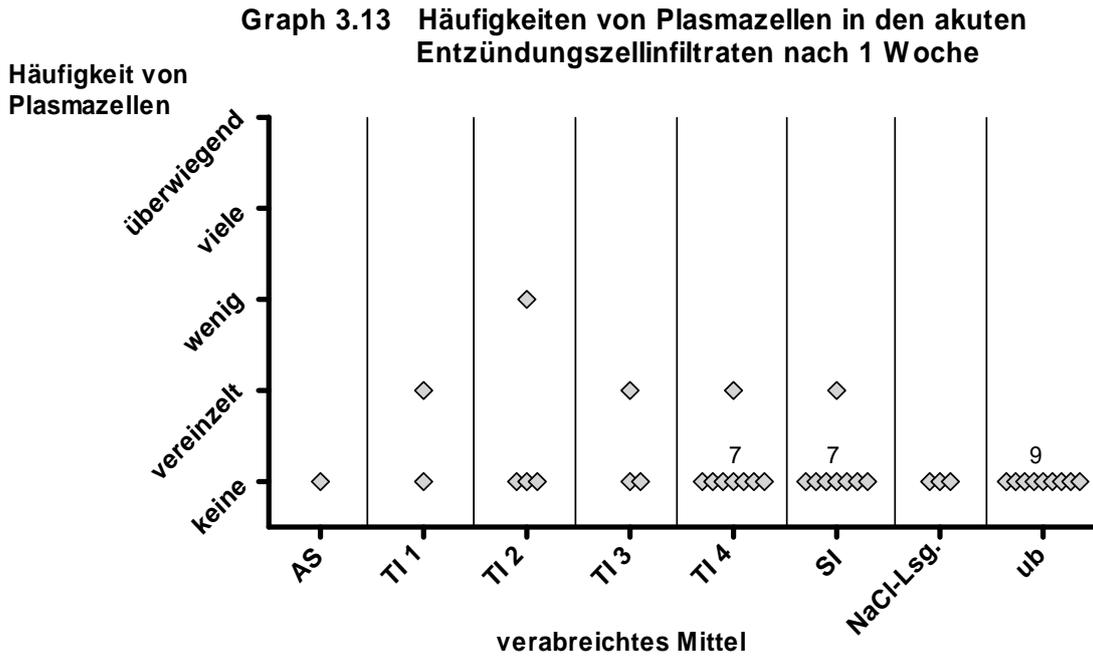


Bild 3.18

Plasmazelle (Pfeil) in der chronischen Entzündung zwölf Wochen nach Verabreichung des Tollwut-Impfstoffes 1 [Virus fixe, Stamm G52 mit Al(OH)₃]. Probe D284, HE

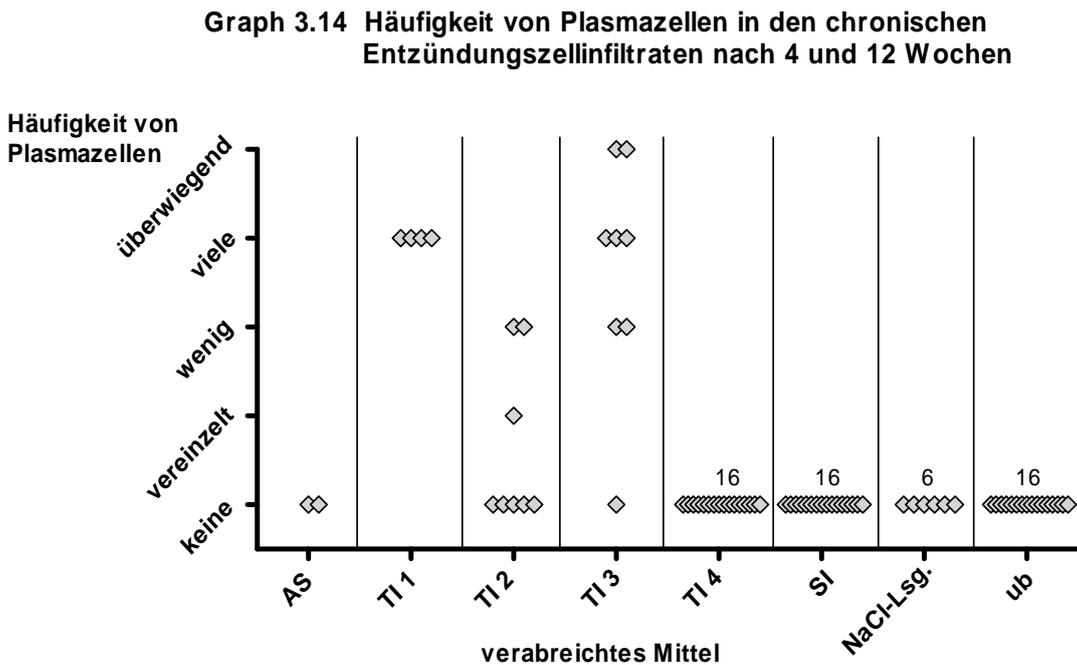
Ergebnisse



Graph 3.13 Auftreten von Plasmazellen in den unbehandelten Proben und nach Verabreichung der jeweiligen Injektion in der ersten Woche.

Legende für Graph 3.13 und 3.14:

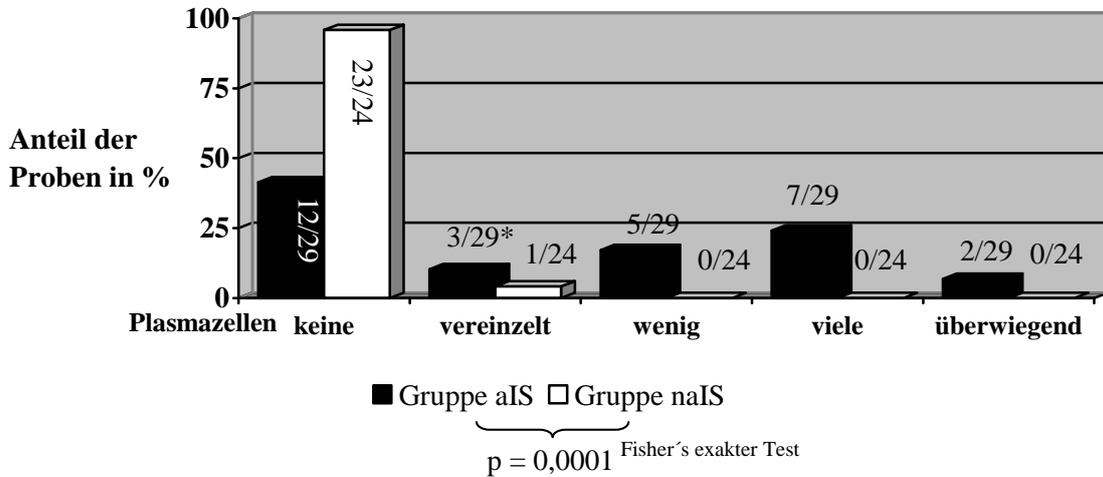
AS: Al(OH)₃-Suspension TI: Tollwut-Impfstoff SI: Staupe-Impfstoff
 ub: unbehandelt NaCl-Lsg.: isotonische Kochsalzlösung



Graph 3.14 Auftreten von Plasmazellen in den unbehandelten Proben und nach Verabreichung der jeweiligen Injektion in der vierten und zwölften Woche.

Ergebnisse

Diagramm 3.25 Auftreten von Plasmazellen im Entzündungszellinfiltrat in der 1. - 12. Woche nach Verabreichung der Tollwut-Impfstoffe

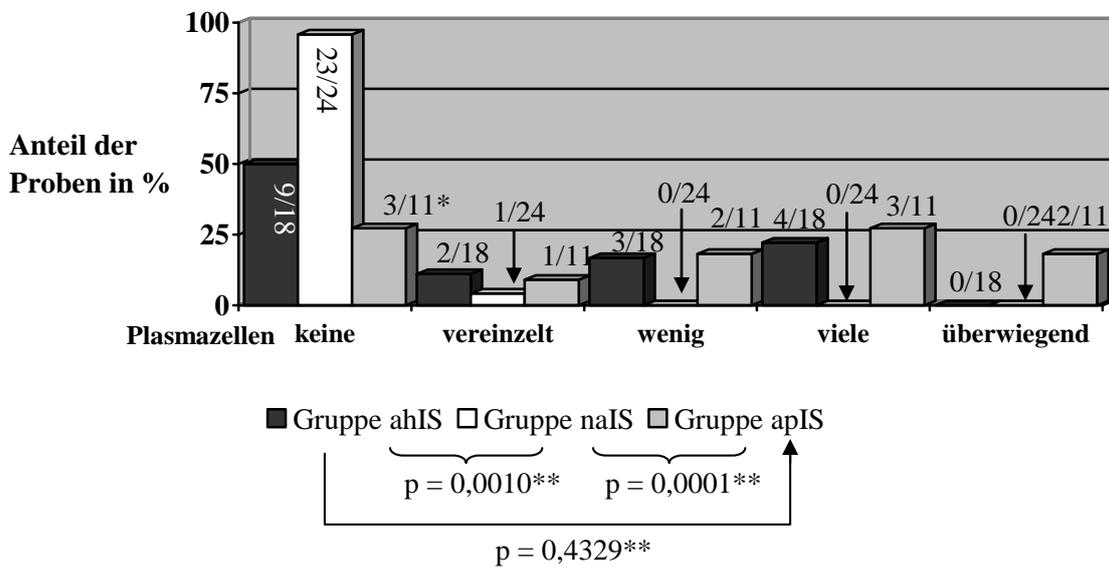


Gruppe aIS: Al-adjuvanshaltige Tollwut-Impfstoffe 1, 2 und 3

Gruppe naIS: adjuvansfreier Tollwut-Impfstoff 4

* 3 von 29 Proben wies die entsprechende Häufigkeit von Plasmazellen auf.

Diagramm 3.26 Auftreten von Plasmazellen im Entzündungszellinfiltrat in der 1. - 12. Woche nach Verabreichung der Tollwut-Impfstoffe



Gruppe ahIS: Al(OH)₃-haltige Tollwut-Impfstoffe 1 und 2

Gruppe naIS: adjuvansfreier Tollwut-Impfstoff 4

Gruppe apIS: AlPO₄-haltiger Tollwut-Impfstoff 3

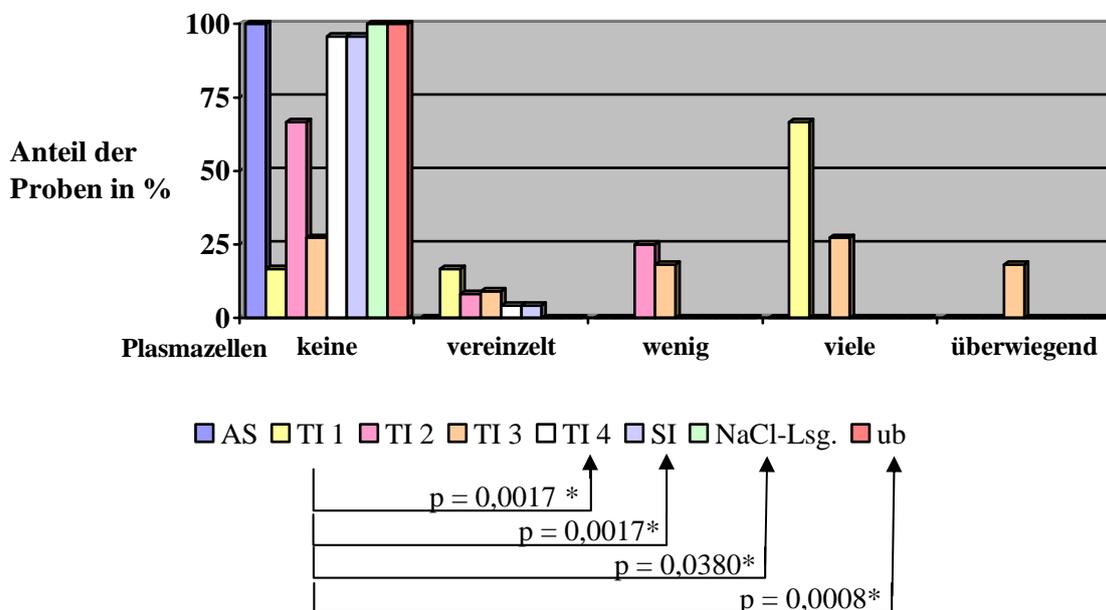
* 3 von 11 Proben wiesen die entsprechende Häufigkeit von Plasmazellen auf.

** Fisher's exakter Test, korrigiert nach Holm für multiple Vergleiche

Ergebnisse

Beim Vergleich der Werte der Entzündungszellinfiltrate, die nach Verabreichung der jeweiligen Injektion entstanden waren, konnten signifikante Unterschiede bezüglich des Auftretens von Plasmazellen ermittelt werden (siehe Diagramm 3.27 und Tabelle 3.33).

Diagramm 3.27 Auftreten von Plasmazellen im Entzündungszellinfiltrat in der 1. - 12. Woche nach Verabreichung der jeweiligen Injektion



AS: Al(OH)₃-Suspension TI: Tollwut-Impfstoff SI: Staupe-Impfstoff
 ub: unbehandelt NaCl-Lsg.: isotonische Kochsalzlösung
 * Fisher's exakter Test, korrigiert nach Holm für multiple Vergleiche
 p-Werte siehe Tabelle 3.33

Tabelle 3.33 Prüfung auf signifikante Unterschiede bezüglich des Auftretens* von Plasmazellen nach Verabreichung der jeweiligen Injektion im Zeitraum der 1. - 12. Woche
 Teil 1/2

Vergleich		p-Wert ¹
Al(OH) ₃ -Suspension	isotonische Kochsalzlösung	n.a.
Al(OH) ₃ -Suspension	Staupe-Impfstoff	1,0000
Al(OH) ₃ -Suspension	Tollwut-Impfstoff 1	1,0000
Al(OH) ₃ -Suspension	Tollwut-Impfstoff 2	1,0000
Al(OH) ₃ -Suspension	Tollwut-Impfstoff 3	1,0000
Al(OH) ₃ -Suspension	Tollwut-Impfstoff 4	1,0000
Al(OH) ₃ -Suspension	unbehandelt	n.a.
unbehandelt	isotonische Kochsalzlösung	n.a.
Staupe-Impfstoff	isotonische Kochsalzlösung	1,0000
Staupe-Impfstoff	unbehandelt	1,0000
Tollwut-Impfstoff 1	isotonische Kochsalzlösung	0,0380
Tollwut-Impfstoff 1	Staupe-Impfstoff	0,0017
Tollwut-Impfstoff 1	Tollwut-Impfstoff 2	0,0844
Tollwut-Impfstoff 1	Tollwut-Impfstoff 3	1,0000
Tollwut-Impfstoff 1	Tollwut-Impfstoff 4	0,0017
Tollwut-Impfstoff 1	unbehandelt	0,0008

Alle Vergleiche mit p-Werten < 0,05 sind statistisch signifikant zum (multiplen) Test-niveau $\alpha = 0,05$.

n.a.: nicht ausgewertet, da alle Werte in einer Klasse vorliegen; kein signifikanter Unterschied

¹ Fisher's exakter Test, korrigiert nach Holm für multiple Vergleiche

* siehe Tabelle 6.8 im Kapitel 6. Tabellen

Tabelle 3.24 Prüfung auf signifikante Unterschiede bezüglich des Auftretens* von Plasmazellen nach Verabreichung der jeweiligen Injektion im Zeitraum der 1. - 12. Woche
Teil 2/2

Vergleich		p-Wert ¹
Tollwut-Impfstoff 2	isotonische Kochsalzlösung	1,0000
Tollwut-Impfstoff 2	Staupe-Impfstoff	0,2132
Tollwut-Impfstoff 2	Tollwut-Impfstoff 3	1,0000
Tollwut-Impfstoff 2	Tollwut-Impfstoff 4	0,2132
Tollwut-Impfstoff 2	unbehandelt	0,1199
Tollwut-Impfstoff 3	isotonische Kochsalzlösung	0,1215
Tollwut-Impfstoff 3	Staupe-Impfstoff	0,0009
Tollwut-Impfstoff 3	Tollwut-Impfstoff 4	0,0009
Tollwut-Impfstoff 3	unbehandelt	0,0001
Tollwut-Impfstoff 4	isotonische Kochsalzlösung	1,0000
Tollwut-Impfstoff 4	Staupe-Impfstoff	1,0000
Tollwut-Impfstoff 4	unbehandelt	1,0000

Alle Vergleiche mit p-Werten < 0,05 sind statistisch signifikant zum (multiplen) Test-niveau $\alpha = 0,05$.

¹ Fisher's exakter Test, korrigiert nach Holm für multiple Vergleiche

* siehe Tabelle 6.8 im Kapitel 6. Tabellen

Die Untersuchung bezüglich des Auftretens von Plasmazellen in der akuten und der chronischen Entzündung innerhalb einer Behandlungsgruppe brachte keinen signifikanten Unterschied (siehe Tabelle 3.34).

Tabelle 3.34 Vergleich des Auftretens von Plasmazellen in der akuten Entzündung* (weiß unterlegt) mit deren Auftreten in der chronischen Entzündung (grau unterlegt) (Angabe der Probenzahl)**

Injektion	keine	vereinzelt	wenig	viele	überwiegend	p-Wert ¹
Al(OH) ₃ -Suspension	1 2					n.a.
Tollwut-Impfstoff 1	1	1		4		0,0667
Tollwut-Impfstoff 2	3 5	1	1 2			1,0000
Tollwut-Impfstoff 3	2 1	1	2	3	2	0,1576
Tollwut-Impfstoff 4	7 16	1				0,3333
Staupe-Impfstoff	7 16	1				0,3333
isotonische Kochsalzlösung	3 6					n.a.
unbehandelt	9 16					n.a.

¹ Fisher's exakter Test * nach einer Woche ** nach 4 und 12 Wochen
n.a.: nicht ausgewertet, da alle Werte in einer Klasse vorliegen; kein signifikanter Unterschied

Ergebnisse

Der Anteil an **Apoptosen** (Bild 3.19) zu den verschiedenen Zeitpunkten in den Entzündungszellinfiltraten war unterschiedlich ausgeprägt (siehe Graph 3.15 und 3.16).

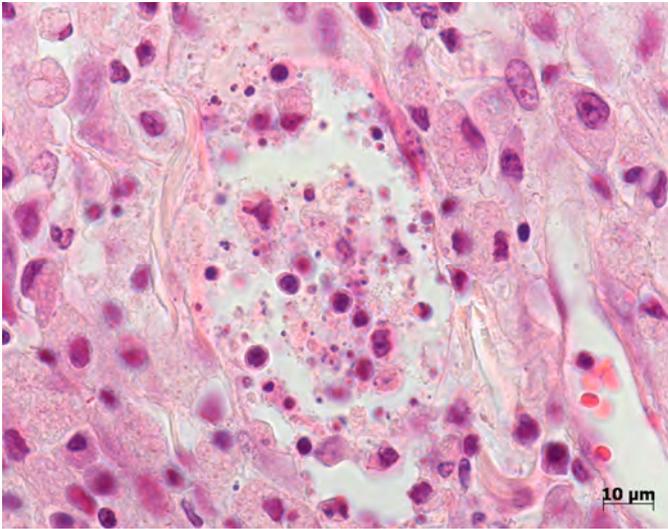
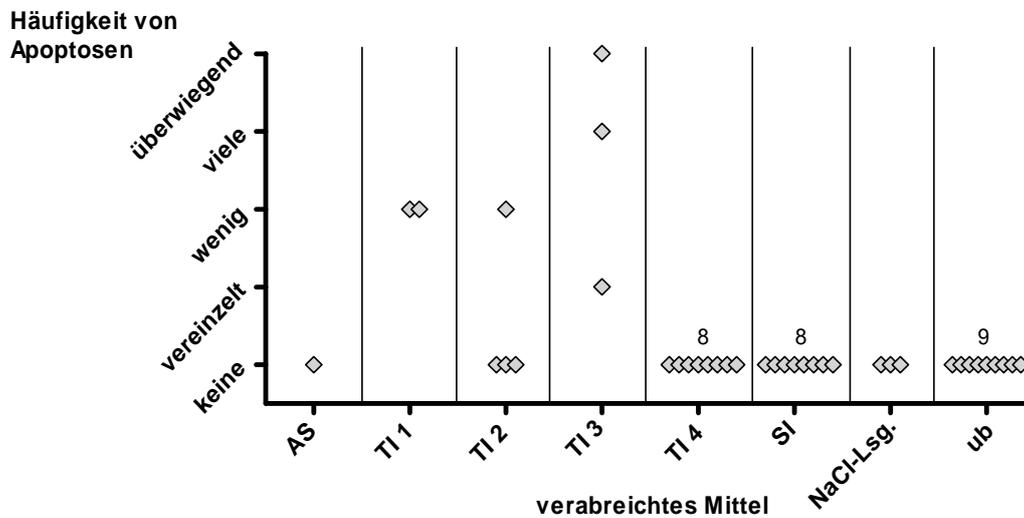


Bild 3.19

Apoptose in der chronischen Entzündung vier Wochen nach Verabreichung des Tollwut-Impfstoffes 3 (Stamm Pasteur RIV mit AlPO_4) Probe D983, HE

Graph 3.15 Häufigkeit von Apoptosen in den akuten Entzündungszellinfiltraten nach 1 Woche



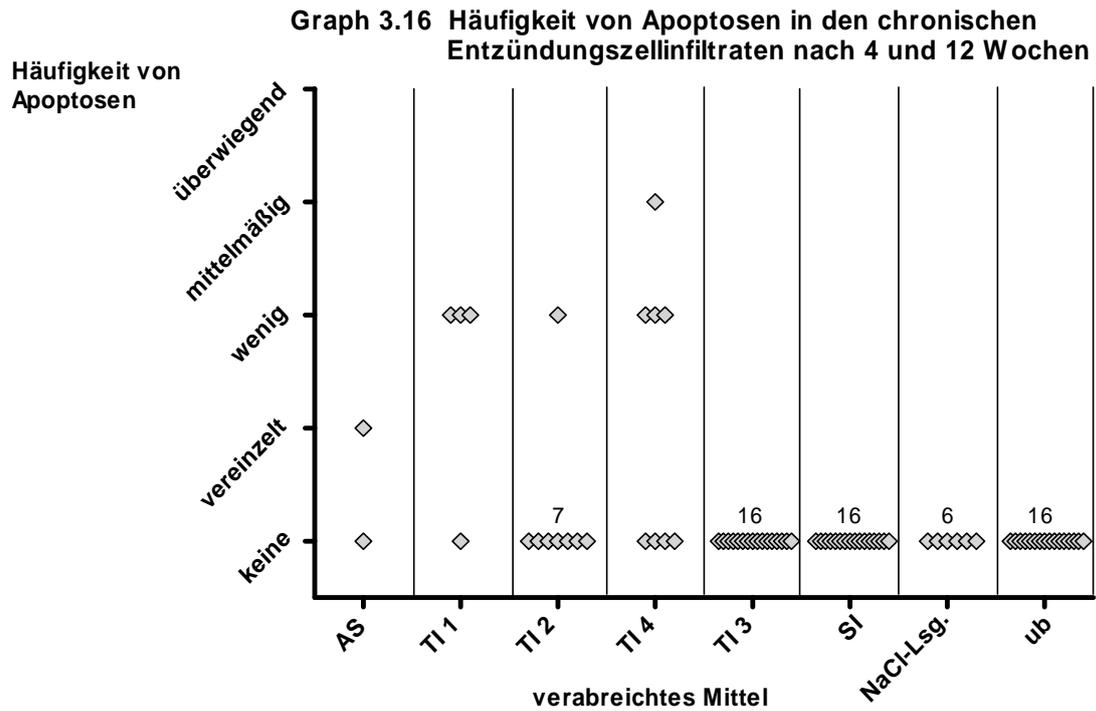
Graph 3.15 Auftreten von Apoptosen in den unbehandelten Proben und nach Verabreichung der jeweiligen Injektion in der ersten Woche.

AS: Al(OH)_3 -Suspension
ub: unbehandelt

TI: Tollwut-Impfstoff
NaCl-Lsg.: isotonische Kochsalzlösung

SI: Staupe-Impfstoff

Ergebnisse



Graph 3.16 Auftreten von Apoptosen in den unbehandelten Proben und nach Verabreichung der jeweiligen Injektion in der vierten und zwölften Woche.

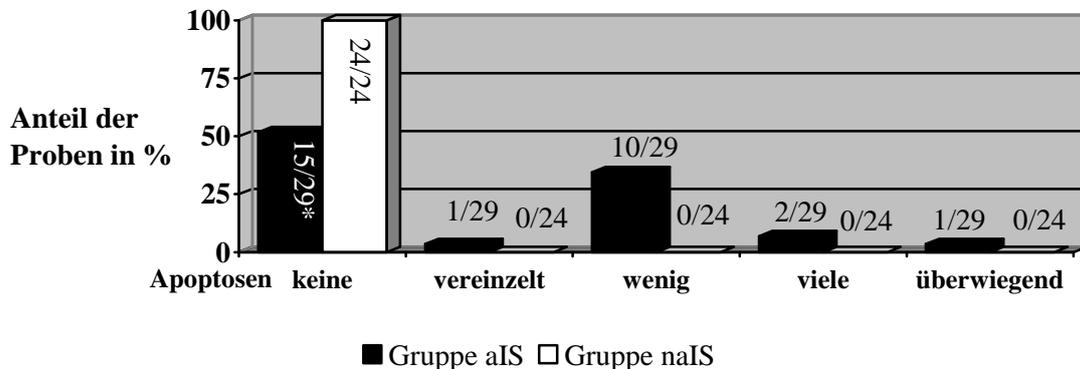
AS: Al(OH)₃-Suspension
ub: unbehandelt

TI: Tollwut-Impfstoff
NaCl-Lsg.: isotonische Kochsalzlösung

SI: Staupe-Impfstoff

Beim Vergleich der Werte der Proben nach Verabreichung der unterschiedlichen Adjuvansgruppen der Tollwut-Impfstoffe konnten signifikante Unterschiede bezüglich des Vorkommens von Apoptosen ermittelt werden (siehe Diagramm 3.28 und 3.29).

Diagramm 3.28 Auftreten von Apoptosen im Entzündungszellinfiltrat in der 1. - 12. Woche nach Verabreichung der Tollwut-Impfstoffe



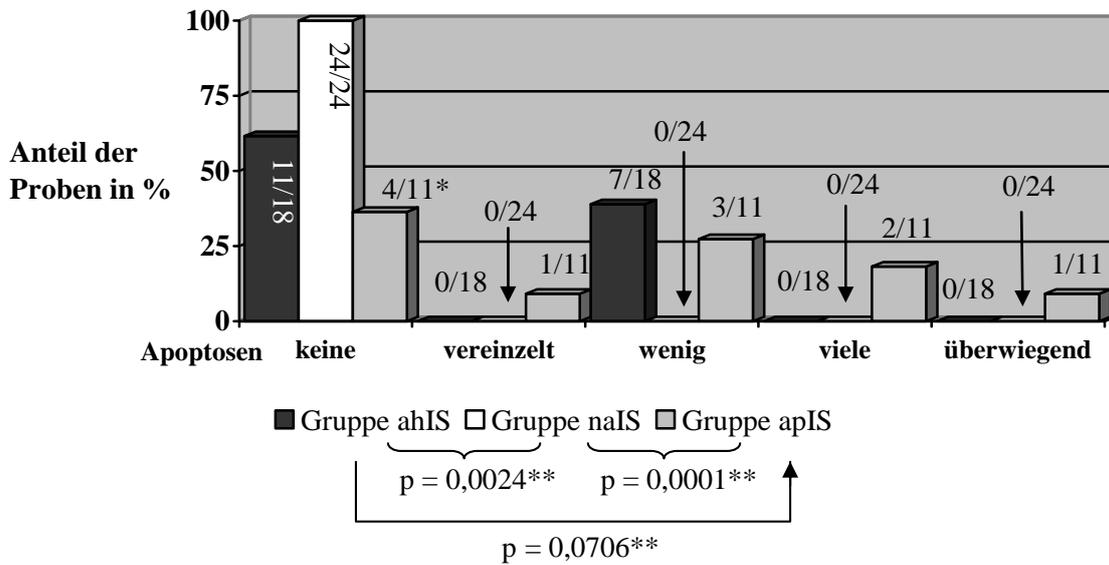
p = 0,0002 Fisher's exakter Test

Gruppe aIS: Al-adjuvanshaltige Tollwut-Impfstoffe 1, 2 und 3

Gruppe naIS: adjuvansfreier Tollwut-Impfstoff 4

* 15 von 29 Proben wiesen die entsprechende Häufigkeit von Apoptosen auf.

Diagramm 3.29 Auftreten von Apoptosen im Entzündungszellinfiltrat in der 1. - 12. Woche nach Verabreichung der Tollwut-Impfstoffe



Gruppe ahIS: Al(OH)₃-haltige Tollwut-Impfstoffe 1 und 2

Gruppe naIS: adjuvansfreier Tollwut-Impfstoff 4

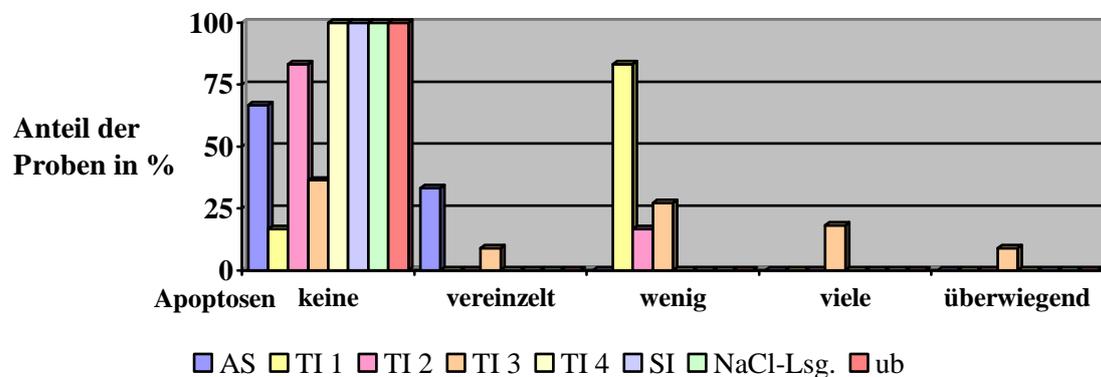
Gruppe apIS: AlPO₄-haltiger Tollwut-Impfstoff 3

* 4 von 11 Proben wiesen die entsprechende Häufigkeit von Apoptosen auf.

** Fisher's exakter Test, korrigiert nach Holm für multiple Vergleiche

Im Vergleich der Entzündungszellinfiltrate nach Verabreichung der jeweiligen Injektion konnten signifikante Unterschiede bezüglich des Vorkommens von Apoptosen ermittelt werden. Hierbei fielen die Proben nach Verabreichung des AlPO₄-haltigen Tollwut-Impfstoffes 3 besonders auf (siehe Diagramm 3.30 und Tabelle 3.35). Zur Erhaltung der Übersicht wurde auf das Eintragen der p-Werte im Diagramm verzichtet.

Diagramm 3.30 Auftreten von Apoptosen im Entzündungszellinfiltrat in der 1. - 12. Woche nach Verabreichung der jeweiligen Injektion



AS: Al(OH)₃-Suspension

TI: Tollwut-Impfstoff

SI: Staupe-Impfstoff

ub: unbehandelt

NaCl-Lsg.: isotonische Kochsalzlösung

p-Werte siehe Tabelle 3.35

Tabelle 3.35 Prüfung auf signifikante Unterschiede bezüglich des Auftretens* von Apoptosen nach Verabreichung der jeweiligen Injektion im Zeitraum der 1.-12.Woche

Vergleich		p-Wert ¹
Al(OH) ₃ -Suspension	isotonische Kochsalzlösung	1,0000
Al(OH) ₃ -Suspension	Staupe-Impfstoff	0,7778
Al(OH) ₃ -Suspension	Tollwut-Impfstoff 1	0,6667
Al(OH) ₃ -Suspension	Tollwut-Impfstoff 2	1,0000
Al(OH) ₃ -Suspension	Tollwut-Impfstoff 3	0,6786
Al(OH) ₃ -Suspension	Tollwut-Impfstoff 4	0,8889
Al(OH) ₃ -Suspension	unbehandelt	0,9643
unbehandelt	isotonische Kochsalzlösung	n.a.
Staupe-Impfstoff	isotonische Kochsalzlösung	n.a.
Staupe-Impfstoff	unbehandelt	n.a.
Tollwut-Impfstoff 1	isotonische Kochsalzlösung	0,0340
Tollwut-Impfstoff 1	Staupe-Impfstoff	0,0009
Tollwut-Impfstoff 1	Tollwut-Impfstoff 2	0,2051
Tollwut-Impfstoff 1	Tollwut-Impfstoff 3	1,0000
Tollwut-Impfstoff 1	Tollwut-Impfstoff 4	0,0009
Tollwut-Impfstoff 1	unbehandelt	0,0008
Tollwut-Impfstoff 2	isotonische Kochsalzlösung	1,0000
Tollwut-Impfstoff 2	Staupe-Impfstoff	1,0000
Tollwut-Impfstoff 2	Tollwut-Impfstoff 3	1,0000
Tollwut-Impfstoff 2	Tollwut-Impfstoff 4	1,0000
Tollwut-Impfstoff 2	unbehandelt	1,0000
Tollwut-Impfstoff 3	isotonische Kochsalzlösung	0,3007
Tollwut-Impfstoff 3	Staupe-Impfstoff	0,0009
Tollwut-Impfstoff 3	Tollwut-Impfstoff 4	0,0009
Tollwut-Impfstoff 3	unbehandelt	0,0009
Tollwut-Impfstoff 4	isotonische Kochsalzlösung	n.a.
Tollwut-Impfstoff 4	Staupe-Impfstoff	0,9787
Tollwut-Impfstoff 4	unbehandelt	n.a.

Alle Vergleiche mit p-Werten < 0,05 sind statistisch signifikant zum (multiplen) Test-niveau $\alpha = 0,05$.

¹ Fisher's exakter Test, korrigiert nach Holm für multiple Vergleiche.

n.a.: nicht ausgewertet, da alle Werte in einer Klasse vorliegen; kein signifikanter Unterschied

* siehe Tabelle 6.9 im Kapitel **6. Tabellen**

Bei der Untersuchung zur zeitlichen Abhängigkeit des Auftretens von Apoptosen konnte nur für die Proben nach Verabreichung des AIOp₄-haltigen Tollwut-Impfstoffes 3 ein signifikanter Unterschied zwischen der akuten und chronischen Entzündung ermittelt werden ($p = 0,0303$; siehe Tabelle 3.36).

Tabelle 3.36 Vergleich des Auftretens von Apoptosen in der akuten Entzündung* (weiß unterlegt) mit deren Auftreten in der chronischen Entzündung (grau unterlegt) (Angabe der Probenzahl)**

Injektion	keine	vereinzelt	wenig	viele	überwiegend	p-Wert ¹
Al(OH) ₃ -Suspension	1 1	1				1,0000
Tollwut-Impfstoff 1	1 1		2 3			1,0000
Tollwut-Impfstoff 2	3 7		1 1			1,0000
Tollwut-Impfstoff 3	4 4	1	3	1 1	1	0,0303
Tollwut-Impfstoff 4	8 16					n.a.
Staupe-Impfstoff	8 16					n.a.
isotonische Kochsalzlösung	3 6					n.a.
unbehandelt	9 16					n.a.

¹ Fisher´s exakter Test * nach einer Woche ** nach 4 und 12 Wochen
n.a.: nicht ausgewertet, da alle Werte in einer Klasse vorliegen; kein signifikanter Unterschied

In einigen Proben konnten Gewebs- und Zellnekrosen (Bilder 3.20 bis 3.22) nachgewiesen werden.

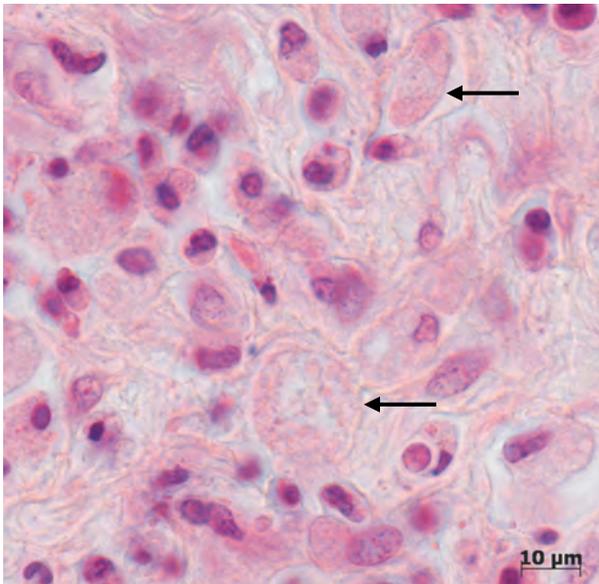


Bild 3.20
Zellnekrose (Pfeile) in der chronischen Entzündung vier Wochen nach Verabreichung des Tollwut-Impfstoffes 3 (Stamm Pasteur RIV mit AlPO₄). Probe D983, HE

Eine Übersicht der ermittelten Nekrosen im gesamten Untersuchungszeitraum der ersten bis zur 12. Woche zeigt Tabelle 3.37. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass zu jedem Zeitpunkt Einzelproben am euthanasierten Tier entnommen wurden und daher die zeitliche Entwicklung der Entzündung nicht verfolgt werden konnte.

Ergebnisse

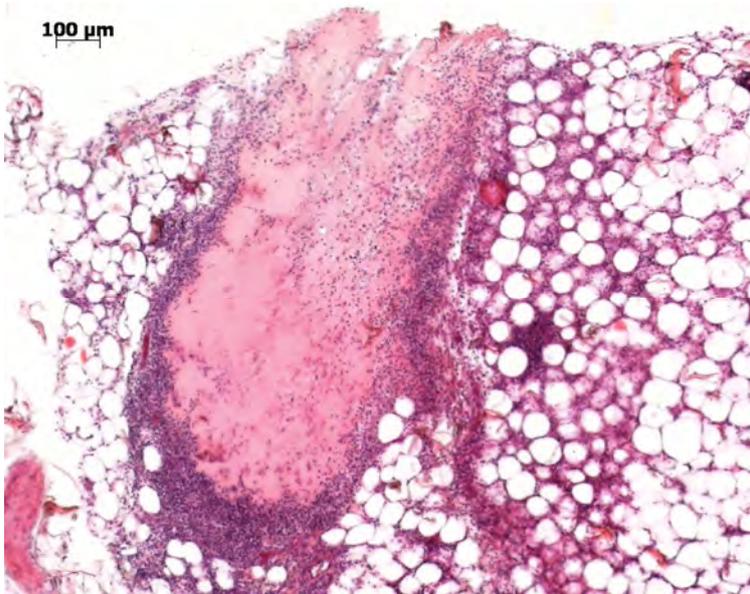


Bild 3.21

Fettgewebnekrose in der akuten Entzündung eine Woche nach Verabreichung des Tollwut-Impfstoffes 2 [Stamm Flury LEP mit $Al(OH)_3$]. Probe D933, HE

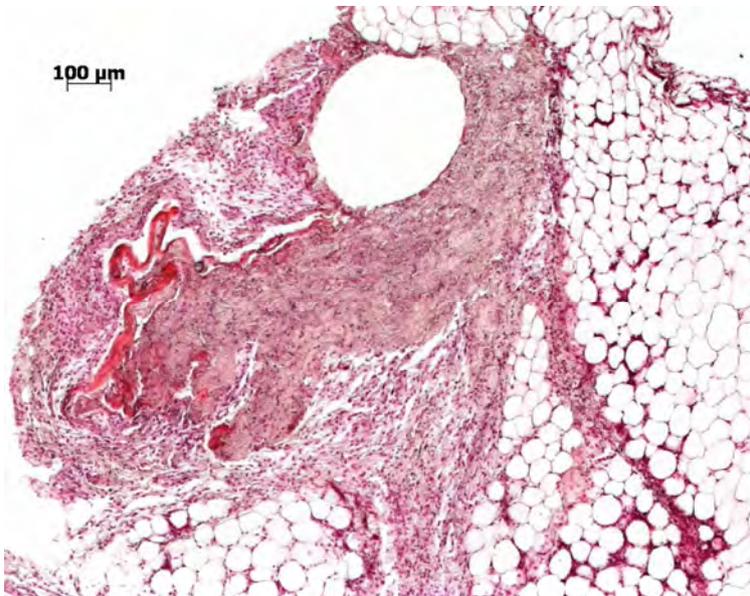


Bild 3.22

Nekrose in der akuten Entzündung eine Woche nach Verabreichung des Tollwut-Impfstoffes 3 (Stamm Pasteur RIV mit $AlPO_4$). Probe D938, HE

Tabelle 3.37 Auftreten von Nekrosen nach Verabreichung der jeweiligen Injektion im Zeitraum der 1.-12.Woche (Probenzahl)

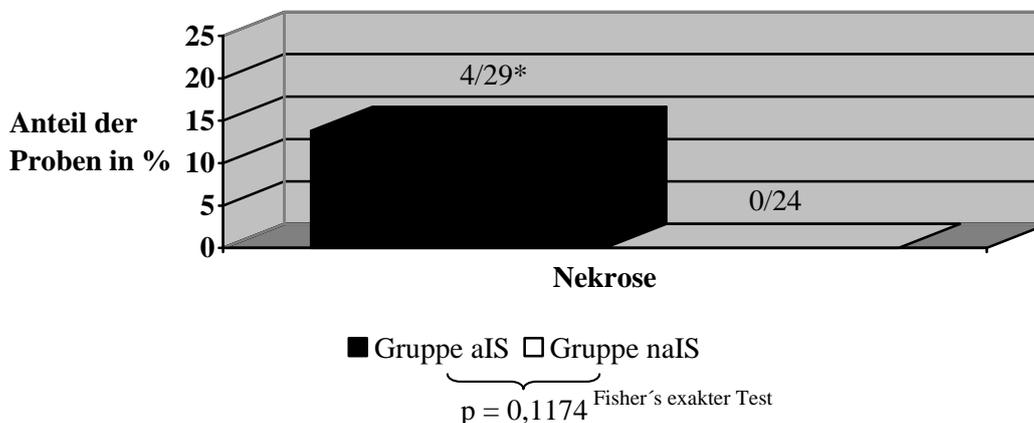
Injektion	1. - 12.Woche				1. Woche		4. Woche		12.Woche	
	Nein	Ja	n		Nein	Ja	Nein	Ja	Nein	Ja
$Al(OH)_3$ -Suspension	3	-	3		1	-	1	-	1	-
Tollwut-Impfstoff 1	6	-	6		2	-	2	-	2	-
Tollwut-Impfstoff 2	11	1	12		3	1	4	-	4	-
Tollwut-Impfstoff 3	8	3	11		1	2	3	1	4	-
Tollwut-Impfstoff 4	24	-	24		8	-	8	-	8	-
Staupe-Impfstoff	24	-	24		8	-	8	-	8	-
isotonische Kochsalzlösung	9	-	9		3	-	3	-	3	-
unbehandelt	25	-	25		9	-	7	-	9	-
Gesamt	110	4	114		35	3	36	1	39	0

n: Probenzahl

Ergebnisse

Bezüglich des Auftretens von Nekrosen unterschieden sich die Gruppen der Tollwut-Impfstoffe 1, 2, 3 und 4 nicht signifikant (siehe Diagramm 3.31 und 3.32).

Diagramm 3.31 Auftreten von Nekrosen im Entzündungszellinfiltrat in der 1. - 12. Woche nach Verabreichung der Tollwut-Impfstoffe

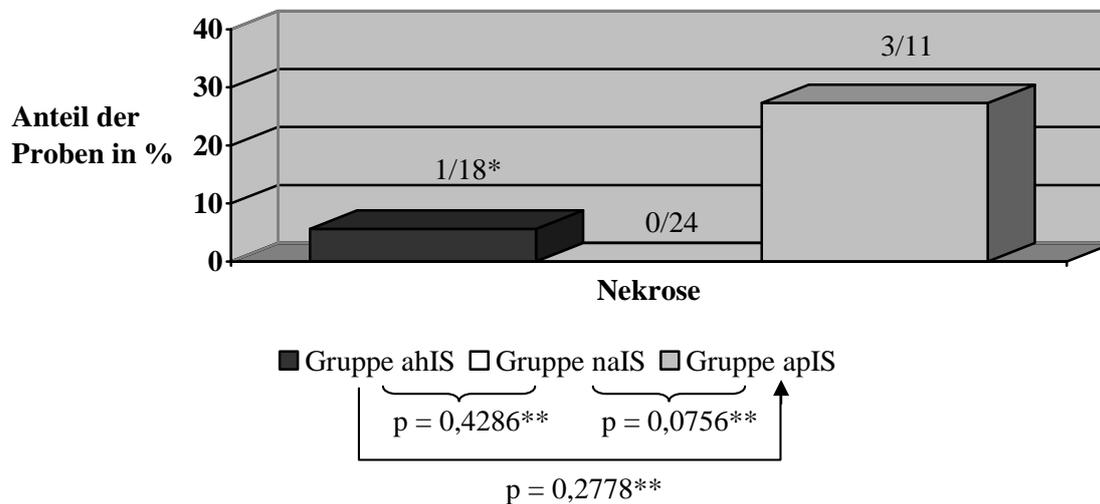


Gruppe aIS: Al-adjuvanshaltige Tollwut-Impfstoffe 1, 2 und 3

Gruppe naIS: adjuvansfreier Tollwut-Impfstoff 4

* 4 von 29 Proben wiesen Nekrose auf.

Diagramm 3.32 Auftreten von Nekrosen im Entzündungszellinfiltrat in der 1. - 12. Woche nach Verabreichung der Tollwut-Impfstoffe



Gruppe ahIS: Al(OH)₃-haltige Tollwut-Impfstoffe 1 und 2

Gruppe naIS: adjuvansfreier Tollwut-Impfstoff 4

Gruppe apIS: AlPO₄-haltiger Tollwut-Impfstoff 3

* 1 von 18 Proben wies Nekrose auf.

** Fisher's exakter Test, korrigiert nach Holm für multiple Vergleiche

Ergebnisse

Der p-Wert der Untersuchung der Gruppe naIS im Vergleich zur Gruppe apIS zeigt eine Tendenz, aber keine Signifikanz, die allerdings bei einer größeren Probenzahl gegeben sein könnte, da in den Proben nach Verabreichung des AlPO₄-haltigen Tollwut-Impfstoffes 3 gegenüber der Gruppe naIS vermehrt Nekrosen aufgetreten sind.

Im Vergleich des Auftretens von Nekrosen in den Entzündungszellinfiltraten nach Verabreichung des Al(OH)₃-haltigen Tollwut-Impfstoffes 1 mit dem Auftreten von Nekrosen nach Verabreichung des Tollwut-Impfstoffes 4 gab es einen signifikanten Unterschied (p = 0,0007). Alle anderen Vergleiche waren nicht signifikant bezüglich dieses Untersuchungskriteriums (siehe Tabelle 3.38).

Tabelle 3.38 Prüfung auf signifikante Unterschiede bezüglich des Auftretens* von Nekrosen nach Verabreichung der jeweiligen Injektion im Zeitraum der 1.-12.Woche

Vergleich		p-Wert ¹
Al(OH) ₃ -Suspension	isotonische Kochsalzlösung	n.a.
Al(OH) ₃ -Suspension	Staupe-Impfstoff	n.a.
Al(OH) ₃ -Suspension	Tollwut-Impfstoff 1	0,6190
Al(OH) ₃ -Suspension	Tollwut-Impfstoff 2	1,0000
Al(OH) ₃ -Suspension	Tollwut-Impfstoff 3	1,0000
Al(OH) ₃ -Suspension	Tollwut-Impfstoff 4	1,0000
Al(OH) ₃ -Suspension	unbehandelt	n.a.
unbehandelt	isotonische Kochsalzlösung	n.a.
Staupe-Impfstoff	isotonische Kochsalzlösung	n.a.
Staupe-Impfstoff	unbehandelt	n.a.
Tollwut-Impfstoff 1	isotonische Kochsalzlösung	n.a.
Tollwut-Impfstoff 1	Staupe-Impfstoff	n.a.
Tollwut-Impfstoff 1	Tollwut-Impfstoff 2	1,0000
Tollwut-Impfstoff 1	Tollwut-Impfstoff 3	1,0000
Tollwut-Impfstoff 1	Tollwut-Impfstoff 4	0,0007
Tollwut-Impfstoff 1	unbehandelt	n.a.
Tollwut-Impfstoff 2	isotonische Kochsalzlösung	1,0000
Tollwut-Impfstoff 2	Staupe-Impfstoff	1,0000
Tollwut-Impfstoff 2	Tollwut-Impfstoff 3	1,0000
Tollwut-Impfstoff 2	Tollwut-Impfstoff 4	1,0000
Tollwut-Impfstoff 2	unbehandelt	1,0000
Tollwut-Impfstoff 3	isotonische Kochsalzlösung	1,0000
Tollwut-Impfstoff 3	Staupe-Impfstoff	0,3655
Tollwut-Impfstoff 3	Tollwut-Impfstoff 4	0,3655
Tollwut-Impfstoff 3	unbehandelt	0,3697
Tollwut-Impfstoff 4	isotonische Kochsalzlösung	n.a.
Tollwut-Impfstoff 4	Staupe-Impfstoff	1,0000
Tollwut-Impfstoff 4	unbehandelt	n.a.

Alle Vergleiche mit p-Werten < 0,05 sind statistisch signifikant zum (multiplen) Testniveau $\alpha = 0,05$.

n.a.: nicht ausgewertet, da alle Werte in einer Klasse vorliegen; kein signifikanter Unterschied

¹ Fisher's exakter Test, korrigiert nach Holm für multiple Vergleiche

* siehe Tabelle 3.37

Ergebnisse

Auch der Unterschied zwischen der akuten und der chronischen Entzündung bezüglich des Vorkommens von Nekrosen war nicht signifikant (siehe Tabelle 3.39).

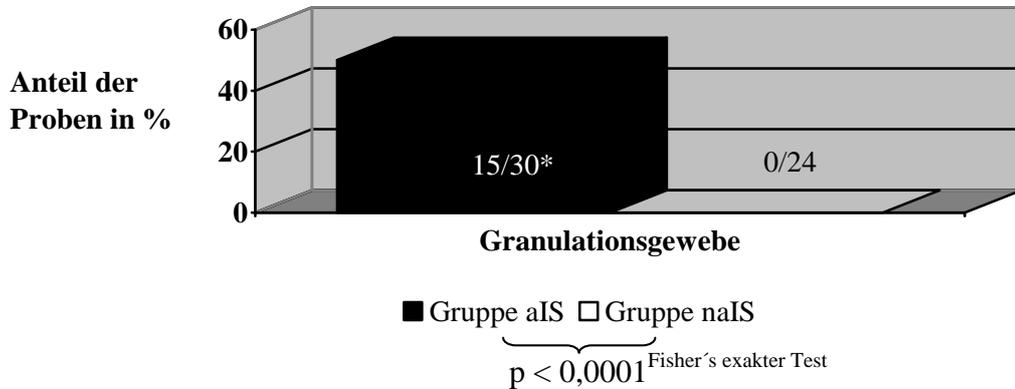
Tabelle 3.39 Vergleich des Auftretens von Nekrosen in der akuten Entzündung* (weiß unterlegt) mit deren Auftreten in der chronischen Entzündung (grau unterlegt) (Angabe der Probenzahl)**

Injektion	Nein	Ja	p-Wert ¹
Al(OH) ₃ -Suspension	1 2		n.a.
Tollwut-Impfstoff 1	2 4		n.a.
Tollwut-Impfstoff 2	3 8	1	0,3333
Tollwut-Impfstoff 3	1 7	2 1	0,1515
Tollwut-Impfstoff 4	8 16		n.a.
Staupe-Impfstoff	8 16		n.a.
isotonische Kochsalzlösung	3 6		n.a.
unbehandelt	9 16		n.a.

¹ Fisher's exakter Test * nach einer Woche ** nach 4 und 12 Wochen
n.a.: nicht ausgewertet, da alle Werte in einer Klasse vorliegen; kein signifikanter Unterschied

Granulationsgewebe wurde besonders nach Verabreichung der adjuvanshaltigen Tollwut-Impfstoffe nachgewiesen. Es gab signifikante Unterschiede im Vorkommen von Granulationsgewebe bezüglich der verabreichten Mittel (siehe Diagramm 3.33 bis 3.35 und Tabelle 3.40).

Diagramm 3.33 Vorkommen von Granulationsgewebe im Entzündungszellinfiltrat in der 1. - 12. Woche nach Verabreichung der Tollwut-Impfstoffe

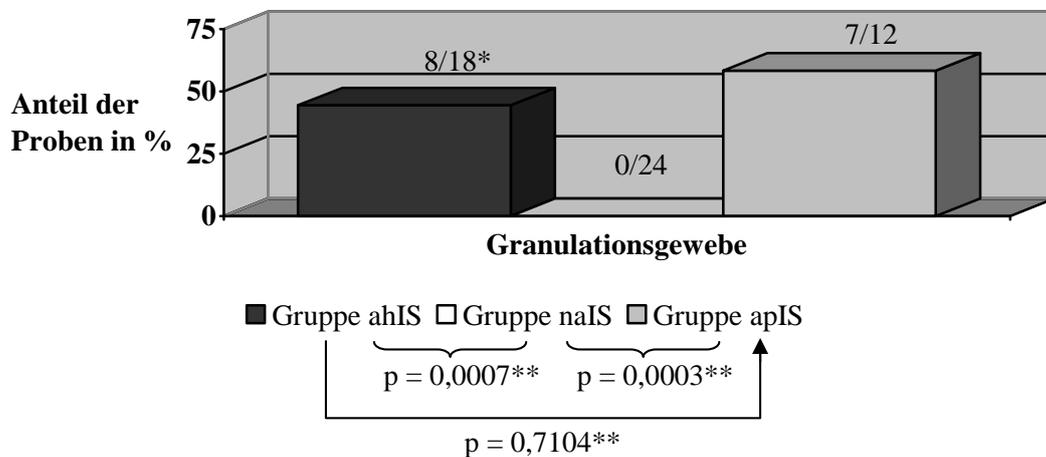


Gruppe aIS: Al-adjuvanshaltige Tollwut-Impfstoffe 1, 2 und 3

Gruppe naIS: adjuvansfreier Tollwut-Impfstoff 4

* 15 von 30 Proben wiesen Granulationsgewebe auf.

Diagramm 3.34 Vorkommen von Granulationsgewebe im Entzündungszellinfiltrat in der 1. - 12. Woche nach Verabreichung der Tollwut-Impfstoffe



Gruppe ahIS: Al(OH)₃-haltige Tollwut-Impfstoffe 1 und 2

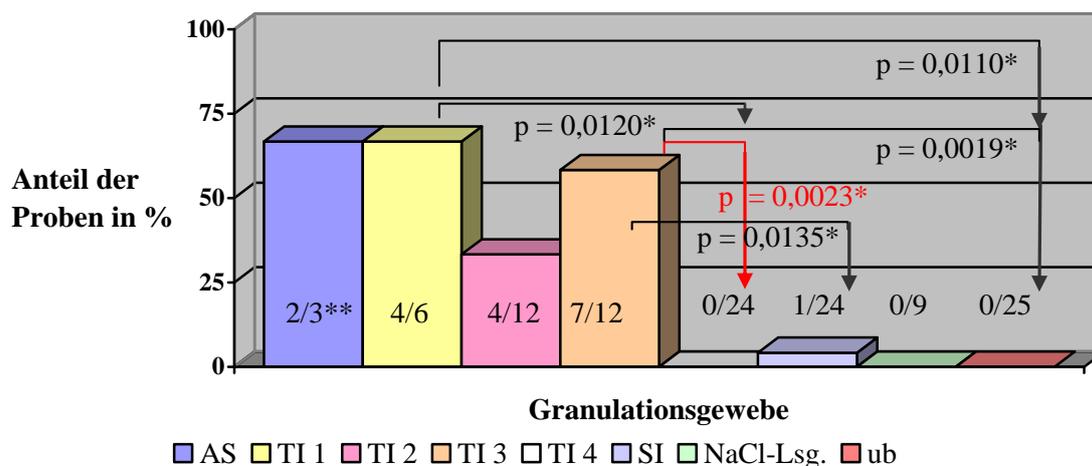
Gruppe naIS: adjuvansfreier Tollwut-Impfstoff 4

Gruppe apIS: AlPO₄-haltiger Tollwut-Impfstoff 3

* 8 von 18 Proben wiesen Granulationsgewebe auf.

** Fisher's exakter Test, korrigiert nach Holm für multiple Vergleiche

Diagramm 3.35 Vorkommen von Granulationsgewebe im Entzündungszellinfiltrat der 1.-12. Woche nach Verabreichung der jeweiligen Injektion



** 2 von 3 Proben wiesen Granulationsgewebe auf. p-Werte siehe Tabelle 3.40
 AS: Al(OH)₃-Suspension TI: Tollwut-Impfstoff SI: Staupe-Impfstoff
 ub: unbehandelt NaCl-Lsg.: isotonische Kochsalzlösung
 * Fisher's exakter Test, korrigiert nach Holm für multiple Vergleiche.

Tabelle 3.40 Prüfung auf signifikante Unterschiede bezüglich des Vorkommens* einer Granulationsgewebsbildung nach Verabreichung der jeweiligen Injektion im Zeitraum der 1.-12. Woche

Vergleich	p-Wert ¹
Al(OH) ₃ -Suspension isotonische Kochsalzlösung	0,5000
Al(OH) ₃ -Suspension Staupe-Impfstoff	0,3244
Al(OH) ₃ -Suspension Tollwut-Impfstoff 1	1,0000
Al(OH) ₃ -Suspension Tollwut-Impfstoff 2	1,0000
Al(OH) ₃ -Suspension Tollwut-Impfstoff 3	1,0000
Al(OH) ₃ -Suspension Tollwut-Impfstoff 4	0,1282
Al(OH) ₃ -Suspension unbehandelt	0,1349
unbehandelt isotonische Kochsalzlösung	n.a.
Staupe-Impfstoff isotonische Kochsalzlösung	1,0000
Staupe-Impfstoff unbehandelt	1,0000
Tollwut-Impfstoff 1 isotonische Kochsalzlösung	0,1538
Tollwut-Impfstoff 1 Staupe-Impfstoff	0,0514
Tollwut-Impfstoff 1 Tollwut-Impfstoff 2	1,0000
Tollwut-Impfstoff 1 Tollwut-Impfstoff 3	1,0000
Tollwut-Impfstoff 1 Tollwut-Impfstoff 4	0,0120
Tollwut-Impfstoff 1 unbehandelt	0,0110
Tollwut-Impfstoff 2 isotonische Kochsalzlösung	1,0000
Tollwut-Impfstoff 2 Staupe-Impfstoff	0,4034
Tollwut-Impfstoff 2 Tollwut-Impfstoff 3	1,0000
Tollwut-Impfstoff 2 Tollwut-Impfstoff 4	0,1345
Tollwut-Impfstoff 2 unbehandelt	0,1349
Tollwut-Impfstoff 3 isotonische Kochsalzlösung	0,1353
Tollwut-Impfstoff 3 Staupe-Impfstoff	0,0135
Tollwut-Impfstoff 3 Tollwut-Impfstoff 4	0,0023
Tollwut-Impfstoff 3 unbehandelt	0,0019
Tollwut-Impfstoff 4 isotonische Kochsalzlösung	n.a.
Tollwut-Impfstoff 4 Staupe-Impfstoff	1,0000
Tollwut-Impfstoff 4 unbehandelt	n.a.

Alle Vergleiche mit p-Werten < 0,05 sind statistisch signifikant zum (multiplen) Test-niveau $\alpha = 0,05$.

¹ Fisher's exakter Test, korrigiert nach Holm für multiple Vergleiche.

n.a.: nicht ausgewertet, da alle Werte in einer Klasse vorliegen; kein signifikanter Unterschied

* siehe Diagramm 3.35

Ergebnisse

Innerhalb einer Behandlungsgruppe unterschied sich das Vorkommen einer Granulationsgewebsbildung in der akuten Entzündung nicht signifikant von deren Vorkommen in der chronischen Entzündung (siehe Tabelle 3.41).

Tabelle 3.41 Vergleich des Vorkommens einer Granulationsgewebsbildung in der akuten Entzündung (weiß unterlegt) mit deren Vorkommen in der chronischen Entzündung** (grau unterlegt) (Angabe der Probenzahl)**

Injektion	Nein	Ja	p-Wert ¹
Al(OH) ₃ -Suspension	1	2	0,3333
Tollwut-Impfstoff 1	2	2	0,4667
Tollwut-Impfstoff 2	2 6	2	0,5475
Tollwut-Impfstoff 3	3 2	1 6	0,2222
Tollwut-Impfstoff 4	8 16		n.a.
Staupe-Impfstoff	7 16	1	0,3333
isotonische Kochsalzlösung	3 6		n.a.
unbehandelt	9 16		n.a.

¹ Fisher´s exakter Test * nach einer Woche ** nach 4 und 12 Wochen
n.a.: nicht ausgewertet, da alle Werte in einer Klasse vorliegen; kein signifikanter Unterschied

3.2.3. Befunde der induktiv gekoppelten Plasmaionen-Massenspektrometrie (ICP-MS)

Die Unterhautproben der Versuchsserie 1 (siehe 3.1.1) wurden nach der Impfung mit dem Al(OH)₃-haltigen Tollwut-Impfstoff 1 (siehe Tabelle 3.3), nach Verabreichung einer Al(OH)₃-haltigen Suspension bzw. einer isotonischen Kochsalzlösung untersucht. Als Kontrolle diente Gewebe un behandelter Tiere. Außerdem wurde das Gewebe der Milz in die Untersuchung einbezogen. Die Untersuchung der Applikationsstellen und der Milz erfolgte eine, vier, zwölf und vierundzwanzig Wochen nach der Injektion. Die ermittelten Aluminiumgehalte sind in der Tabelle 3.42 aufgeführt.

Tabelle 3.42 Aluminiumbestimmung im Gewebe,
Angaben: Aluminium in mg/kg Gewebe

Woche	Tier-Nr.	Haut TI 1*	Haut Al(OH) ₃ -Susp.*	Haut NaCl-Lsg.	Milz	Haut unbehandelt
1	2	1090,70	nv	1,77	0,04	nv
	1	1722,90	nv	3,46	0,13	nv
	9	nv	3,12	0,83	0,20	nv
	13	nv	nv	nv	0,11	0,77
4	4	195,81	nv	1,43	0,25	nv
	3	1314,30	nv	1,59	0,38	nv
	10	nv	509,18	1,43	0,28	nv
12	5	7,60	nv	0,70	0,20	nv
	6	281,91	nv	1,25	0,27	nv
	11	nv	496,01	1,45	0,10	nv
	14	nv	nv	nv	0,14	0,31 ^{li} /0,76 ^{re}
24	7	88,40	nv	1,17	0,60	nv
	8	1130,40	nv	0,69	0,08	nv
	12	nv	0,63	0,10	0,04	nv

Susp.: Suspension

NaCl-Lsg.: isotonische Kochsalzlösung

nv: aufgrund des Versuchsaufbaus nicht vorhanden

TI 1: Tollwut-Impfstoff 1 [Virus fixe, Stamm G52 mit Al(OH)₃]

^{li}: Probe von linker Brustkorbwand

^{re}: Probe von rechter Brustkorbwand

*In dieser Versuchsserie wurde entweder der Al(OH)₃-haltige Tollwut-Impfstoff 1 oder die Al(OH)₃-Suspension am rechten seitlichen Brustkorb und gleichzeitig die isotonische Kochsalzlösung am linken seitlichen Brustkorb subkutan verabreicht. Zwei Kontrolltiere blieben unbehandelt. Zur Untersuchung des Aluminiumgehaltes am Applikationsort kamen jeweils eine Probe aus dem Applikationsbereich der Injektionen und insgesamt drei Proben von den unbehandelten Kontrolltieren.

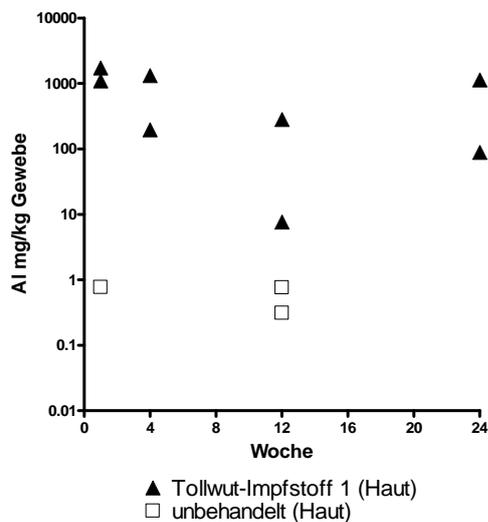
Bei Tier 8 hat sich der Impfstoff sehr breitflächig im Gewebe verteilt. So konnten von diesem Tier zwei Proben untersucht werden. Die Probe, die an der Stelle entnommen wurde, die der der anderen Proben entsprach, wurde bereits in der Tabelle 3.33 aufgeführt (1130,40 mg Aluminium/kg Gewebe). In der benachbarten Probe, die sich in der Nähe des Randes der Markierung befand, konnten 508,07 mg Aluminium/kg Gewebe nachgewiesen werden.

Die Aluminiumkonzentration im Gewebe nach Verabreichung des Al(OH)₃-haltigen Tollwut-Impfstoffes 1 oder der Al(OH)₃-Suspension unterschied sich signifikant von der Aluminiumkonzentration im unbehandelten Gewebe und in den Proben nach Verabreichung der isotonischen Kochsalzlösung (siehe Graphen 3.17 und 3.18 sowie Tabelle 3.34). Bei Betrachtung des Graphen 3.17 fällt auf, dass die Aluminiumkonzentration nach Verabreichung des Al(OH)₃-haltigen Tollwut-Impfstoffes 1 bei der Untersuchung in der 24. Woche nur unwesentlich geringer ausfällt als bei den vorausgegangenen Untersuchungen nach 1, 4 und 12 Wochen.

Ergebnisse

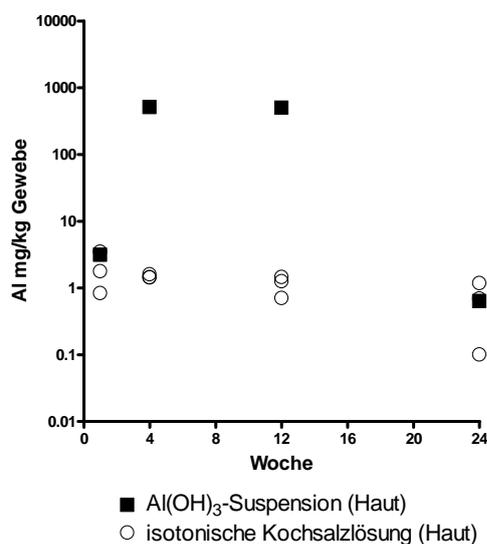
Graph 3.17

Aluminium im Gewebe nach Gabe des $\text{Al}(\text{OH})_3$ -haltigen Tollwut-Impfstoffes 1 und im unbehandelten Gewebe



Graph 3.18

Aluminium im Gewebe nach Gabe der $\text{Al}(\text{OH})_3$ -haltigen Suspension bzw. der isotonischen Kochsalzlösung



Anmerkung zu Graph 3.18:

Da die Markierung der Tiere in der Versuchsserie 1 alle 2-3 Tage aufgefrischt werden musste, waren Abweichungen von der ursprünglichen Markierung durch Bewegung des Tieres oder durch die Farbverteilung auf der Haut beim Auffrischen der Markierung möglich. Daraus ergibt sich:

1. Zum Zeitpunkt der ersten Untersuchung eine Woche nach der Injektion, konnte bei der histologischen Untersuchung der Haut des behandelten Tieres 9 nur geringgradige Anzeichen einer Reaktion auf die Injektion nachgewiesen werden. Daher besteht die Möglichkeit, dass die entnommene Probe am Rand der Applikationsstelle lag.
2. Bei keinem Tier konnte bei der histologischen Untersuchung vierundzwanzig Wochen nach der Injektion eine Entzündung nachgewiesen werden. In Anbetracht der wiederholten Erneuerung der Markierung besteht die Möglichkeit, dass diese von der tatsächlichen Applikationsstelle abwich und daher nur das Randgebiet der Applikationsstelle untersucht wurde.

Wie in der Anmerkung zu Graph 3.18 beschrieben, muss berücksichtigt werden, dass die entnommene Probe des behandelten Tieres 9 am Rand der Applikationsstelle lag. Daraus erklärt sich die niedrige Aluminiumkonzentration der Probe (1. Woche).

Unter Einbeziehung aller Untersuchungszeitpunkte gab es dennoch beim Vergleich der Applikationsstellen der $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Suspension und der unbehandelten Haut und nach Verabreichung der isotonischen Kochsalzlösung einen signifikanten Unterschied der Aluminiumkonzentration im Gewebe (siehe Tabelle 3.43). Die Aluminiumkonzentration nach Verabreichung der $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Suspension und des $\text{Al}(\text{OH})_3$ -haltigen Tollwut-Impfstoffes 1 unterschied sich nicht signifikant.

Ergebnisse

Eine Übersicht der Differenz der Mittelwerte des jeweils miteinander verglichenen Paares, des Konfidenzintervalls und der p-Werte der beschriebenen Vergleiche zeigt Tabelle 3.43.

Tabelle 3.43 Vergleich der Applikationsstellen bezüglich ihres Aluminiumgehaltes nach subkutaner Verabreichung unterschiedlicher Mittel [$\log_{10}(\text{Al mg/kg})$]

Vergleich der Hautproben		Differenz der Mittelwerte ¹	95%-Konfidenzintervall		p-Wert ²
TI 1	unbehandelt	2,79	1,31	4,27	<0,0001
TI 1	NaCl-Lsg.	-2,48	-3,48	-1,48	<0,0001
TI 1	Al(OH) ₃ -Susp.	-1,08	-2,42	0,26	0,2297
Al(OH) ₃ -Susp.	unbehandelt	1,71	0,04	3,39	0,0410
Al(OH) ₃ -Susp.	NaCl-Lsg.	1,40	0,14	2,67	0,0203
NaCl-Lsg.	unbehandelt	0,31	-1,10	1,72	1,0000

TI 1: Tollwut-Impfstoff 1 (Virus fixe, Stamm G52 mit Al(OH)₃; siehe Tabelle 3.3)

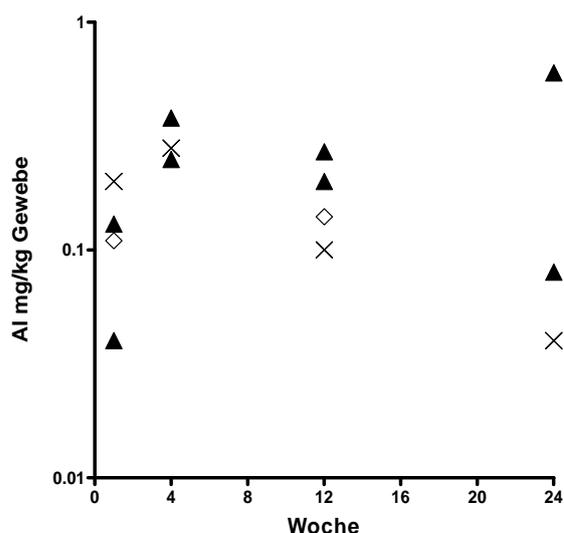
NaCl-Lsg.: isotonische Kochsalzlösung

Susp.: Suspension

¹ Mittelwerte der miteinander verglichenen Gruppen der Hautproben

² Alle Vergleiche mit p-Werten $\leq 0,05$ sind statistisch signifikant zum (multiplen) Testniveau $\alpha = 0,05$.

Analog wurden die in der Milz gemessenen, logarithmierten Werte [$\log_{10}(\text{Al mg/kg})$] mit Hilfe eines gemischt-linearen Modells für wiederholte Messungen ausgewertet. Die Zahlen belegen, dass sich die Aluminiumkonzentration nach Verabreichung der aluminiumhaltigen Suspension bzw. des aluminiumhaltigen Impfstoffes in der Milz nicht verändert (siehe Graph 3.20).



Graph 3.19

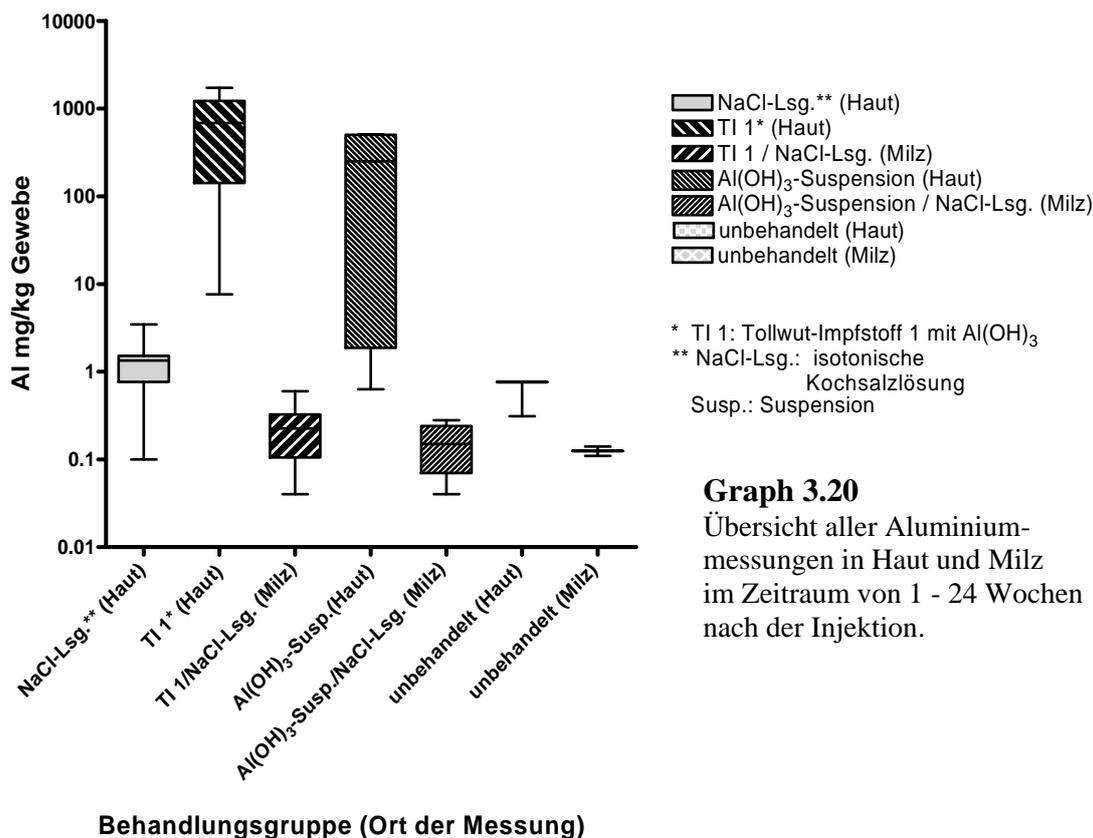
Aluminium im Gewebe der Milz nach Verabreichung des Al(OH)₃-haltigen Tollwut-Impfstoffes 1 bzw. der Al(OH)₃-haltigen Suspension jeweils in Kombination mit einer zweiten Injektion mit isotonischer Kochsalzlösung (siehe 3.1.1) und Aluminiumgehalt in der Milz unbehauelter Tiere.

(Tollwut-Impfstoff 1: Virus fixe, Stamm G52 mit Al(OH)₃; siehe Tabelle 3.3)

- ▲ Tollwut-Impfstoff 1 / isotonische Kochsalzlösung (Milz)
- × Al(OH)₃-Suspension / isotonische Kochsalzlösung (Milz)
- ◇ unbehandelt (Milz)

Ergebnisse

Graph 3.20 zeigt alle Messungen mittels Box-Plot.



Die Auswertung mit einer 2-faktoriellen Varianzanalyse ergab aufgrund der vorliegenden Daten keine eindeutige zeitliche Veränderung der Messwerte bezüglich der Aluminiumkonzentration im Gewebe (eine lediglich leicht negative Steigung von -0,0509; $p = 0,0747$).

Der leichte Abfall der Aluminiumkonzentration in der 24. Woche gegenüber der ersten Woche nach Verabreichung kann nicht direkt als Produkt des Abtransports des Aluminiums angesehen werden, da die Untersuchungen an Proben verschiedener Tiere durchgeführt wurden und zum jeweiligen Zeitpunkt nur je zwei Proben untersucht werden konnten. Wie im Graph 3.17 zu sehen, liegen die Werte in der 12. Woche sogar unter den Werten der 24. Woche nach Verabreichung des Al(OH)₃-haltigen Tollwut-Impfstoffes 1, sodass für eine sichere Aussage mehr Untersuchungen nötig wären.

Deskriptive Maße der logarithmierten Messwerte der ICP-MS [$\log_{10}(\text{Al mg/kg})$]

Die Mittelwerte der logarithmierten Aluminiumkonzentration in den Proben und die dazugehörige Standardabweichung, der Median und das 95%-Konfidenzintervall sind in der Tabelle 3.44 aufgeführt.

Ergebnisse

Diese Übersicht zeigt, dass sich in den Proben der Haut nach Verabreichung aluminiumhaltiger Mittel eine deutlich höhere Aluminiumkonzentration befand als in den Proben nach Verabreichung der Kochsalzlösung und im unbehandelten Gewebe. Im Gegensatz dazu gab es in den Proben der Milz kaum Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Tieren. Aufgrund der geringen Probenzahl konnte keine eindeutige Prüfung der Mittelwerte und Standardabweichungen durchgeführt werden. Daher wurde für die folgenden Auswertungen eine Log-Normal-Verteilung der Daten angenommen. Das heißt, die Messwerte wurden für die Auswertung logarithmiert (\log_{10}).

Tabelle 3.44 Deskriptive Auswertung der Untersuchung der Aluminiumkonzentration in Haut und Milz [$\log_{10}(\text{Al mg/kg})$]

Behandlung	Organ	n*	Mittelwert	s**	Median	95%-KI***	
NaCl-Lsg.	Haut	12	0,03	0,18	0,13	-0,35	0,40
TI 1	Haut	8	2,51	0,22	2,74	2,05	2,97
TI 1/NaCl-Lsg.	Milz	8	-0,73	0,22	-0,75	-1,19	0,27
Al(OH) ₃ -Susp.	Haut	4	1,43	0,31	1,59	0,78	2,08
Al(OH) ₃ -Susp./NaCl-Lsg.	Milz	4	-0,91	0,31	-0,85	-1,56	-0,25
unbehandelt	Haut	3	-0,28	0,36	-0,12	-1,04	0,47
unbehandelt	Milz	2	-0,98	0,44	-0,91	-1,91	-0,05

* Anzahl Messwerte, ** Standardabweichung, *** 95%-Konfidenzintervall der Schätzwerte für die Mittelwerte (Kleinst-Quadrate-Schätzer aus einem gemischt-linearen Modell für wiederholte Messungen)

Susp.: Suspension NaCl-Lsg.: isotonische Kochsalzlösung n: Probenzahl

TI 1: Tollwut-Impfstoff 1 (Virus fixe, Stamm G52 mit Al(OH)₃; siehe Tabelle 3.3)

Bei Betrachtung der Aluminiumkonzentration der Milz der unterschiedlich behandelten Tiere gab es keinen signifikanten Unterschied (siehe Tabelle 3.45).

Tabelle 3.45 Prüfung auf signifikante Unterschiede der Aluminiumkonzentration der Milz nach subkutaner Verabreichung unterschiedlicher Mittel [$\log_{10}(\text{Al mg/kg})$]

Vergleich der Milzproben		Differenz der Mittelwerte ¹	95%-Konfidenzintervall		p-Wert ²
Al(OH) ₃ -Susp./NaCl-Lsg.	TI 1 / NaCl-Lsg.	-0,18	-1,51	1,16	1,0000
Al(OH) ₃ -Susp./NaCl-Lsg.	unbehandelt	0,08	-1,82	1,98	1,0000
TI 1 / NaCl-Lsg.	unbehandelt	0,25	-1,48	1,99	1,0000

Susp.: Al(OH)₃-Suspension NaCl-Lsg.: isotonische Kochsalzlösung

TI 1: Tollwut-Impfstoff 1 (Virus fixe, Stamm G52 mit Al(OH)₃; siehe Tabelle 3.3)

¹ Mittelwerte der miteinander verglichenen Gruppen

² Vergleiche mit p-Werten $\leq 0,05$ sind statistisch signifikant zum (multiplen) Testniveau $\alpha = 0,05$.

Ergebnisse

Die gemessenen Konzentrationen in der Haut und in der Milz für die entsprechenden Injektionen wurden im gemischt-linearen Modell für wiederholte Messungen gegenübergestellt. Die Aluminiumkonzentration der unbehandelten Haut unterschied sich nicht signifikant von der Aluminiumkonzentration der Milz des unbehandelten Tieres ($p = 1,0000$). Dagegen gab es signifikante Unterschiede im Vergleich der Aluminiumkonzentration der Milzproben mit den Hautproben der selben Tiere nach Verabreichung aluminiumhaltiger Mittel (siehe Tabelle 3.46).

Tabelle 3.46 Prüfung auf signifikante Unterschiede der Aluminiumkonzentration in den Organproben von Haut und Milz [$\log_{10}(\text{Al mg/kg})$]

Vergleich		Differenz der Mittelwerte ¹	95%-Konfidenzintervall		p-Wert ²
Haut, TI 1	Milz, TI 1/NaCl-Lsg.	3,24	2,15	4,33	<0,0001
Haut, Al(OH) ₃ -Susp.	Milz, Al(OH) ₃ /NaCl-Lsg.	2,34	0,79	3,88	0,0009
Haut, unbehandelt	Milz, unbehandelt	0,70	-1,30	2,70	1,0000

Al(OH)₃: Al(OH)₃-Suspension

NaCl: isotonische Kochsalzlösung

TI 1: Tollwut-Impfung 1 (Virus fixe, Stamm G52 mit Al(OH)₃; siehe Tabelle 3.3)

¹ Mittelwerte der miteinander verglichenen Gruppen

² Alle Vergleiche mit p-Werten $\leq 0,05$ sind statistisch signifikant zum (multiplen) Testniveau $\alpha = 0,05$.

3.2.4. Elektronenmikroskopische Befunde

Untersucht wurden die Unterhautproben der Versuchsserie 1 (siehe 3.1.1) nach Verabreichung des Al(OH)₃-haltigen Tollwut-Impfstoffes 1 (siehe Tabelle 3.3) und nach Verabreichung einer Al(OH)₃-Suspension (siehe Tabelle 3.3).

Die Al(OH)₃-Suspension war für die Verwendung als Adjuvans in Impfstoffen von Chiron vaccines, Behring-Werke in Marburg, hergestellt worden. Außerdem wurden zur Kontrolle Unterhautproben von unbehandelten Tieren und von Tieren, denen isotonische Kochsalzlösung verabreicht worden war, untersucht. Die Untersuchung der entsprechenden Applikationsstellen erfolgte eine Woche, vier, zwölf und vierundzwanzig Wochen nach der Injektion. Zu jedem Untersuchungszeitpunkt standen jeweils zwei Unterhautproben nach Verabreichung des Tollwut-Impfstoffes 1 und eine Unterhautprobe nach Verabreichung der Al(OH)₃-Suspension zur Verfügung. Die Unterhaut unbehandelter Tiere wurde in der ersten und zwölften Woche nach Versuchsbeginn in die Untersuchung einbezogen.

Ergebnisse

Für die Untersuchung der Unterhautproben nach Verabreichung der isotonischen Kochsalzlösung standen zu jedem Untersuchungszeitpunkt drei Proben zur Verfügung.

Zur Überprüfung der Bestandteile des Impfstoffes, die mittels Elektronenmikroskopie dargestellt werden können, wurden ein $\text{Al}(\text{OH})_3$ -haltiger und ein adjuvansfreier Tollwut-Impfstoff untersucht. Die Herstellung der Proben dieser Impfstoffe ist unter 3.1.4.3 beschrieben. In den Schnitten des $\text{Al}(\text{OH})_3$ -haltigen Impfstoffes wurden elektronendichte nadelförmige Strukturen gefunden, die ungerichtet im Schnitt verteilt waren (Bild 3.23). In den Schnitten, die zum adjuvansfreien Impfstoff gehörten, konnte keine auffällige Struktur dargestellt werden (Bild 3.24). Die schwarz gefärbten Bereiche im Bild 3.24 sind Teile des Grids, die als Kontrast zu Herstellung des Bildes benötigt wurden.

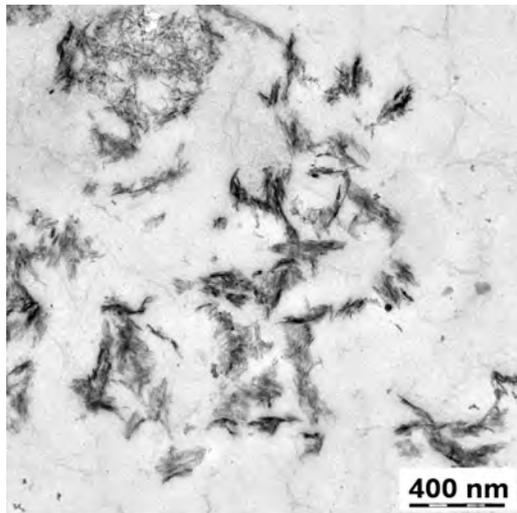


Bild 3.23

Der in Agarose eingebettete $\text{Al}(\text{OH})_3$ -haltige Impfstoff weist bei Betrachtung im Elektronenmikroskop nadelförmige Strukturen auf.

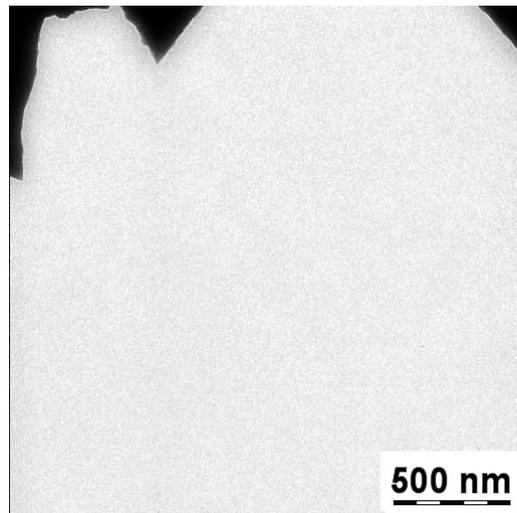


Bild 3.24

Der zur Kontrolle in Agarose eingebettete adjuvansfreie Impfstoff erscheint bei der Betrachtung im Elektronenmikroskop homogen.

In den Unterhautproben konnten mittels Elektronenmikroskopie Einschlüsse von Fremdmaterial im Zytoplasma von phagozytierenden Zellen nach Verabreichung der $\text{Al}(\text{OH})_3$ -haltigen Mittel dargestellt werden. Die Einschlüsse erschienen als Aggregate von feinen, nadelförmigen, wahllos orientierten und elektronendichten Strukturen, die in unterschiedlich großen Anhäufungen zusammen lagen (Bild 3.25). Diese Anhäufungen waren oft von einer Membran umgeben (Bild 3.25 und 3.26).

Ergebnisse

Der Nachweis dieser Strukturen konnte bis einschließlich der vierundzwanzigsten Woche nach Verabreichung des $\text{Al}(\text{OH})_3$ -haltigen Tollwut-Impfstoffes 1 erbracht werden (Bild 3.27).

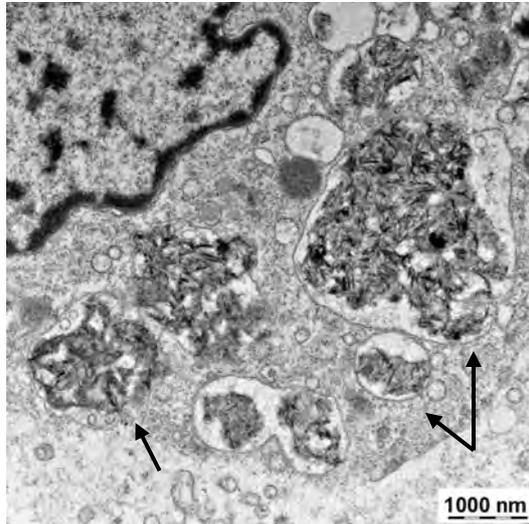


Bild 3.25
Phagozytierende Zelle mit nadelförmigen Einschlüssen (Pfeile), 4. Woche. Probe C105a

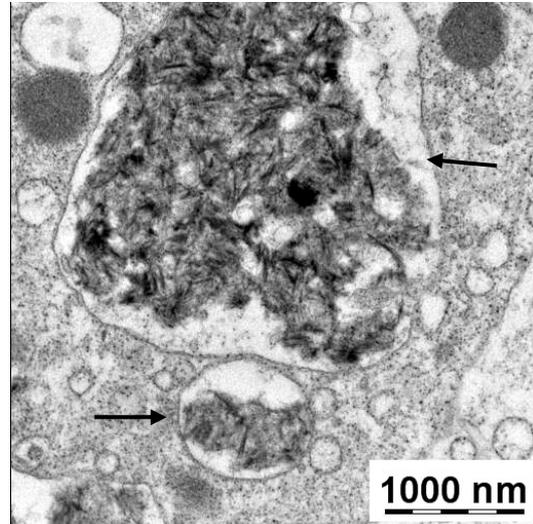


Bild 3.26
Der Zelleinschluss ist durch eine Membran (Pfeile) vom Zytoplasma der Zelle abgegrenzt, 4. Woche. Probe C105a
Ausschnitt aus Bild 3.25

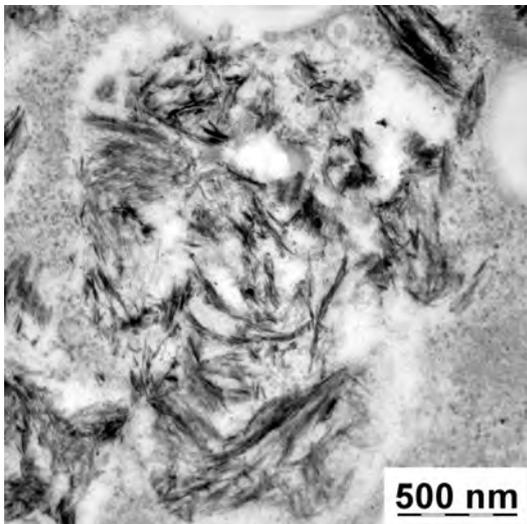


Bild 3.27
Nadelförmige Einschlüsse im Zytoplasma, 24. Woche. Probe D14a

Bild 3.25 bis 3.27: Nach Verabreichung des Tollwut-Impfstoffes 1 [Virus fixe, Stamm G52 mit $\text{Al}(\text{OH})_3$]

Der Vergleich der unterschiedlichen Zeiträume nach der Injektion wies auf eine Änderung des Anteils an den nadelförmigen Strukturen im Zytoplasma der phagozytierenden Zelle hin. Während in der ersten Woche nach der Injektion große Ansammlungen der nadelförmigen Strukturen im Zytoplasma nachgewiesen wurden, konnten zu späteren Zeitpunkten kleinere und größere Ansammlungen beobachtet werden.

Ergebnisse

Die Anzahl der Ansammlungen war gegenüber der Anzahl in den vorausgegangenen Proben deutlich vermehrt (vergleiche Bilder 3.28 bis 3.31).

Darstellung der nadelförmigen Strukturen im Gewebe

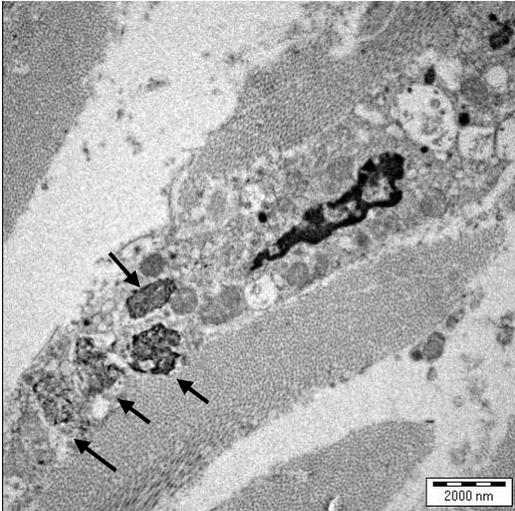


Bild 3.28

1. Woche. Probe C101a

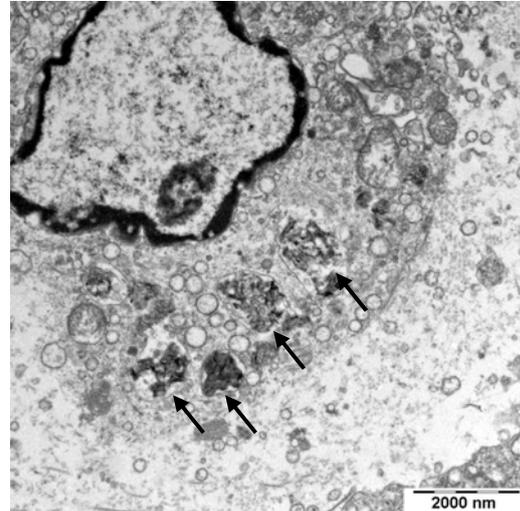


Bild 3.29

4. Woche. Probe C105a

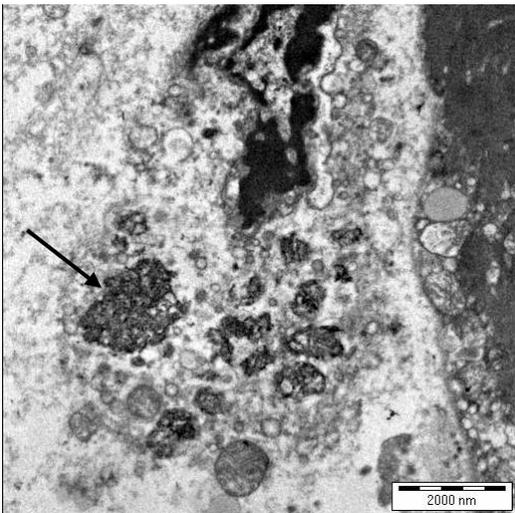


Bild 3.30

12. Woche. Probe D3a

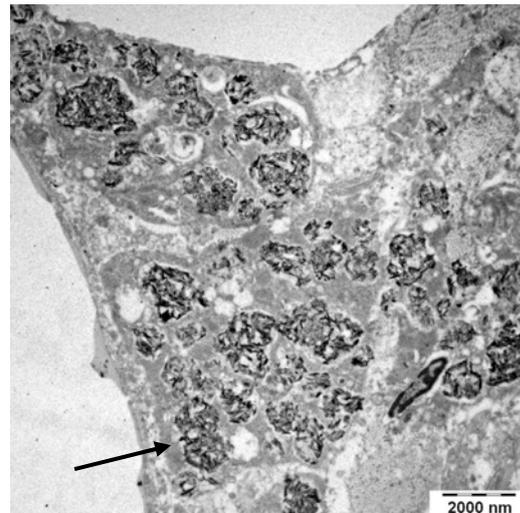


Bild 3.31

24. Woche. Probe D14a

Bild 3.28 - 3.31 Verabreicht wurde Tollwut-Impfstoff 1 [Virus Fixe, Stamm G52 mit $\text{Al}(\text{OH})_3$]

In den Unterhautproben der Applikationsstelle nach Verabreichung des $\text{Al}(\text{OH})_3$ -haltigen Tollwut-Impfstoffes 1 konnten zum Teil die beschriebenen nadelförmigen Strukturen nachgewiesen werden. Die Tabelle 3.47 zeigt, in welchen Proben zu welchem Zeitpunkt die nadelförmigen Strukturen nachweisbar waren.

**Tabelle 3.47 Elektronenmikroskopische Untersuchung
(Angabe der Probenzahl)**

Applikation von	n	1. Woche		4. Woche		12. Woche		24. Woche	
		pos.	nmb.	pos.	nmb.	Pos.	nmb.	pos.	nmb.
Al(OH) ₃ -haltigem Tollwut-Impfstoff 1	8	2	-	2	-	1	1	1	1
Al(OH) ₃ -Suspension	4	-	1*	1	-	-	1	-	1
isotonischer Kochsalzlösung	12	-	3	-	3	-	3	-	3
Haut von unbehandeltem Tier	2	-	1	nv		-	1	nv	

pos.: positiv nmb.: nicht nachweisbar n: Probenzahl nv: nicht vorhanden

Da die Markierung der Tiere in der Versuchsserie 1 alle 2-3 Tage aufgefrischt werden musste, waren Abweichungen von der ursprünglichen Markierung durch Bewegung des Tieres oder durch die Farbverteilung auf der Haut beim Auffrischen der Markierung möglich. Daraus ergibt sich:

*Zum Zeitpunkt der ersten Untersuchung eine Woche nach der Injektion, konnte bei der histologischen Untersuchung der Haut des behandelten Tieres 9 nur geringgradige Anzeichen einer Reaktion auf die Injektion nachgewiesen werden. Daher besteht die Möglichkeit, dass die entnommene Probe am Rand der Applikationsstelle lag.

Nach einer Woche konnten phagozytierende Zellen ohne (Bild 3.32) und mit (Bild 3.33) nadelförmigen Strukturen im Zytoplasma in einer Probe dargestellt werden.



Bild 3.32

Zellen ohne (Bild 3.32) und mit (Bild 3.33) nadelförmigen Strukturen im Zytoplasma, eine Woche nach Verabreichung des Tollwut-Impfstoffes 1 [Virus fixe, Stamm G52 mit Al(OH)₃]. Probe C101a.

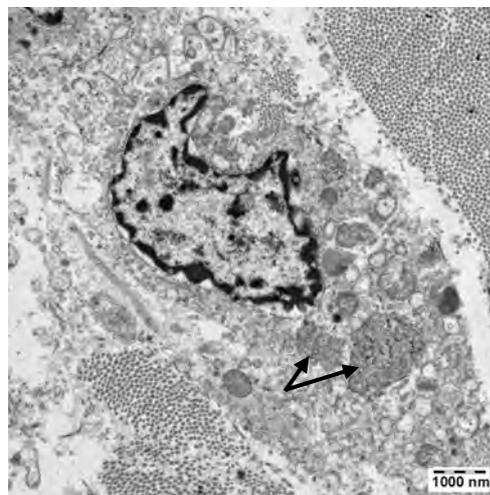


Bild 3.33

In der vierten Woche konnten phagozytierende Zellen mit Anzeichen für eine Degeneration des Zellkerns beobachtet werden (vergleiche Bild 3.34 mit 3.35).

Ergebnisse

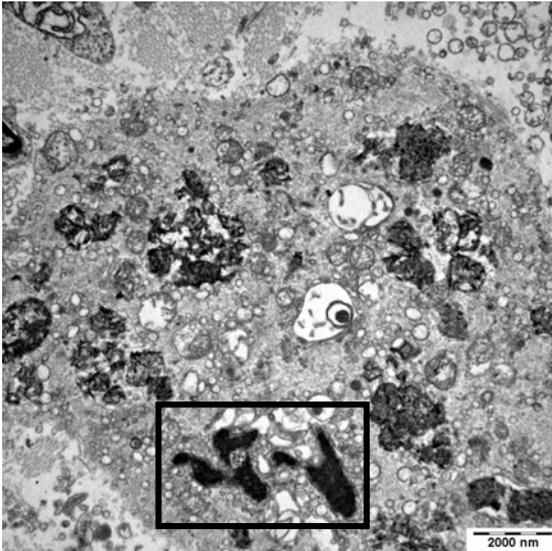


Bild 3.34

Zellkern degeneriert (Rechteck) und intakt (Kreis), 4. Woche. Probe C105a



Bild 3.35

Die Bilder 3.34 und 3.35 stammen von einer Probe, die vier Wochen nach Verabreichung des Tollwut-Impfstoffes 1 [Virus fixe, Stamm G52 mit $\text{Al}(\text{OH})_3$] entnommen wurde. Auffallend ist in Bild 3.34 der Anteil eines Zellkerns (Rechteck), der auf die Degeneration desselben hinweist.

Auch in der zwölften Woche wurden nadelförmige Strukturen im Zytoplasma phagozytierender Zellen nachgewiesen (Bild 3.30, 3.36 - 3.39).

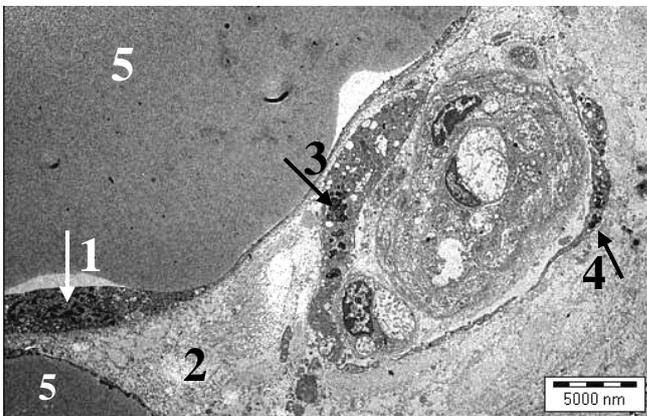


Bild 3.36

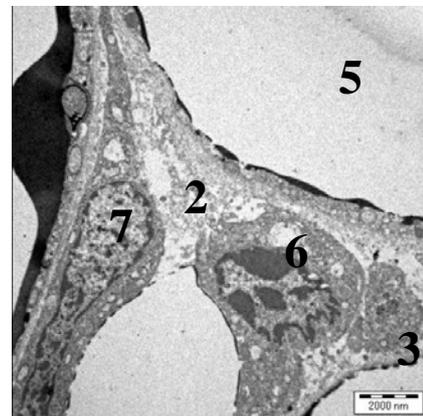


Bild 3.37

Legende für Bild 3.36 und 3.37 (12. Woche, Probe D3a):

1: Zellkern der Fettzelle

3 und 4: Zelle mit nadelförmigen Strukturen im Zytoplasma

6 und 7: Zelle ohne nadelförmige Strukturen im Zytoplasma

2: Zytoplasma der Fettzelle

5: Vakuole der Fettzelle

Die Bilder 3.36 bis 3.39 zeigen die Aufnahmen der Hautprobe eines Tieres zwölf Wochen nach Verabreichung des $\text{Al}(\text{OH})_3$ -haltigen Tollwut-Impfstoffes 1 [Virus fixe, Stamm G52]. Das aluminiumhaltige Adjuvans ist in Form von elektronendichten nadelförmigen Strukturen zu erkennen.

Ergebnisse

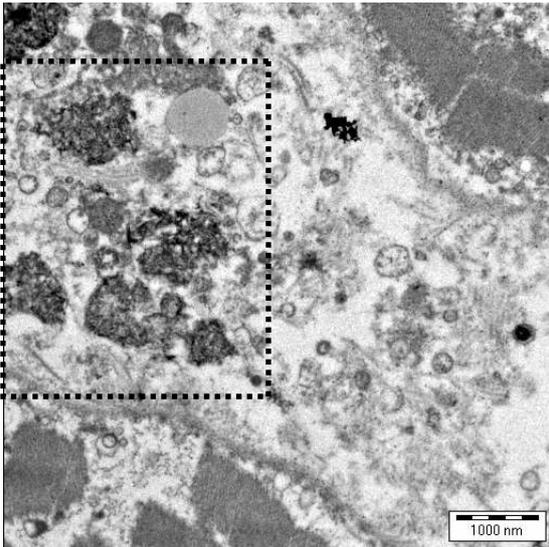


Bild 3.38
Ansammlungen nadelförmiger Strukturen
(Rechteck), 12. Woche. Probe D3a

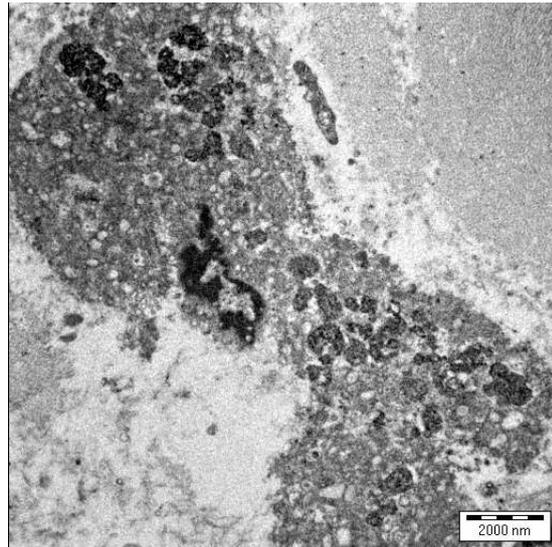


Bild 3.39
Ansammlungen nadelförmiger Strukturen in
phagozytierender Zelle, 12. Woche. Probe D3a

In den Proben der vierundzwanzigsten Woche konnten die nadelförmigen Strukturen im Bereich des Fettgewebes nachgewiesen werden (Bilder 3.40 - 3.41). Hierbei lagen mehrere Ansammlungen der nadelförmigen Strukturen in einem Gebiet, das von der Umgebung abgegrenzt war.

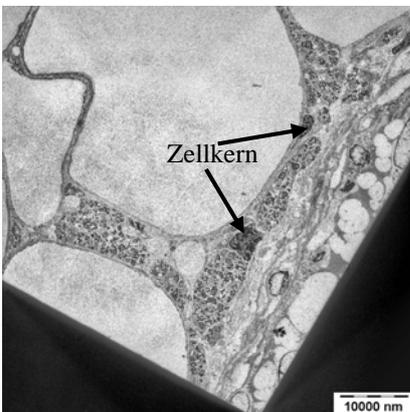


Bild 3.40
Übersicht der nadelförmigen
Strukturen im Fettgewebe,
24. Woche. Probe D14a

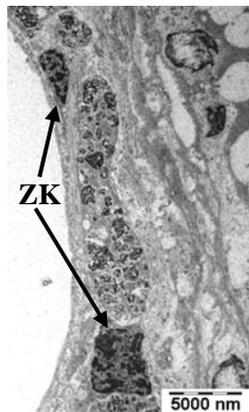


Bild 3.41
Ausschnittsvergrößerung aus Bild 3.40
ZK: Zellkern

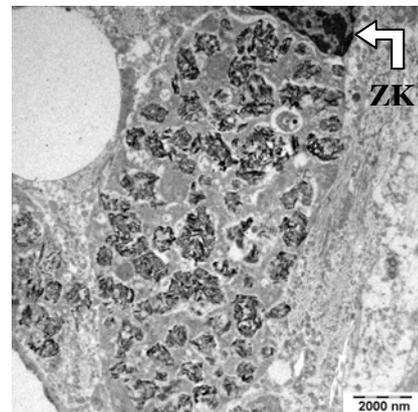


Bild 3.42

Darstellung der nadelförmigen Struktur im Gewebe (Bild 3.40 bis 3.42) 24 Wochen nach Verabreichung des $\text{Al}(\text{OH})_3$ -haltigen Tollwut-Impfstoffes 1 [Virus fixe, Stamm G52].

Manche der Ansammlungen der nadelförmigen Strukturen waren von Kollagenfasern (K) umgeben (Bild 3.44).

Ergebnisse

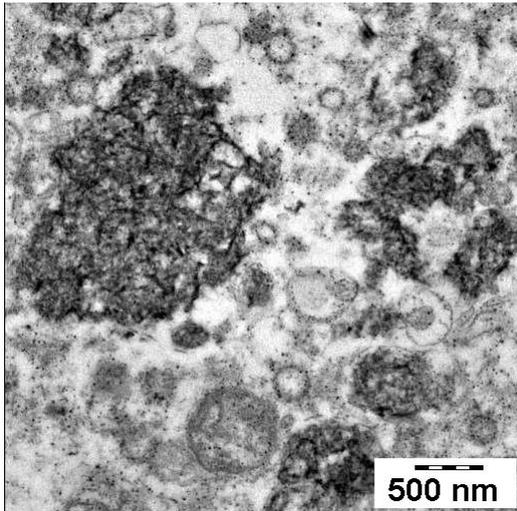


Bild 3.43
Nadelförmige Ansammlungen in der
12. Woche. Probe D3a

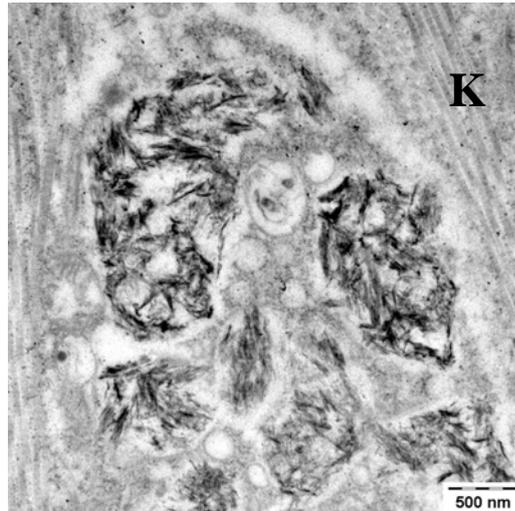


Bild 3.44
Die Ansammlungen werden von Kollagen (K)
umgeben, 24. Woche. Probe D 14a

Bei Betrachtung der unterschiedlichen Proben fiel auf, dass sich die Bestandteile des Zellinneren der phagozytierenden Zellen im zeitlichen Verlauf verändern. In den Proben vier Wochen nach Verabreichung des $\text{Al}(\text{OH})_3$ -haltigen Tollwut-Impfstoffes 1 sind kreisförmige Zellorganellen (Vakuolen) mit und ohne nadelförmige Strukturen im Inneren zu erkennen (siehe Pfeile in Bild 3.45). In beiden Fällen ist eine Zellmembran deutlich zu erkennen. In der 24. Woche ist die Zellmembran der Vakuolen nicht mehr darstellbar (Bild 3.46).

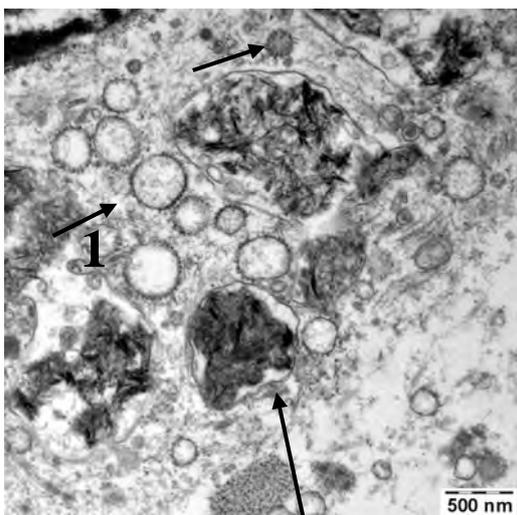


Bild 3.45
4. Woche. Probe C105a
Vakuolenmembran vorhanden

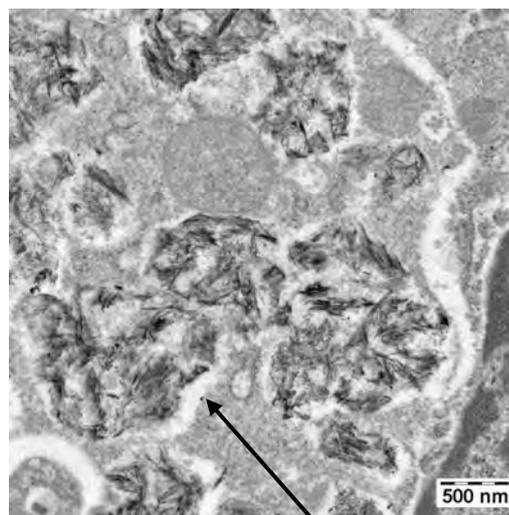


Bild 3.46
24. Woche. Probe D14a
keine Vakuolenmembran erkennbar

Darstellung der Ansammlungen der nadelförmigen Strukturen und deren Zwischenraum im Vergleich. Der Probenentnahme ging eine Impfung mit dem Tollwut-Impfstoff 1 [Virus fixe, Stamm G52 mit $\text{Al}(\text{OH})_3$] voraus.

3.2.5. Befunde der energiedispersiven Röntgenanalytik

Zwei Proben, die für die Elektronenmikroskopie präpariert und geschnitten worden sind, wurden mittels energiedispersiver Röntgenanalytik untersucht. Hierbei sollte ermittelt werden, ob es sich bei der nadelförmigen Struktur um Aluminium handelt.

Zuerst wurde eine Messung von drei dicht nebeneinander liegenden „Nadeln“ im Schnitt der Probe aus der 24. Woche nach der Impfung durchgeführt (siehe Bild 3.47, Pfeil 1). Die Bestandteile der im Brennpunkt befindlichen Elemente, sind im Spektrum 3.1 dargestellt.

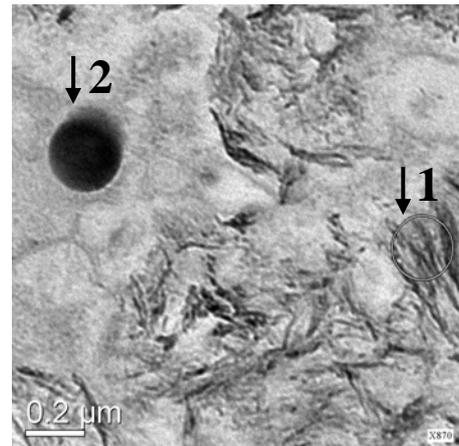


Bild 3.47

Messpunkte zur Elementbestimmung

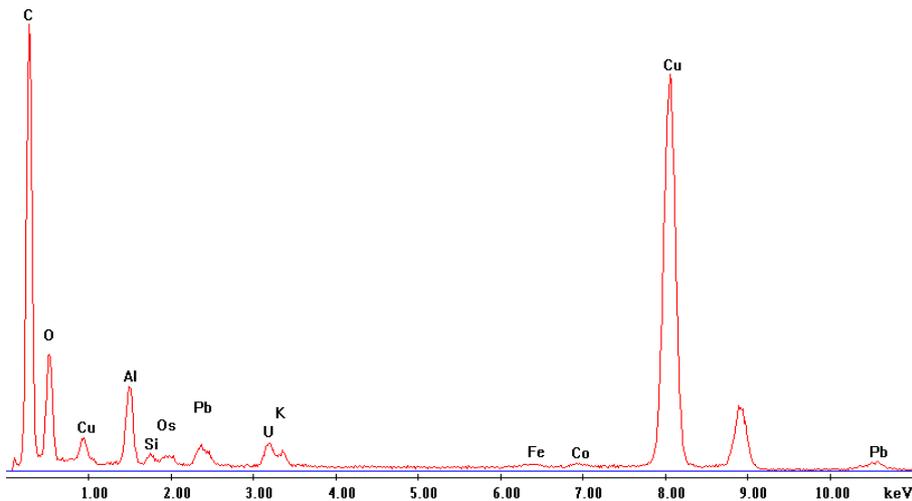
Punkt 1: Untersuchung der nadelförmigen Struktur

Punkt 2: Untersuchung der Umgebung der nadelförmigen Struktur

Da Kohlenstoff aufgrund der Kohlenstoffbeschichtung des Grids und Kupfer aufgrund der Beschaffenheit desselben (Kupfergrid) in hohen Mengen in der Probe vorhanden waren, wurden diese Elemente in der weiteren Betrachtung nicht berücksichtigt. Die verbliebenen Elemente waren in unterschiedlicher Konzentration vertreten. Hierzu gehörten 75,8 % Sauerstoff, 14,3 % Aluminium, 1,9 % Silicium, 1,8 % Osmium, 0,3 % Kalium, 1,2 % Eisen, 1,1 % Cobalt, 3,2 % Blei und 0,4 % Uran. Da Osmium, Blei und Uran zur Kontrastierung verwendet worden waren, spielten diese Elemente bei der Betrachtung keine Rolle. Bei der darauf folgenden Messung in der nahen Nachbarschaft der „Nadeln“ (Pfeil 2), konnte kein Aluminium im Spektrum dargestellt werden (siehe Spektrum 3.2). In der weiteren Betrachtung wurde Kupfer und Kohlenstoff erneut ausgeschlossen. Die verbliebenen Elemente waren 84,9 % Sauerstoff, 0,0 % Aluminium, 4,6 % Silicium, 2,5 % Osmium, 1,3 % Uran, 0,5 % Kalium, 1,7 % Eisen und 4,5 % Blei.

Ergebnisse

Spektrum 3.1 Aluminiumnachweis im Eponschnitt (24. Woche)

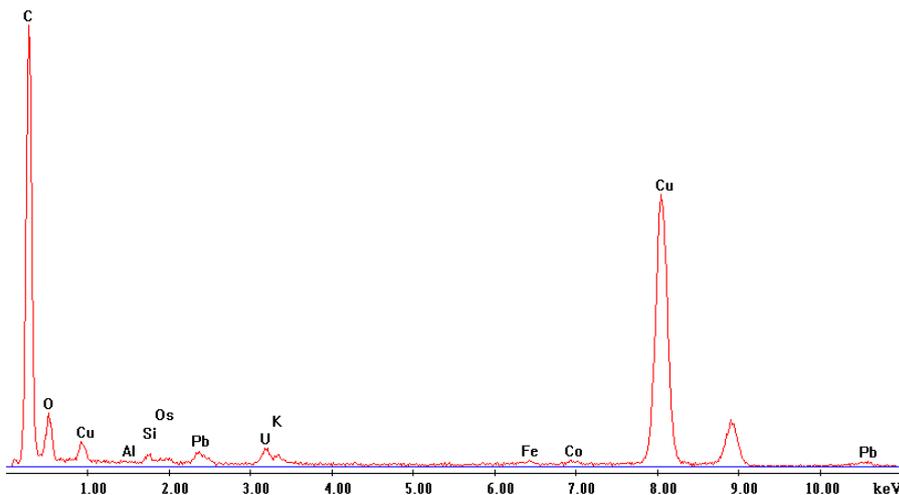


Abkürzungen:

C : Kohlenstoff
O : Sauerstoff
Cu : Kupfer
Al : Aluminium
Si : Silicium
Os : Osmium
Pb : Blei
U : Uran
K : Kalium
Fe : Eisen
Co : Cobalt

Spektrum 3.1 Bei dieser Untersuchung wurde Aluminium nachgewiesen.

Spektrum 3.2 Aluminiumnachweis im Eponschnitt (24. Woche)



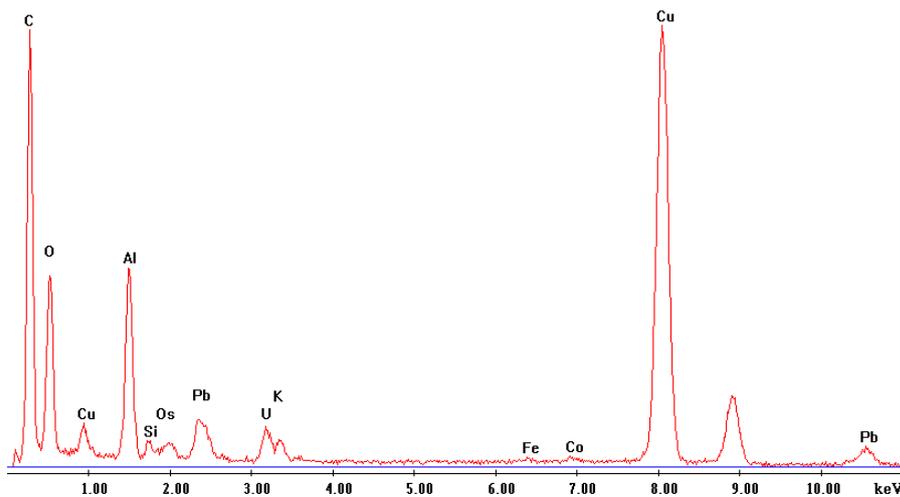
Abkürzungen:

C : Kohlenstoff
O : Sauerstoff
Cu : Kupfer
Al : Aluminium
Si : Silicium
Os : Osmium
Pb : Blei
U : Uran
K : Kalium
Fe : Eisen
Co : Cobalt

Spektrum 3.2 Kein Nachweis von Aluminium in der unmittelbaren Nachbarschaft der nadelförmigen Strukturen

Für die folgende Untersuchung wurde nur eine der „Nadeln“ der Röntgenanalyse unterzogen. Das daraus resultierende Spektrum zeigt deutliche Unterschiede in der Aluminiumkonzentration gegenüber der vorausgegangenen Untersuchung. Im Bereich der „Nadel“ konnten 73,1 % Sauerstoff, 19,7 % Aluminium, 1,7 % Silicium, 1,2 % Osmium, 0,3 % Kalium, 3,7 % Blei und 0,3 % Uran nachgewiesen werden. Abgebildet ist dies als Spektrum 3.3.

Spektrum 3.3 Aluminiumnachweis im Eponschnitt (24. Woche)



Abkürzungen:

- C : Kohlenstoff
- O : Sauerstoff
- Cu : Kupfer
- Al : Aluminium**
- Si : Silicium
- Os : Osmium
- Pb : Blei
- U : Uran
- K : Kalium
- Fe : Eisen
- Co : Cobalt

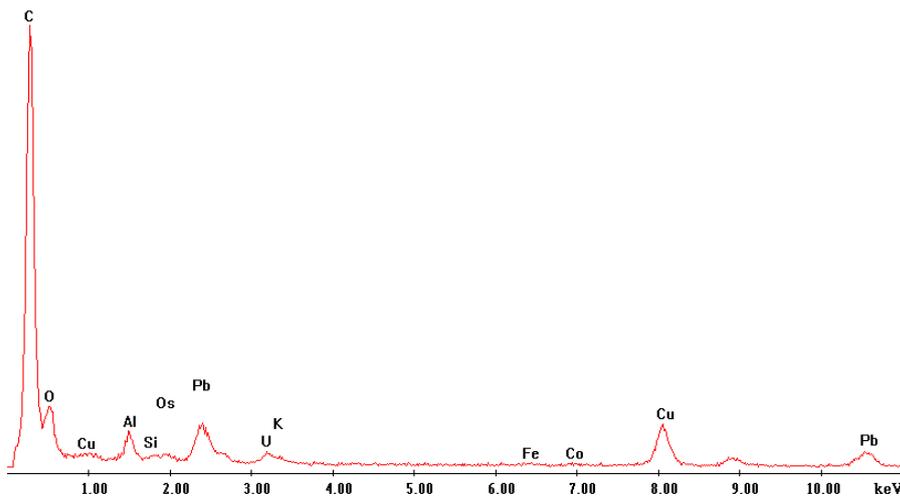
Spektrum 3.3 Nachweis von Aluminium und Sauerstoff in einer „Nadel“ im Eponschnitt

Aus dem Spektrum 3.3 wurden alle Elemente außer Aluminium und Sauerstoff entfernt und deren Verhältnis näher betrachtet. Bei der Untersuchung konnte festgestellt werden, dass Aluminium zu 21,2 % und Sauerstoff zu 78,8 % in der Nadel vertreten war.

Das Verhältnis von Aluminium und Sauerstoff im reinen Aluminiumhydroxid ist 1:3. Das bei der Untersuchung vorgefundene Verhältnis von Aluminium und Sauerstoff deutet darauf hin, dass die nadelförmige Struktur noch aus fast reinem Aluminiumhydroxid besteht. Da die Probe 24 Wochen (168 Tage) nach Verabreichung des Al(OH)₃-haltigen Tollwut-Impfstoffes 1 (siehe Tabelle 3.3) verabreicht worden war, kann der biologische Abbau und Abtransport des Al(OH)₃ bis zu diesem Zeitraum weitgehend ausgeschlossen werden. Zur Kontrolle wurde eine weitere Probe aus der 12. Woche nach Verabreichung der Impfung zur Untersuchung herangezogen. Auch in dieser konnten nadelförmige Strukturen im Schnitt dargestellt werden. Diese lagen einerseits extrazytoplasmatisch andererseits im Zytoplasma phagozytierender Zellen. Zur Bestimmung wurde die nadelförmige Struktur in einer Zelle verwendet. Auch diese Untersuchung bewies eindeutig die Anwesenheit von Aluminium. Das Spektrum 3.4 zeigt die dazugehörige Darstellung der Bestandteile der Untersuchung. Diese waren 72,6 % Sauerstoff, 9,4 % Aluminium, 1,4 % Silicium, 2,1 % Osmium, 3,0 % Chlor, 0,5 % Kalium, 10,6 % Blei und 0,4 % Uran. Die Betrachtung erfolgte ohne Berücksichtigung des vorhandenen Kohlenstoffes und Kupfers.

Ergebnisse

Spektrum 3.4 Aluminiumnachweis im Eponschnitt (12. Woche)



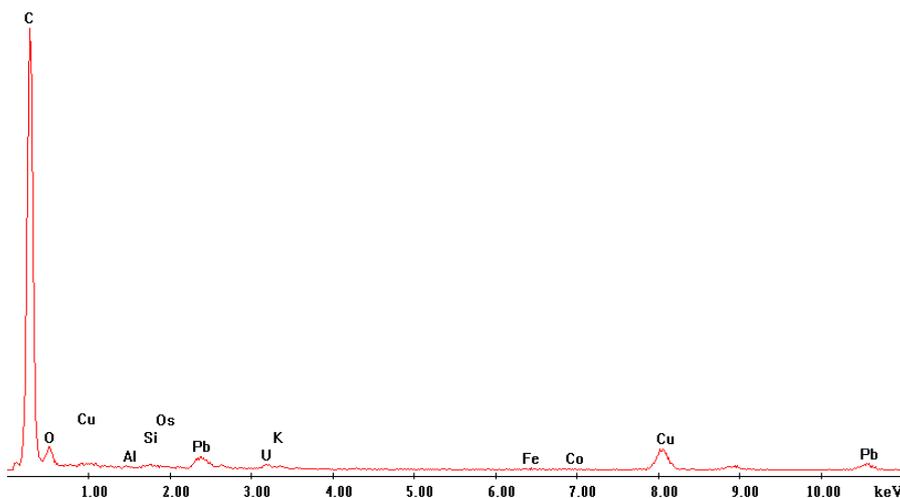
Abkürzungen:

C : Kohlenstoff
O : Sauerstoff
Cu : Kupfer
Al : Aluminium
Si : Silicium
Os : Osmium
Pb : Blei
U : Uran
K : Kalium
Fe : Eisen
Co : Cobalt

Spektrum 3.4 Nachweis von Aluminium in einer weiteren Probe

Auch in diesem Schnitt wurde die unmittelbare Umgebung der nadelförmigen Strukturen der Analyse unterzogen. Unter Ausschluss des Kohlenstoffes lies sich bei dieser Untersuchung 62,1 % Sauerstoff, 2,9 % Silicium, 1,0 % Osmium, 0,4 % Kalium, 24,8 % Kupfer, 8,5 % Blei und 0,3 % Uran, aber kein Aluminium nachweisen (siehe Spektrum 3.5).

Spektrum 3.5 Aluminiumnachweis im Eponschnitt (12. Woche)



Abkürzungen:

C : Kohlenstoff
O : Sauerstoff
Cu : Kupfer
Al : Aluminium
Si : Silicium
Os : Osmium
Pb : Blei
U : Uran
K : Kalium
Fe : Eisen
Co : Cobalt

Spektrum 3.5 Kein Nachweis von Aluminium in der unmittelbaren Nachbarschaft der nadelförmigen Strukturen

Ergebnisse

Mit Hilfe der energiedispersiven Röntgenanalytik konnte in beiden Fällen mit Sicherheit nachgewiesen werden, dass die nadelförmigen Strukturen Aluminium enthalten. Aufgrund des ermittelten Verhältnisses von Sauerstoff und Aluminium in einer der nadelförmigen Strukturen (siehe Spektrum 3.3 und anschließender Text) liegt nahe, dass es sich bei diesen um fast reines $\text{Al}(\text{OH})_3$ handelt.

4. Diskussion

Ende der 80er Jahre wurden in den USA nach Impfungen vermehrt Entzündungen unklarer Genese in der Subkutis von Hunden und Katzen festgestellt. Mit Beginn der 90er Jahre trat das feline Fibrosarkom gehäuft auf. Da dessen Prognose ungünstig ist, betrachtete man dieses mit besonderer Aufmerksamkeit. Aufgrund der Lokalisation am Körper, seiner Lage im Gewebe und der lokalen Entzündungsreaktion vermutete man einen Zusammenhang mit der zuvor verabreichten Impfung (Hendrick & Goldschmidt 1991; Hendrick & Dunagan 1991). Inzwischen besteht der Verdacht, dass eine chronische Entzündung zur neoplastischen Transformation von Zellen führen kann (Hendrick 1998).

Beim Frettchen steht neben dem Fibrosarkom (Munday *et al.* 2003; Murray 1998) auch die Myofasziitis als Erkrankung, die durch eine Entzündung als Folge einer Impfung ausgelöst werden kann in der Diskussion (Garner *et al.* 2007). Die vorliegende Arbeit konzentrierte sich deshalb darauf, die Entstehung und das Ausmaß der Entzündung nach Verabreichung unterschiedlicher Impfstoffe am Frettchen zu untersuchen.

4.1 Aluminiumhydroxidhaltiges Adjuvans

Aluminiumhydroxid wird seit Jahrzehnten als Adjuvans in Impfstoffen verwendet, da belegt werden konnte, dass bei Zusatz von Aluminiumhydroxid oder durch Präzipitation des Toxoids an Aluminiumverbindungen die immunologische Antwort deutlich verstärkt wurde (Glenny *et al.* 1926; McGinnes & Stebbins 1934; Panisset 1949).

Aluminiumhaltige Adjuvantien stimulieren eine selektive Typ 2 Immunantwort (Bomford 1980; Mosmann & Coffman 1989; Bomford *et al.* 1992; Comoy *et al.* 1997). Der Wirkungsmechanismus von aluminiumhaltigen Adjuvantien ist bis heute unbekannt. Ursprünglich wurde angenommen, dass sie über die Bildung eines Antigendepots an der Injektionsstelle wirken (Blagowechensky 1938). Dies wurde inzwischen widerlegt (Eisler & Eibl 1949). Als weitere Möglichkeiten im Wirkungsmechanismus wurden die Komplementaktivierung und die Aktivierung von eosinophilen Granulozyten oder Makrophagen angesehen (Walls 1977). Es konnte nachgewiesen werden, dass aluminiumhaltiges Adjuvans die IL-4 Produktion und die T-Helfer2-Antwort unabhängig von der IL-4- und IL-13-vermittelten Signalgebung bei Mäusen induzieren kann (Brewer *et al.* 1999).

Diskussion

Durch die zuvor beschriebene Induktion der Produktion von IgE im Rahmen der Typ 2 Immunantwort können aluminiumhaltige Adjuvantien allergische Reaktionen auslösen.

Über den Nachweis von antigen-spezifischen IgE-Antikörpern konnten allergische Reaktionen nach Verabreichung aluminiumhaltiger Impfstoffe beim Menschen belegt werden (Bergfors *et al.* 2005). Diese korrelierten mit dem Ausmaß der Lokalreaktionen (Blennow *et al.* 1990; Mark *et al.* 1997).

Untersuchungen der Applikationsstellen bezüglich des aluminiumhaltigen Adjuvans von Impfstoffen belegten dessen Persistenz im Gewebe bis zu einem Jahr nach der Verabreichung (Eisler & Eibl 1949; Pineau *et al.* 1992; Gupta *et al.* 1995; Hem 2002; Verdier *et al.* 2005).

Möglicherweise ist in Einzelfällen die lange Persistenz des Aluminiums die Ursache für die chronische Entzündungsreaktion. Diese könnte bei empfänglichen Individuen ein Substrat für die maligne Transformation von Zellen sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Verbleib von aluminiumhaltigem Adjuvans von der 1. bis 24. Woche nach der Impfung untersucht. Im gesamten Untersuchungszeitraum konnte es an der Applikationsstelle nachgewiesen werden. Die Ansammlungen zeigten sich im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) als elektronendichte, nadelförmige Strukturen. Sie lagen extrazellulär im Gewebe oder im Zytoplasma phagozytischer Zellen. In letzterem Fall konnte beobachtet werden, dass die Einschlüsse im Zytoplasma von einer Membran umgeben waren (Bild 3.26). In der 4. Woche wurden neben intakten phagozytischen Zellen auch Zellen mit in Degeneration befindlichem Zellkern aufgefunden (Bilder 3.34 und 3.35). Dies deutet darauf hin, dass die Zellen, die das Aluminium aufgenommen haben, noch am Applikationsort zu Grunde gehen. In der 24. Woche erschienen die nadelförmigen Strukturen wesentlich deutlicher. Anhand der bildlichen Darstellung über das TEM konnte nicht ermittelt werden, ob Anteile des verabreichten Aluminiums vom Applikationsort entfernt worden sind. Über die induktiv gekoppelte Plasmaionen-Massenspektrometrie (siehe 3.2.3) wurde jedoch 24 Wochen nach Verabreichung des Al(OH)₃-haltigen Tollwut-Impfstoffes 1 in einer Probe fast die gleiche Aluminiumkonzentration im Gewebe gemessen wie in den beiden Proben nach einer Woche.

Diskussion

Unter Berücksichtigung der geringen Probenzahl in dieser Versuchsserie und der möglichen leichten Abweichung vom Applikationsort des Impfstoffes bei der Probenentnahme, liegt die Vermutung nahe, dass das Aluminium vom Organismus nicht oder in nur sehr geringem Ausmaß vom Applikationsort entfernt werden konnte. Für diese These spricht auch der Nachweis von Aluminium und Sauerstoff durch die energiedispersive Röntgenanalytik (siehe 3.2.5, Spektrum 3.3 und anschließender Text). Während Hem (2002) den Nachweis einer fallenden Aluminiumkonzentration im Blut nach aluminiumhaltiger Injektion am Neuseeländer Kaninchen über den Beobachtungszeitraum von 28 Tagen lieferte, konnte nach intrakutaner Verabreichung von aluminiumhaltigen Impfstoffen kein wesentlicher Anstieg der Aluminiumkonzentration im Blut gemessen werden (Pineau 1992).

In den Versuchsserien der vorliegenden Arbeit am Frettchen wurden die Injektionen subkutan verabreicht. Bei der zuvor beschriebenen Arbeit von Hem (2002) jedoch intramuskulär und bei Pineau (1992) intrakutan. Aufgrund der unterschiedlichen Applikationsorte könnte auch der Abtransport des Aluminiums in unterschiedlichem Ausmaß geschehen sein und sich dadurch die Befunde der Blutuntersuchung der Neuseeländer Kaninchen erklären. Dagegen spricht jedoch eine Beobachtung, die schon 1949 bei Untersuchungen von aluminiumhaltigen Granulomen an Meerschweinchen gemacht wurde. Hierbei konnte belegt werden, dass weder die Granulombildung noch die Abnahme der Aluminiumkonzentration in den Granulomen innerhalb der ersten sieben Tage nach Verabreichung von der Art der Injektion (subkutan oder intramuskulär) abhängig war. Außerdem gab es keinen nachweisbaren Unterschied in der Aluminiumkonzentration bei sieben und dreißig Tage alten Granulomen (Eisler & Eibl 1949).

Verdier *et al.* (2005) (siehe 2.3.2) wiesen hohe Aluminiumkonzentrationen in den Applikationsstellen bei Makaken (*Macaca fascicularis*) bis zu sechs Monate nach intramuskulärer Verabreichung zweier aluminiumhaltiger [AlPO₄ bzw. Al(OH)₃] Impfstoffe nach. Die Aluminiumkonzentration in den reaktiven Zonen nach Verabreichung des Al(OH)₃-haltigen Impfstoffes war um das Vierfache höher als nach Verabreichung von AlPO₄-haltigem. Außerdem wurde festgestellt, dass der Aluminiumgehalt in den reaktiven Zonen um ein Vielfaches höher war als in den Randgebieten (Verdier *et al.* 2005).

Diskussion

Über die vorliegenden Untersuchungen der Unterhaut nach aluminiumhaltiger Injektion beim Frettchen konnte ebenfalls bestätigt werden, dass die Aluminiumkonzentration zum Rand der Applikationsstelle hin deutlich abnimmt (1130,40 mg Aluminium/kg gegen 508,07 mg Aluminium/kg am Rand der Applikationsstelle).

Hamilton (2003) äußerte den Verdacht, dass schlecht abbaubare Adjuvantien, wie Aluminiumverbindungen und Mineralöl-Emulsionen, in monozytären Zellen akkumulieren können und folgerte, dass die über eine lange Zeitspanne gesteigerte Anzahl dieser Zellen ein bedeutendes Merkmal der chronischen Läsion ist. Daraus resultiere, dass mehr Zellen im Bereich der Entzündung zur Verfügung stehen, um Entzündungsmediatoren zu produzieren. Außerdem wies er darauf hin, dass die Signalgebung so lange erfolgt, wie die Zelle - wahrscheinlich in Lysosomen - versucht, das resistente Material selbst oder dessen Zerfallsprodukte abzubauen (Hamilton 2003). Für die vorliegende Arbeit wurden die Zellen, die das Aluminiumhydroxid aufgenommen hatten, im TEM untersucht. Die Anzahl der Ansammlungen der nadelähnlichen Strukturen im Zytoplasma der Zellen erschienen in der 24. Woche nach der Injektion deutlich höher als bei den Untersuchungen in der 1., 4. und 12. Woche (vergleiche Bilder 3.28 bis 3.31 und 3.42). Zu jedem dieser Zeitpunkte standen drei Proben für die Untersuchung zur Verfügung [nach Verabreichung a) der $\text{Al}(\text{OH})_3$ -haltigen Suspension $n = 1$ und b) des $\text{Al}(\text{OH})_3$ -haltigen Tollwut-Impfstoffes $1 n = 2$.] Der Durchmesser der Ansammlungen zu allen Untersuchungszeitpunkten war unterschiedlich groß. Dies kann einerseits durch eine schwankende Menge der nadelförmigen Strukturen im Zytoplasma der Zelle, andererseits durch die Schnittebene bedingt sein. So könnte der optische Eindruck das Ergebnis verfälschen. Auffallend war jedoch, dass die Anzahl der Ansammlungen in den phagozytierenden Zellen im Laufe der Zeit deutlich zunahm. Die Vermutung von Hamilton über die Akkumulation der Aluminiumsalze kann durch die einfache Betrachtung der wenigen Schnitte im TEM nicht eindeutig bestätigt werden. Aufgrund der zahlreichen Ansammlungen nadelförmiger Strukturen in der 24. Woche (Bilder 3.31, 3.40 bis 3.42) liegt jedoch eine Akkumulation derer in den phagozytierenden Zellen sehr nahe. Auffallend war auch die Art der Einlagerung der nadelähnlichen Strukturen im Gewebe. In der ersten Woche konnten diese sowohl im Zytoplasma phagozytierender Zellen als auch extrazellulär im Bindegewebe liegend nachgewiesen werden.

Diskussion

In der vierten Woche lagen die Strukturen in allen Proben ($n = 3$) nur im Zytoplasma der phagozytierenden Zellen. In der zwölften Woche konnten die Ansammlungen der nadelförmigen Strukturen nur in einer von drei Proben nachgewiesen werden. Innerhalb dieser Probe wurden die nadelförmigen Strukturen sowohl extrazellulär als auch im Zytoplasma phagozytierender Zellen gefunden. Dies könnte darauf hinweisen, dass das aufgenommene nadelförmige Material wieder freigesetzt worden war.

24 Wochen (168. Tag) nach der Impfung wurden die nadelförmigen Strukturen in phagozytierenden Zellen im Fettgewebe nachgewiesen. Zwischen den nadelförmigen Strukturen in den Zellen der vorausgegangenen Untersuchungen zeigten sich Vakuolen, die in den Zellen der Proben 24 Wochen nach Verabreichung der $\text{Al}(\text{OH})_3$ -haltigen Tollwut-Impfstoffes 1 nicht mehr darstellbar waren (vergleiche Bild 3.45 mit Bild 3.46). Hier waren die Ansammlungen von einem weniger elektronendichten amorphen Bereich umgeben, der sich deutlich vom angrenzenden Zytoplasma abhob, ohne von einer Membran umgeben zu sein. Aufgrund dieser Befunde entstanden die Thesen, dass

- a) das Aluminiumhydroxid eine toxische Wirkung auf die phagozytierende Zelle hat, die zur Degeneration der Zellorganellen führte,

- b) dass die phagozytierende Zelle bis an die Grenzen ihrer Kapazität das nadelförmige Fremdmaterial aufnimmt, jedoch bei deren Zerfall durch Nekrose oder altersbedingte Apoptose wieder freisetzt.

Werden die frei liegenden nadelförmigen Strukturen vom Immunsystem während der Anwesenheit im Gewebe als Reiz angesehen und wird entsprechend reagiert, entsteht über eine relativ lange Zeitspanne eine lokale chronische Entzündungsreaktion mit Freisetzung der entsprechenden Entzündungsmediatoren. Letzteres konnte durch die vorliegenden Befunde bestätigt werden. Entgegen den Erwartungen wurden bis zum Zeitpunkt der Untersuchung in der 12. Woche nach Verabreichung aluminiumadjuvanshaltiger Tollwut-Impfstoffe mittel- bis hochgradige chronische Entzündungsreaktionen von zum Teil beträchtlichem Ausmaß festgestellt. In den Proben der 24. Woche nach Verabreichung der $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Suspension ($n = 1$) und des $\text{Al}(\text{OH})_3$ -haltigen Tollwut-Impfstoffes 1 ($n = 2$) konnte histologisch keine Entzündung ermittelt werden. Es gelang jedoch in einer dieser drei Proben die nadelförmige Struktur mittels Elektronenmikroskopie nachzuweisen und diese durch die energiedispersive Röntgenanalytik als aluminiumhaltig zu identifizieren.

4.2 Lokale histologische Veränderungen nach Verabreichung aluminiumadjuvanshaltiger Impfstoffe

In nach Verabreichung eines $\text{Al}(\text{OH})_3$ -haltigen Impfstoffes entstandenen Knoten konnte eine enge Relation zwischen der Aluminiumkonzentration und der Intensität des Entzündungszellinfiltrates belegt werden (Pineau *et al.* 1992).

Jüngere Untersuchungen haben bewiesen, dass Kristalle, die die Entzündung bei Gicht oder Pseudogicht auslösen, den zytoplasmatischen Rezeptor NALP3* (NACHT [NAIP, CIITA, HET-E and TP1]-domain, leucine-rich-repeat-, and PYD [pyrin domain]-containing protein 3) aktivieren (Martinon *et al.* 2006). Dieser kontrolliert die Aktivität der inflammatorischen Kaspase 1 durch das Formen multimolekularer Komplexe, die als „Inflammasome“ bezeichnet werden (Martinon *et al.* 2002). Inflammasome sind zytosolische Immunkomplexe, die auf „Gefahrssignale“ hin entstehen und zur NALP3-vermittelten Kaspase 1 Aktivierung führen. Als Gefahrssignale werden hierbei z. B. die Anwesenheit einer doppelsträngigen RNA, einer viralen RNA oder deren Analogon Poly(I:C) (Kanneganti *et al.* 2006), aber auch Harnsäure (Shi *et al.* 2003, Martinon *et al.* 2006) angesehen. Die Stimulation von Makrophagen durch die „Gefahrssignale“ induzieren NALP3-abhängig die Sekretion der Entzündungsmediatoren IL-1 β und IL-18 (Kanneganti *et al.* 2006).

Neueste Untersuchungen haben gezeigt, dass Aluminiumverbindungen und andere korpuskuläre Adjuvantien (z. B. Polylactid-co-glycolid oder Mikropartikel aus Polystyren) ebenfalls NALP3 aktivieren (Eisenbarth *et al.* 2008, Hornung *et al.* 2008, Sharp *et al.* 2009) und die Reifung von IL-1 β sowie dessen Freisetzung durch humane PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) (Hornung *et al.* 2008), Makrophagen (Hornung *et al.* 2008; Kool *et al.* 2008) und dendritische Zellen (Kool *et al.* 2008; Sharp *et al.* 2009) in einem Kaspase 1-abhängigen Weg induzieren. Die beschriebene Freisetzung von IL-1 β war von NALP3 und ASC (Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain) abhängig (Hornung *et al.* 2008; Sharp *et al.* 2009). Bei der ASC-abhängigen Freisetzung von IL-1 β galten auch doppelsträngige DNA, Natriumurat und ATP als „Gefahrssignal“ (Hornung *et al.* 2008). Die Aufnahme von Aluminiumkristallen und die Aktivierung der NALP3-Inflammasome induzierte eine Schädigung der Lysosomen (Hornung *et al.* 2008; Sharp *et al.* 2009).

* Synonym: PYPAF1/Cryopyrin/CIAS1/NLRP3

Diskussion

Die partikelvermittelte Steigerung der IL-1 β Sekretion erforderte eine Ansäuerung der Phagosomen und die lysosomale Zysteinprotease Kathepsin B. Dies deutet darauf hin, dass Kathepsin B eine Rolle bei der lysosomalen Schädigung während der Inflammasomaktivierung spielte (Sharp *et al.* 2009).

Über einen Kaspase 1-Indikator konnte eine enge Korrelation der Schädigung der Lysosomen und der Aktivierung der Kaspase 1 nachgewiesen werden (Hornung *et al.* 2008). Außerdem wurde belegt, dass das Einwandern von neutrophilen Granulozyten in das Peritoneum nach intraperitonealer Verabreichung von Al(OH)₃ von der IL-1-Aktivität abhängig war. Die Freisetzung der Zytokine führte zur Rekrutierung anderer Immunzellen in das betroffene Gewebe und zur Induktion der inflammatorischen Mechanismen, die zur Beseitigung des kristallinen Materials beitragen sollten. Daher wurde angenommen, dass die NALP3-Aktivierung durch diese Mechanismen zu einer lang anhaltenden Entzündung führt und in Gewebsschädigung endet. Weitere Untersuchungen wiesen darauf hin, dass die Störung der Lysosomen und nicht die kristalline Struktur selbst bei der Aktivierung von NALP3-Inflammasomen von Bedeutung ist. Es wurde belegt, dass eine nicht durch Kristalle bedingte Zerstörung der Lysosomen komplett von NALP3 abhängig war. So folgerte man, dass die Zerstörung der lysosomalen Kompartimente und die Freisetzung deren Inhalts in das Zytosol sogar in Abwesenheit von kristallinem Material in der Lage war, die Aktivierung des NALP3 Inflammasoms in einem zum Teil Kathepsin B-abhängigem Weg einzuleiten (Hornung *et al.* 2008). Die Aktivierung der Kaspase 1 durch Al(OH)₃ und die Induktion der Freisetzung von IL-1 β und IL-18 wurde in weiteren Untersuchungen bewiesen (Li *et al.* 2007, Sharp *et al.* 2009).

Einerseits weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die Aufnahme der Mikropartikel der Adjuvantien durch Makrophagen (Hornung *et al.* 2008; Kool *et al.* 2008) und dendritische Zellen das NALP3-Inflammasom aktivierte und dies zu ihrem fördernden Effekt auf die angeborene und antigenspezifische zelluläre Immunität beitrug (Sharp *et al.* 2009). Andererseits bestärkten der Nachweis der Schädigung der Lysosomen und die unter 4.1 beschriebenen Beobachtungen zum Fehlen der Zellorganellen in der vorliegenden Arbeit die Annahme, dass die Makrophagen unter Einfluss des Al(OH)₃ degenerierten.

Diskussion

Dies passt zu den Beobachtungen von Verdier *et al.* (2005) und Goto *et al.* (1997), welche die unterschiedlichen Degenerationsgrade der Makrophagen von Makaken nach Aufnahme von aluminiumhaltigem Adjuvans (Verdier *et al.* 2005) und die Schädigung der Makrophagen von Meerschweinchen nach Aufnahme von Aluminiumgel bzw. Aluminiumsuspension (Goto *et al.* 1997) ebenfalls beschrieben haben.

Bei 18 Frettchen wurde eine therapieresistente, mit Fieber einhergehende, systemische Myofasziitis mit Muskelatrophie an den Gliedmaßen und in der Lumbaregion ohne belegbaren Zusammenhang zu einem infektiösen Geschehen beschrieben (Garner *et al.* 2007). Die histologische Untersuchung enthüllte unter anderem eine schwerwiegende, purulente bis pyogranulomatöse Entzündung der Skelettmuskulatur und der Faszien im Bereich von Oesophagus, Herz, Gliedmaßen, Lumbaregion, Kopf, Sternum und Bauchwand. Es wurde angenommen, dass alle Frettchen einige Zeit nach ihrer Geburt einer Substanz ausgesetzt waren, die das entzündliche Geschehen ausgelöst hatte. Einzige Gemeinsamkeit dieser Tiere war die Verabreichung von mindestens einer Impfung. Die Autoren wiesen in ihrem Bericht darauf hin, dass einer der Koautoren unabsichtlich bei einer anderen Studie eine mit der Myofasziitis identische Erkrankung bei acht Tieren einer zwölköpfigen Gruppe nach Verabreichung einer Injektion ausgelöst hatte. Diese soll laut Angaben von Garner *et al.* (2007) aluminiumhaltiges Adjuvans beinhalten haben. Der Originalbericht des Koautors (Schoemaker *et al.* 2005) enthält keine Angaben über die Zusammensetzung des verabreichten Mittels, bestätigt aber die beschriebene therapieresistente Reaktion nach subkutaner Verabreichung einer Immunisierung gegen Gn-RH. 24 Kontrolltiere, die keine der Komponenten dieser Injektion erhalten hatten und im gleichen Bereich gehalten worden sind, zeigten während des gesamten Versuchablaufs keinerlei Anzeichen der zuvor beschriebenen Erkrankung. Daher vermutete man einen Zusammenhang mit einem der Bestandteile der verabreichten Injektion (Schoemaker *et al.* 2005).

Beim Menschen wurde bewiesen, dass die makrophagische Myofasziitis durch die Persistenz von $\text{Al}(\text{OH})_3$ verursacht werden kann (Fischer *et al.* 2003; Shingde *et al.* 2005). Dies unterstützt die These zum auslösenden Agens bei den Frettchen.

Für die vorliegende Arbeit wurden histologische Untersuchungen nach der subkutanen Injektion im Zeitraum von der ersten bis zur 24. Woche durchgeführt. Hierbei wurden die Entzündungsreaktionen eine Woche nach der Injektion als „akut“ angesprochen.

Diskussion

Alle Entzündungsreaktionen, die ab der vierten Woche nach der Injektion noch bestanden, wurden als „chronisch“ bezeichnet.

Die Tollwut-Impfstoffe 1 bis 4, die $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Suspension und die isotonische Kochsalzlösung wurden jeweils im lateralen Bereich des Brustkorbes verabreicht und deren Befunde statistisch ausgewertet.

Die Verabreichung des adjuvansfreien Staupe-Impfstoffes im dorsolateralen Bereich der rechten Lende diente zur Untersuchung der Frage, ob für die Reaktion des Gewebes mehr das Adjuvans oder mehr das Antigen verantwortlich zu machen ist, da sowohl der Tollwut-Impfstoff 4 als auch der Staupe-Impfstoff adjuvansfrei waren, die anderen drei Tollwut-Impfstoffe jedoch Adjuvans enthielten.

Nach Verabreichung der $\text{Al}(\text{OH})_3$ -haltigen Suspension und der aluminiumadjuvanshaltigen Tollwut-Impfstoffe 1 bis 3 wurde histologisch kein zeitabhängiger Rückgang der granulomatösen Entzündungsreaktion bis zur Untersuchung in der 12. Woche festgestellt. Im Gegensatz dazu verringerten sich die Anzeichen einer Entzündung nach Verabreichung des adjuvansfreien Tollwut-Impfstoffes sehr deutlich. Dies wurde auch nach Verabreichung des adjuvansfreien Staupe-Impfstoffes im Bereich der rechten Lende beobachtet.

Es konnte gezeigt werden, dass die $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Suspension ohne Zusatz von Antigen eine vergleichbare chronische granulomatöse Entzündung mit Formierung mehrkerniger Riesenzellen auslöste wie die aluminiumhaltigen Impfstoffe. Diese Entzündung wurde von einer ausgeprägten Granulationsgewebsbildung begleitet und als Fremdkörperreaktion angesehen. Im Gegensatz dazu konnte nach Verabreichung des adjuvansfreien Tollwut-Impfstoffes 4 weder eine chronische granulomatöse Entzündung mit oder ohne mehrkernigen Riesenzellen noch eine Granulationsgewebsbildung beobachtet werden. Die beschriebene Fremdkörperreaktion trat in der Hälfte aller chronischen Entzündungen (11/22) nach Verabreichung der aluminiumadjuvanshaltigen Tollwut-Impfstoffe 1 bis 3 und der $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Suspension auf. Bei den entzündlichen Lokalreaktionen einiger Frettchen wurde histologisch eine Kapselbildung beobachtet. Makroskopisch waren weder die Entzündung noch die Kapselbildung durch einen eindeutig palpierbaren Knoten zu ermitteln.

Eine Woche nach Verabreichung der isotonischen Kochsalzlösung konnte nur in einer Probe (1/3) eine akute Entzündung nachgewiesen werden. Die Proben der 4., 12. und 24. Woche (9/9) waren ohne besonderen Befund. Der Stich- und Volumenreiz sollte daher als Ursache für eine chronische Entzündung zu vernachlässigen sein.

Diskussion

Im Vergleich der Applikationsstellen der aluminiumadjuvanshaltigen Tollwut-Impfstoffe 1 bis 3 mit denen des adjuvansfreien Tollwut-Impfstoffes 4 konnte festgestellt werden, dass der adjuvansfreie Tollwut-Impfstoff deutlich weniger lokale Reaktionen ausgelöst hat als die adjuvanshaltigen.

Sowohl die Häufigkeit der in das Entzündungsgebiet eingewanderten Zellen (z. B. Makrophagen, Lymphozyten, Plasmazellen und Fibroblasten) als auch das Ausmaß der Entzündung an sich waren nach Verabreichung der adjuvanshaltigen Tollwut-Impfstoffe deutlich größer als nach Verabreichung des adjuvansfreien Tollwut-Impfstoffes und des adjuvansfreien Staupe-Impfstoffes. Dagegen induzierten die adjuvanshaltigen Tollwut-Impfstoffe alle sehr ähnliche Reaktionen. Gegenüber den $\text{Al}(\text{OH})_3$ -haltigen Tollwut-Impfstoffen 1 und 2 war nach Verabreichung des AlPO_4 -haltigen Tollwut-Impfstoffes 3 lediglich das Auftreten von Apoptosen deutlich und das Auftreten von neutrophilen Granulozyten sowie Nekrosen weniger deutlich ausgeprägt. Der AlPO_4 -haltige Tollwut-Impfstoff 3 wurde auch durch die hohe Anzahl an Plasmazellen in der Entzündung auffällig. Ob die geringere Anzahl an Plasmazellen nach Verabreichung der anderen Tollwut-Impfstoffe eine entsprechend reduzierte Antikörperbildung zur Folge hatte, konnte in dieser Versuchsserie nicht geklärt werden, da am selben Tier zeitgleich zwei Tollwut-Impfstoffe verabreicht worden waren.

Das Entzündungsinfiltrat nach Verabreichung des adjuvansfreien Staupe- und Tollwut-Impfstoffes 4 wurde nur selten (1/48) von einer Granulationsgewebsbildung begleitet. Dagegen wurde nach Verabreichung aluminiumadjuvanshaltiger Impfstoffe (15/30) und nach Verabreichung der $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Suspension (2/3) eine Granulationsgewebsbildung vermehrt festgestellt. Diese wird im Rahmen einer chronischen proliferativen Entzündung ausgebildet und zieht eine reparative Entzündung (Narbenbildung) nach sich. In der Versuchsserie 1 gab es zwei Proben in der 24. Woche nach Verabreichung des $\text{Al}(\text{OH})_3$ -haltigen Tollwut-Impfstoffes 1. Beide waren entzündungsfrei, aber immer noch stark aluminiumhaltig (siehe Graph 3.17).

Diskussion

Der Vergleich der Lokalreaktionen nach Verabreichung des adjuvansfreien Tollwut-Impfstoffes 4 mit den Lokalreaktionen nach Verabreichung des adjuvansfreien Staupe-Impfstoffes erbrachte, im Gegensatz zum Vergleich mit den Lokalreaktionen nach Verabreichung der aluminiumadjuvanshaltigen Tollwut-Impfstoffe 1 bis 3, in allen Kriterien (Zellart, Zellhäufigkeit, Entzündungsgrad, Ausmaß der Entzündung, Granulationsgewebsbildung sowie Anwesenheit von Apoptose und Nekrose) keinen signifikanten Unterschied. Dies deutet darauf hin, dass für die Reaktion des Gewebes das Adjuvans und nicht das Antigen verantwortlich ist.

Von anderen Autoren konnte nachgewiesen werden, dass Frettchen und Katzen nach Verabreichung des für den Menschen zugelassenen adjuvansfreien Tollwut-Impfstoffes 4 einen ausreichenden Antikörpertiter aufbauen (Duchow *et al.* 2005; Jakel *et al.* 2006).

In der Tiermedizin wurde die Granulombildung nach Verabreichung $\text{Al}(\text{OH})_3$ -haltiger Impfstoffe bei Rindern bereits 1952 beschrieben. Sie war mit einer ausgeprägten Umfangsvermehrung verknüpft (Cohrs & Schulte 1952).

Inzwischen wurden die Impfstoffe durch andere Verfahren in der Herstellung verbessert. Trotzdem wird auch in neuen Berichten von Mensch und Tier die Granulombildung nach Verabreichung von vorwiegend $\text{Al}(\text{OH})_3$ -, seltener auch AlPO_4 -haltiger Impfstoffe beschrieben (Erdohazi & Newman 1971; Savage 1973; Slater *et al.* 1982; Fawcett & Smith 1984; Gupta *et al.* 1997; Bordet *et al.* 2001; Valtulini *et al.* 2001; Lafaye *et al.* 2004; Valtulini *et al.* 2005).

Die Beobachtung der Applikationsstellen nach einer Impfung gewann ab Ende der 80er Jahre in den USA besondere Bedeutung, da bei histopathologischen Untersuchungen eine fokale nekrotisierende granulomatöse Pannikulitis in der Subkutis von Katzen und Hunden (Hendrick & Dunagan 1991) sowie Fibrosarkome (FS) bei Katzen (Hendrick *et al.* 1992) vermehrt festgestellt wurde. Man folgerte, dass das $\text{Al}(\text{OH})_3$ -haltige Adjuvans ursächlich für die chronische Entzündung war und diese wiederum bei der Katze durch einen unbekanntem Mechanismus an der neoplastischen Transformation der Zellen des Bindegewebes (Fibroblasten und Myofibroblasten) während der reparierenden Antwort beteiligt war (Hendrick 1998).

Diskussion

Bei der Untersuchung eingesandter feliner Neoplasien fiel auf, dass bei Katzen mit einem Durchschnittsalter von ≤ 2 Jahren Granulombildung und bei Katzen ≥ 9 Jahren FS-Bildung als Lokalreaktion nach Verabreichung einer Impfung im Vordergrund stand. Das Entzündungszellinfiltrat bei Jungtieren zeigte viele Zelltypen, wogegen das der älteren Katzen fast nur aus Makrophagen bestand. Man bezeichnete dies als „altersbezogene Immundefizienz“ und wies dem Unterschied in der Reaktion eine wichtige Rolle in der FS-Bildung zu (Jelínek 2003).

Die einer Impfung zugeordneten FS (injektionsassoziierte Fibrosarkome; iFS) der Katze lagen im Gegensatz zu den nicht-injektionsassoziierten FS (niFS) überwiegend in der Subkutis (Doddy *et al.* 1996). Es konnte bewiesen werden, dass die Entstehung des iFS nicht mit einer Infektion mit dem feline Leukosevirus (FeLV) oder mit dem feline Sarkom Virus (FeSV) in Verbindung stand (Kass *et al.* 1993; Hendrick *et al.* 1994; Ellis *et al.* 1996).

Das Problem der aluminiumadjuvanshaltigen Injektion mit anschließender Fibrosarkombildung bei Katzen ist weiterhin aktuell. Dies zeigt die Diagnose von iFS, die von Makrophagen mit aluminiumhaltigem Fremdmaterial im Zytosol umgeben waren (Hendrick *et al.* 1992; Madewell *et al.* 2001; Deim *et al.* 2008).

Bei Frettchen wurde ebenfalls über die Entstehung von iFS berichtet (Munday *et al.* 2003; Murray 1998). Diese waren nicht nur von Makrophagen mit intrazytoplasmatischen Aggregaten von dichtem, nadelähnlichem, kristallinem Material umgeben, sondern beinhalteten auch Plasmazellen. Dies wurde als Reaktion auf das Impfantigen angesehen (Munday *et al.* 2003).

In einigen Spezies, den Menschen eingeschlossen, wurden Fremdkörper (FK) mit der Entwicklung von Weichteilsarkomen in Verbindung gebracht (Herrmann *et al.* 1971; Sinibaldi *et al.* 1976; Ryu *et al.* 1987; Jennings *et al.* 1988; Vahey *et al.* 1995; Nakamura *et al.* 2001; Vascellari *et al.* 2006).

Das Auftreten von Sarkomen nach stumpfen Traumen bei Mensch und Tier bestätigte den Verdacht, dass die Wundheilung bei Ausbildung des Tumors beteiligt ist (Sauerbruch 1961; Dubielzig 1984; Dubielzig *et al.* 1990). Es gab jedoch auch Hinweise darauf, dass die Beschaffenheit des FK, insbesondere seine Oberfläche, eine wichtige Rolle bei der Induzierung der Tumorbildung spielt (Iomhair & Lavelle 1997).

Diskussion

Oppenheimer *et al.* (1958) bewiesen, dass die physikalische Präsenz sowie die Beschaffenheit des FK-Materials - und nicht seine chemische Reaktivität - für die Tumorentwicklung verantwortlich war. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Tumorfrequenz mit der Größe des FK bzw. dessen Oberfläche in Zusammenhang stand (Brand *et al.* 1976). Es wurde beobachtet, dass die Sarkome in unterschiedlichen Phasen wachsen. Je größer der FK oder dessen Oberfläche war, umso höher war die Tumorraten und auch das Risiko der frühen Entwicklung eines Sarkoms. Die Summation der Oberfläche mehrerer FK von gleicher Größe erhöhte das Risiko der frühen Tumorentwicklung gegenüber einem FK dieser Art deutlich (Brand *et al.* 1976). Die stärkere Reaktion auf subkutan verabreichte größere Partikel $[Al(OH)_3]$ wurde auch von Eisler & Eibl (1949) an Meerschweinchen beobachtet. Der Studie von Brand *et al.* (1976) vorausgegangene Untersuchungen lieferten Hinweise, die zur Annahme führten, dass „präneoplastischen Elternzellen“ an der Tumorbildung beteiligt sind und diese von mesenchymalen Stammzellen kleiner Gefäße abstammen (Brand *et al.* 1975).

Da bei einer Granulationsgewebsbildung auch eine Angiogenese stattfindet, sollte im Hinblick auf die Abstammung dieser „Elternzellen“ die Bildung von Granulationsgewebe möglichst vermieden werden.

Ein weiteres, wichtiges Kriterium ist die Lokalisation der Läsion. Es konnte bewiesen werden, dass implantierte Tumoren des gleichen Typs sich signifikant unterschieden, wenn sie nicht in die Flanke, sondern in den dorsalen Bereich des Fußes implantiert worden waren (Versuchstier: Maus). Das Größenwachstum des Tumors im dorsalen Bereich des Fußes war sowohl beim FS als auch beim Melanom deutlich geringer als in der Flanke. Es zeigte sich jedoch, dass die Tumoren aus der dorsalen Region des Fußes einen wesentlich bösartigeren Phänotyp, eine stärkere Entzündungszellinfiltration und eine stärkere Immunreaktion aufwiesen als die in der Flanke. Beim Tumorstadium in der Flanke war die Überlebensrate in Tagen um das 3,5 fache (FS) bzw. um das 1,5 fache (Melanom) länger als bei Tumorstadium in der dorsalen Fußregion. Als Erklärung hierfür kann die Ausbildung von Lungenmetastasen angesehen werden, die nur bei Tieren mit Tumoren am Fuß beobachtet wurde. Im Gegensatz zu den Tumoren der Flanke waren die Tumoren des Fußes stark vaskularisiert. Die Ergebnisse von Seftor *et al.* (2006) und Illmensee & Mintz. (1976) bestätigend wurde gefolgert, dass die unmittelbare Umgebung ein Schlüsselfaktor in der Tumorstadium war, der auch auf den Malignitätsgrad der Tumoren Einfluss nahm.

Die gesteigerte Entzündungszellinfiltration und die lokale Immunantwort wurden als Zeichen einer höheren Reaktivität im Bereich des Fußes angesehen. Daher wurde postuliert, dass der Grad der Malignität kein konstantes Phänomen des Tumors ist, sondern eine Reaktion auf die unmittelbare Umgebung (Speroni *et al.* 2009).

4.3 Schlussfolgerung

Aufgrund der beschriebenen Beobachtungen geht man heute davon aus, dass eine chronische Entzündung bei Katze und Frettchen den lokalen Reiz zur Zelltransformation und damit zur Tumorbildung setzen kann. Diese Annahme wurde durch die ähnlich gestalteten Entzündungsreaktionen nach Verabreichung von Impfstoffen und im Bereich der injektionsassoziierten Sarkome sowie durch die Anwesenheit von Plasmazellen in den Tumoren, die nach Verabreichung einer Impfung entstanden waren, bestärkt. Es wird vermutet, dass die freigesetzten Entzündungsmediatoren, Stammzellen des mesenchymalen Bindegewebes kleiner Gefäße, die unmittelbare Umgebung der Injektionsstelle und eine nicht näher definierte genetische Disposition des Tieres zur Tumorentwicklung eine Rolle in der Tumorgenese spielen.

In der vorliegenden Arbeit wurden mittel- bis hochgradige, chronische, granulomatöse Entzündungen des Fremdkörpertyps bei 9/20 der diagnostizierten chronischen Entzündungen nach Verabreichung aluminiumadjuvanshaltiger Tollwut-Impfstoffe nachgewiesen. In den akuten und chronischen Entzündungen nach Verabreichung dieser Impfstoffe (n = 30) und der Al(OH)₃-Suspension (n = 3), konnte in 15/30 und in 2/3 Proben Granulationsgewebsbildung nachgewiesen werden. Dieses Granulationsgewebe stammt von Zellen des Gefäßbindegewebes ab. Unter Berücksichtigung der Hinweise auf die Abstammung der „präneoplastischen Elternzellen“ aus mesenchymalen Stammzellen kleiner Gefäße, sollte die Bildung von Granulationsgewebe möglichst vermieden werden.

Wie zuvor beschrieben, können Aluminiumverbindungen größere Gewebeschädigungen auslösen und als Fremdkörper wirken. Dies kann die Entzündungsreaktionen verstärken und zeitlich verlängern. Der Reaktion folgt oft die Bildung von Granulationsgewebe.

Diskussion

Im Hinblick auf die vorliegende Nachweise der Wirkung von Entzündungsmediatoren auf die Tumorprogression sollte die Entzündung so gering gehalten werden, wie es für die Ausbildung eines ausreichenden Impfschutzes nötig ist.

Aufgrund der relativ wenig ausgeprägten lokalen Entzündungsreaktion nach Verabreichung des adjuvansfreien Tollwut-Impfstoffes, empfiehlt sich dieser zur Anwendung, da durch ihn die entsprechende Schutzwirkung erzielt werden kann (Duchow *et al.* 2005, Jakel *et al.* 2006). Diese ist gegebenenfalls über eine Nachimpfung des weniger reizenden Impfstoffes in einem bestimmten Zeitabstand zur Erstimpfung zu erreichen. Bei nicht stark immunogen wirkenden Mikroorganismen kann das Fehlen des Adjuvans eine Steigerung der Antigenmenge im Impfstoff nötig machen, um den entsprechenden Impfschutz zu gewährleisten. Unter Berücksichtigung, dass auch die Antigenmenge (Lokal-)Reaktionen auslösen kann, muss für die einzelnen Impfstoffe geprüft werden, ob sie mit einer gut verträglichen Antigenmenge ohne Adjuvans einen ausreichenden Impfschutz, gegebenenfalls nach Boosterung, in der entsprechenden Spezies induzieren. Wenn aufgrund der schwachen immunogenen Wirkung des Antigens dennoch ein Adjuvans benötigt wird, sollte dieses leicht abbaubar sein, so dass weder eine Granulationsgewebsbildung erfolgt noch eine Fremdkörperreaktion stattfindet und eine lang anhaltende chronische Entzündungsreaktion vermieden wird.

5. Zusammenfassung und Summary

5.1 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurde festgestellt, dass die angewandten aluminiumadjuvanshaltigen $[\text{Al}(\text{OH})_3$ oder $\text{AlPO}_4]$ Tollwut-Impfstoffe beim Frettchen in 21/29 Proben eine granulomatöse, in 3/29 eine pyogranulomatöse, in 2/29 eine lymphohistiozytäre, in 2/29 eine eitrige und in 1/29 eine fibrosierende Entzündung hervorgerufen haben. Im Grad der Entzündung gab es innerhalb der jeweiligen Gruppe geringe Abweichungen. Der Nachweis der Entzündungen wurde bis zur 12. Woche nach der Injektion erbracht. Bis zu diesem Zeitpunkt konnte kein zeitlich abhängiger Rückgang der Entzündungsreaktion beobachtet werden. In 9/20 der diagnostizierten chronischen Entzündungen in der 4. und 12. Woche nach Verabreichung der aluminiumadjuvanshaltigen Tollwut-Impfstoffe, konnte eine Fremdkörperreaktion über die Anwesenheit von Makrophagen und mehrkernigen Riesenzellen ermittelt werden. Im selben Zeitraum wurde auch nach Verabreichung einer antigenfreien $\text{Al}(\text{OH})_3$ -haltigen Suspension eine gleichartige chronische granulomatöse Entzündung mit Fremdkörperreaktion (2/2) ermittelt. Daher wurde das $\text{Al}(\text{OH})_3$ und das AlPO_4 in der vorliegenden Arbeit als Auslöser für die Fremdkörperreaktion angesehen.

Im Gegensatz dazu wurde ebenfalls bis zur 12. Woche nach Verabreichung eines adjuvansfreien Tollwut-Impfstoffes, der zur Anwendung am Menschen zugelassen ist, ein deutlicher Rückgang der wesentlich schwächeren Entzündungsreaktion beobachtet. Außerdem konnte bei diesem Impfstoff zu keinem Zeitpunkt ein Hinweis für die Ausbildung einer Fremdkörperreaktion in Form von Makrophagen bei gleichzeitiger Anwesenheit von mehrkernigen Riesenzellen im Entzündungsinfiltrat gefunden werden. Ob der adjuvansfreie Impfstoff, der zur Anwendung beim Menschen bestimmt ist, auch bei Frettchen einen ausreichenden Impfschutz induziert, konnte aufgrund der gleichzeitigen Verabreichung von zwei Tollwut-Impfstoffen bei der Durchführung dieser Arbeit nicht geklärt werden. Von dieser Arbeit unabhängige Untersuchungen weisen darauf hin, dass dies möglich ist.

Aufgrund der Gewebeuntersuchungen nach subkutaner Verabreichung einer isotonen Kochsalzlösung konnten der Stich- und Volumenreiz sowie die isotone Kochsalzlösung als Auslöser für die Ausbildung einer chronischen Entzündung ausgeschlossen werden.

Der Nachweis von Aluminium über einen Zeitraum von mindestens 24 Wochen nach Verabreichung eines $\text{Al}(\text{OH})_3$ -haltigen Tollwut-Impfstoffes bestätigt, dass das $\text{Al}(\text{OH})_3$ nicht oder nur sehr langsam biologisch abgebaut wird. Zu diesem Zeitpunkt konnte bei den drei zur Verfügung stehenden Proben keine lokale Entzündungsreaktion mehr nachgewiesen werden.

Impfstoffe gegen Tierseuchen und Zoonosen sind zweifelsfrei von großer Bedeutung und zum Schutz der Menschen und Tiere auch notwendig. Ohne die Durchführung der Impfungen käme es sicherlich zu neuen ausgedehnten Seuchenausbrüchen, die viele Opfer fordern würden. In Bezug auf den Grundsatz, jeden medizinischen Eingriff so schonend wie möglich zu gestalten, sind weitere Studien zur Entwicklung bzw. Überprüfung aluminiumadjuvansfreier Impfstoffe, die einen ausreichenden Impfschutz gewährleisten, nötig. Dies gilt insbesondere für Tierarten, die - wie die Katze und das Frettchen - durch die Ausbildung schwerwiegender Lokalreaktionen aufgefallen sind.

5.2 Summary

There is increasing evidence to suggest that several months after vaccination of cats and ferrets sarcomas, especially fibrosarcomas, may develop at injection sites. It is supposed that the adjuvant $\text{Al}(\text{OH})_3$ or AlPO_4 leads to a chronic inflammation which can trigger resident fibroblasts and myofibroblasts at the injection site to neoplastic transformation. In this work an examination of the inflammatory reaction in ferrets after vaccination with two $\text{Al}(\text{OH})_3$ -, one AlPO_4 -containing vaccine, and two non-adjuvanted vaccines was performed at the 1st, 4th, 12th, and fractional at 24th week after vaccination. Untreated tissue, injection sites after injection of a sodium chloride solution, and injection sites after administration of antigen-free $\text{Al}(\text{OH})_3$ -suspension were used as control. Otherwise detection of aluminium was performed until the 24th week after injection.

Within these examinations in ferrets it has been established that the used aluminium adjuvanted rabies vaccines caused in 21/29 samples a granulomatous, in 3/29 a pyogranulomatous, in 2/29 a lymphohistiocytic, in 2/29 a suppurative, and in 1/29 a fibrosis-predominated inflammation. There was a slight difference of the degree of inflammation within the groups. Inflammation could be detected until the 12th week after vaccination. There was no time dependend decline of inflammation until this point of time.

Zusammenfassung und Summary

In 9/20 diagnosed chronic inflammations of the 4th and 12th week after administration of the aluminium-adjuvanted vaccines a foreign body reaction could be detected by the presence of macrophages and multinucleated giant cells. In the same space of time a similar chronic granulomatous inflammation with foreign body reaction was detected after administration of an antigen-free Al(OH)₃-suspension. Therefore the Al(OH)₃- and AlPO₄-adjuvant are claimed as the cause of foreign body reaction.

In contrast, a clear reduction of a from the beginning substantially less intense inflammation could be detected until the 12th week after using a non-adjuvanted rabies vaccine which is authorised for human beings. Multinucleated giant cells could not be detected and therefore there was no sign of a foreign body reaction. Because of the simultaneous administration of an adjuvant-containing and a non-adjuvanted rabies vaccine there was no possibility to detect the titer of antibody after administration of the non-adjuvanted rabies vaccine but independent examinations indicate a sufficient protection after using the non-adjuvanted rabies vaccine for human beings in cats and ferrets.

Tissue examinations after subcutan administration of isotonic sodium chloride solution excludes effects of prick and volume to initiate a chronic inflammation. The detection of aluminium until the 24th week after administration of an Al(OH)₃-containing rabies vaccine confirmed that Al(OH)₃ is not biodegradable or a long time period is needed for elimination, respectively. At this time there was no inflammation detectable.

There is no doubt that vaccines against epidemics of animals and zoonotic diseases are still important. Relating to the principle to do a medical intervention as gentle as possible further examinations for the use of effective aluminium adjuvant-free vaccines are necessary, especially for species which have attracted attention by developing grave local adverse drug reactions like cats and ferrets.

6. Tabellen

Die Zahlen geben die Anzahl der Proben der entsprechenden Rubrik wieder.
Die Probenzahl entspricht nicht der Tierzahl.

Abkürzungen: ggr.: geringgradig mgr.: mittelgradig hgr.: hochgradig

Tabelle 6.1 Hautproben von Versuchsserie 1 und 2 (V 1 und V 2)

Applikation von / Untersuchungsmaterial	n	1. Woche		4. Woche		12. Woche		24. Woche	
		V 1	V 2	V 1	V 2	V 1	V 2	V 1	V 2
Al(OH) ₃ -haltigem Tollwut-Impfstoff 1 und 2	20	2	4	2	4	2	4	2	-
Al(OH) ₃ -Suspension	4	1	-	1	-	1	-	1	-
AlPO ₄ -haltigem Tollwut-Impfstoff 3	12	-	4	-	4	-	4	-	-
adjuvansfreiem Tollwut-Impfstoff 4	24	-	8	-	8	-	8	-	-
adjuvansfreiem Staupe-Impfstoff	24	-	8	-	8	-	8	-	-
isotonischer Kochsalzlösung	12	3	-	3	-	3	-	3	-
unbehandelter Lendenbereich li. KH	23	-	8	-	7	-	8	-	-
Haut von unbehandeltem Tier	2	1	-	-	-	1	-	-	-

KH: Körperhälfte li.: linke n: Probenanzahl gesamt

Tabelle 6.2 Vergleich des Auftretens von Makrophagen nach Verabreichung der jeweiligen Injektion im Zeitraum der 1. - 12. Woche

Injektion	keine	vereinzelt	wenig	viele	überwiegend	Gesamt
Al(OH) ₃ -Suspension			1	1	1	3
Tollwut-Impfstoff 1					4	6
Tollwut-Impfstoff 2		2	2	7	1	12
Tollwut-Impfstoff 3			3	3	5	11
Tollwut-Impfstoff 4	18	3	1	2		24
Staupe-Impfstoff	20	3	1			24
isotonische Kochsalzlösung	9					9
unbehandelt	25					25
Gesamt	72	8	8	15	11	114

Tabelle 6.3 Vergleich des Auftretens von neutrophilen Granulozyten nach Verabreichung der jeweiligen Injektion im Zeitraum der 1. - 12. Woche

Injektion	keine	vereinzelt	wenig	viele	überwiegend	Gesamt
Al(OH) ₃ -Suspension	3					3
Tollwut-Impfstoff 1	5				1	6
Tollwut-Impfstoff 2	11		1			12
Tollwut-Impfstoff 3	6		1	1	3	11
Tollwut-Impfstoff 4	23	1				24
Staupe-Impfstoff	24					24
isotonische Kochsalzlösung	9					9
unbehandelt	25					25
Gesamt	106	1	2	1	4	114

Tabelle 6.4 Vergleich des Auftretens von eosinophilen Granulozyten nach Verabreichung der jeweiligen Injektion im Zeitraum der 1. - 12. Woche

Injektion	keine	vereinzelt	wenig	viele	überwiegend	Gesamt
Al(OH) ₃ -Suspension	3					3
Tollwut-Impfstoff 1	6					6
Tollwut-Impfstoff 2	12					12
Tollwut-Impfstoff 3	8	2	1			11
Tollwut-Impfstoff 4	24					24
Staupe-Impfstoff	24					24
isotonische Kochsalzlösung	9					9
unbehandelt	25					25
Gesamt	111	2	1	0	0	114

Tabelle 6.5 Vergleich des Auftretens von Fibroblasten nach Verabreichung der jeweiligen Injektion im Zeitraum der 1. - 12. Woche

Injektion	keine	vereinzelt	wenig	viele	überwiegend	Gesamt
Al(OH) ₃ -Suspension			1	1	1	3
Tollwut-Impfstoff 1			3	3		6
Tollwut-Impfstoff 2	1	1	5	3	2	12
Tollwut-Impfstoff 3		1	3	7		11
Tollwut-Impfstoff 4	17	1	3	3		24
Staupe-Impfstoff	19	2	2	1		24
isotonische Kochsalzlösung	8		1			9
unbehandelt	25					25
Gesamt	70	5	18	18	3	114

Tabelle 6.6 Vergleich des Auftretens von Fibrozyten nach Verabreichung der jeweiligen Injektion im Zeitraum der 1. - 12. Woche

Injektion	keine	vereinzelt	wenig	viele	überwiegend	Gesamt
Al(OH) ₃ -Suspension	1	2				3
Tollwut-Impfstoff 1	2	3	1			6
Tollwut-Impfstoff 2	10	1		1		12
Tollwut-Impfstoff 3	9	2				11
Tollwut-Impfstoff 4	24					24
Staupe-Impfstoff	22	1		1		24
isotonische Kochsalzlösung	9					9
unbehandelt	25					25
Gesamt	102	9	1	2	0	114

Tabelle 6.7 Vergleich des Auftretens von Lymphozyten nach Verabreichung der jeweiligen Injektion im Zeitraum der 1. - 12. Woche

Injektion	keine	vereinzelt	wenig	viele	überwiegend	Gesamt
Al(OH) ₃ -Suspension		1	2			3
Tollwut-Impfstoff 1		2	2	2		6
Tollwut-Impfstoff 2	2	6	2	2		12
Tollwut-Impfstoff 3	1		7	3		11
Tollwut-Impfstoff 4	14	3	7			24
Staupe-Impfstoff	14	2	7	1		24
isotonische Kochsalzlösung	9					9
unbehandelt	25					25
Gesamt	65	14	27	8	0	114

Tabelle 6.8 Vergleich des Auftretens von Plasmazellen nach Verabreichung der jeweiligen Injektion im Zeitraum der 1. - 12. Woche

Injektion	keine	vereinzelt	wenig	viele	überwiegend	Gesamt
Al(OH) ₃ -Suspension	3					3
Tollwut-Impfstoff 1	1	1		4		6
Tollwut-Impfstoff 2	8	1	3			12
Tollwut-Impfstoff 3	3	1	2	3	2	11
Tollwut-Impfstoff 4	23	1				24
Staupe-Impfstoff	23	1				24
isotonische Kochsalzlösung	9					9
unbehandelt	25					25
Gesamt	95	5	5	7	2	114

Tabelle 6.9 Vergleich des Auftretens von Apoptose nach Verabreichung der jeweiligen Injektion im Zeitraum der 1. - 12. Woche

Injektion	keine	vereinzelt	wenig	viele	überwiegend	Gesamt
Al(OH) ₃ -Suspension	2	1				3
Tollwut-Impfstoff 1	1		5			6
Tollwut-Impfstoff 2	10		2			12
Tollwut-Impfstoff 3	4	1	3	2	1	11
Tollwut-Impfstoff 4	24					24
Staupe-Impfstoff	24					24
isotonische Kochsalzlösung	9					9
unbehandelt	25					25
Gesamt	99	2	10	2	1	114

Tabelle 6.10 Vergleich des Auftretens von Granulationsgewebsbildung nach Verabreichung der jeweiligen Injektion im Zeitraum der 1. Woche und der 4. + 12. Woche

Injektion	1. Woche			4. und 12. Woche		
	Nein	Ja	Gesamt	Nein	Ja	Gesamt
Al(OH) ₃ -Suspension	1		1		2	2
Tollwut-Impfstoff 1		2	2	2	2	4
Tollwut-Impfstoff 2	2	2	4	6	2	8
Tollwut-Impfstoff 3	3	1	4	2	6	8
Tollwut-Impfstoff 4	8		8	16		16
Staupe-Impfstoff	7	1	8	16		16
isotonische Kochsalzlösung	3		3	6		6
unbehandelt	9		9	16		16
Gesamt	33	6	39	65	11	76

7. Materialien

Chemikalie / Gebrauchsmaterial	Firma	Adresse	Tel. und Fax	E-Mail
Al(OH) ₃ -Suspension	Chiron vaccines Novartis Behring	Emil-von-Behring-Str. 76 35041 Marburg	Tel. 06421 / 3915 Fax 06421 / 392336	
Ammoniaklösung 25 % zur Analyse	Merck KGaA	Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt	Tel. 06151 / 72-0 Fax 06151 / 72-2000	webmaster@merck.de
Chloral hydrate purum, cryst., (Fluka)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Riedstraße 2, 89555 Steinheim	Tel. 07329 / 97 - 0 Fax 07329 / 97- 2160	Deorders@europe.sial.com
Entellan Neu	Merck KGaA	Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt	Tel. 06151 / 72-0 Fax 06151 / 72-2000	webmaster@merck.de
Entionisiertes Wasser	hauseigene Herstellung			-
Eosin G	Merck KGaA	Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt	Tel. 06151 / 72-0 Fax 06151 / 72-2000	webmaster@merck.de
Epoxy-Einbettungsmittel	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Riedstraße 2, 89555 Steinheim	Tel. 07329 / 97 - 0 Fax 07329 / 97- 2160	Deorders@europe.sial.com
Epoxy-Einbettungsmittel <i>Beschleuniger</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Riedstraße 2, 89555 Steinheim	Tel. 07329 / 97 - 0 Fax 07329 / 97- 2160	Deorders@europe.sial.com
Epoxy-Einbettungsmittel <i>Härter DDSA</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Riedstraße 2, 89555 Steinheim	Tel. 07329 / 97 - 0 Fax 07329 / 97- 2160	Deorders@europe.sial.com
Epoxy-Einbettungsmittel <i>Härter MNA</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Riedstraße 2, 89555 Steinheim	Tel. 07329 / 97 - 0 Fax 07329 / 97 -2160	Deorders@europe.sial.com
Essigsäure 100 % (Eisessig) zur Analyse	Merck KGaA	Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt	Tel. 06151 / 72-0 Fax 06151 / 72-2000	webmaster@merck.de
Ethanol	Merck KGaA	Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt	Tel. 06151 / 72-0 Fax 06151 / 72-2000	webmaster@merck.de
Formaldehydlösung min. 37 %	Merck KGaA	Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt	Tel. 06151 / 72-0 Fax 06151 / 72-2000	webmaster@merck.de
Glutaraldehydlösung Grade I, 25% in H ₂ O,	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Riedstraße 2, 89555 Steinheim	Tel. 07329 / 97 - 0 Fax 07329 / 97- 2160	Deorders@europe.sial.com
Hämatoxylin krist.	Merck KGaA	Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt	Tel. 06151 / 72-0 Fax 06151 / 72-2000	webmaster@merck.de
Kalialaun/Kaliumalaun/ Kaliumaluminiumsulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Fluka)	Riedstraße 2, 89555 Steinheim	Tel. 07329 / 97 - 0 Fax 07329 / 97- 2160	Deorders@europe.sial.com
Kupfergrids	Plano GmbH	Ernst-Befort-Straße 12, D- 35578 Wetzlar	Tel. 06441 / 9765-0 Fax 06441 / 9765-65	plano@plano-em.de
Natriumiodat	Merck KGaA	Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt	Tel. 06151 / 72-0 Fax 06151 / 72-2000	webmaster@merck.de
Nickelgrids	Plano GmbH	Ernst-Befort-Straße 12, D- 35578 Wetzlar	Tel. 06441 / 9765-0 Fax 06441 / 9765-65	plano@plano-em.de
Objektträger SuperFrost Plus	Carl Roth GmbH & Co. KG	Schoemperlenstr. 3-5, 76186 Karlsruhe	Tel. 0721 / 5606-0 Fax 0721 / 5606-149	info@carlroth.de
Osmiumtetroxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Riedstraße 2, 89555 Steinheim	Tel. 07329 / 97 - 0 Fax 07329 / 97- 2160	Deorders@europe.sial.com
Paraffin-Gewebeeinbett- mittel Vogel Histo-Comp	Wilhelm Vogel GmbH & Co.KG	Marburger Straße 81, 35396 Gießen	Tel.: 0641 / 932310 Fax 0641 / 39221	zentrale@vogel-giessen.de
(Iso-) Propanol	Merck KGaA	Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt	Tel. 06151 / 72-0 Fax 06151 / 72-2000	webmaster@merck.de
Propylenoxid (Fluka)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Riedstraße 2, 89555 Steinheim	Tel. 07329 / 97 - 0 Fax 07329 / 97- 2160	Deorders@europe.sial.com
Salzsäure rauchend, 37 %	Merck KGaA	Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt	Tel. 06151 / 72-0 Fax 06151 / 72-2000	webmaster@merck.de
Uranylazetat	Merck KGaA	Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt	Tel. 06151 / 72-0 Fax 06151 / 72-2000	webmaster@merck.de
Xylol zur Analyse	Merck KGaA	Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt	Tel. 06151 / 72-0 Fax 06151 / 72-2000	webmaster@merck.de
Zitronensäure, Citric acid (Fluka)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Riedstraße 2, 89555 Steinheim	Tel. 07329 / 97 - 0 Fax 07329 / 97- 2160	Deorders@europe.sial.com

8. Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung	Teil 1/3
Apt	Apoptose	
AS	Al(OH) ₃ -Suspension	
ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain	
BCG	Bacille-Calmette-Guérin	
BK	Brustkorb	
CSF-1	Colony-stimulating factor; Kolonie-stimulierender Faktor	
E	Entzündung	
eG	eosinophile Granulozyten	
E-Grad	Entzündungsgrad	
Fb	Fibroblasten	
FeLV	Felines Leukämievirus	
FeSV	Felines Sarkomvirus	
Fgw	Fettgewebe	
FS	Fibrosarkom	
Fz	Fibrozyten	
ggr.	geringgradig	
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor	
Gr.	Gruppe	
Gruppe aIS	Gruppe der (aluminium)adjuvanshaltigen Tollwut-Impfstoffe	
Gruppe naIS	Gruppe des adjuvansfreien Tollwut-Impfstoffes	
Gruppe ahIS	Gruppe der Al(OH) ₃ -haltigen Tollwut-Impfstoffe	
Gruppe apIS	Gruppe des AlPO ₄ -haltigen Tollwut-Impfstoffes	
HE	Hämatoxylin-Eosin	
hgr.	hochgradig	
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry; Induktiv gekoppelte Plasmaionen-Massenspektrometrie	
I.E.	Internationale Einheit	
IFN-γ	Interferon Gamma	
iFS	Injektionsassoziiertes Fibrosarkom	
IL	Interleukin	
IS-COMs	Immunstimulierende Komplexe	

Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung	Teil 2/3
I.U.	Internationale Einheit gemäß Europäischem Arzneibuch	
LPS	Lipopolysaccharid	
Ly	Lymphozyten	
Ly.-Inf.	Lymphozyteninfiltrate	
Mak	Makrophagen	
mgr.	mittelgradig	
MMf	Makrophagische Myofasziitis	
Msk	(Haut-)Muskel	
n	Probenzahl/Stichprobenumfang	
NaCl-Lsg.	isotonische Kochsalzlösung	
NALP3	NACHT [NAIP, CIITA, HET-E and TP1]-domain, leucine-rich-repeat-, and PYD [pyrin-domain] containing protein 3; Synonym: PYPAF1/Cryopyrin/CIAS1/NLRP3	
Nek	Nekrose	
NF-κB	Nuclear Factor Kappa B	
nG	neutrophile Granulozyten	
niFS	nicht-injektionsassoziiertes Fibrosarkom	
obB	ohne besonderen Befund	
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells	
PBS	Phosphate Buffered Saline	
PDGF	platelet-derived growth factor (Wachstumsfaktor)	
PZ	Plasmazellen	
RZ	mehrkerige Riesenzellen	
s	Standardabweichung	
SI	adjuvansfreier Staupe-Impfstoff	
TI 1	Al(OH) ₃ -haltiger Tollwut-Impfstoff 1	
TI 2	Al(OH) ₃ -haltiger Tollwut-Impfstoff 2	
TI 3	AlPO ₄ -haltiger Tollwut-Impfstoff 3	
TI 4	adjuvansfreier Tollwut-Impfstoff 4	
TEM	Transmissionselektronenmikroskop	
TGF-β1	Transforming Growth Faktor-β1	
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α	
ub	unbehandelt	
US(s)	Untersuchung(s)	

Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung	Teil 3/3
V1	Versuchsserie 1	
V2	Versuchsserie 2	
Wo	Woche	
\bar{x}	Mittelwert	
x	Median	

9. Literaturverzeichnis

Adams D. O. (1976), The granulomatous inflammatory response. *Am. J. Pathol.* 84: 163-192

Baelmans R., Parmentier H. K., Dorny P., Demey F., Berkvens D. (2006), Reciprocal antibody and complement responses of two chicken breeds to vaccine strains of Newcastle disease virus, infectious bursal disease virus and infectious bronchitis virus. *Vet. Res. Com.* 30: 567–576

Bassermann F. J. (1969), Die Pulmonale Cholesterin-Granulomatose. *Lung* 139: 281-294

Behring E. von (1972), Geschichte der Diphtherie. Unveränderter Nachdruck der Ausgabe 1893 durch die Dr. Martin Sändig oHG, Wiesbaden, mit Genehmigung des Georg Thieme Verlages in Stuttgart: S. 147, ISBN 3-500-24480-7

Behring E. von, Boer E., Kossel A. (1893), Zur Behandlung diphtheriekranker Menschen mit Diphtherieheilserum. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 19: 389-393

Behring E. von & Kitasato (1890), Über das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 16.: 1113-1114

Behring E. von & Wernicke (1892), Über Immunisierung und Heilung von Versuchstieren bei der Diphtherie. *Zeitschr. Hyg., XI*: 10-44

Bergfors E., Bjorkelund C., Trollfors B. (2005), Nineteen cases of persistent pruritic nodules and contact allergy to aluminium after injection of commonly used aluminium-adsorbed vaccines. *Eur. J. Pediatr.* 164: 691-697

Black M. M. & Epstein W. L. (1974), Formation of multinucleate giant cells in organized epithelioid cell granulomas. *Am. J. Pathol.* 74: 263–274

Blagowechensky N. N. (1938), Durée du séjour de l'antigène dans l'organisme et immunité. *Rev. Immunol. Paris* 4: 161

Blennow M., Granström M., Björkstén B. (1990), Immunoglobulin E response to pertussis toxin after vaccination with acellular pertussis vaccine. *Manclark C. R., ed.; Proceeding of the Sixth International Symposium on Pertussis* DHHS Publication No. (FDA) 90-1164, Bethesda, MD, Department of Health and Human Services: 184-188

Bomford R. (1980), The comparative selectivity of adjuvants for humoral and cell-mediated immunity. II. Effect on delayed-type hypersensitivity in the mouse and guinea pig, and cell-mediated immunity to tumour antigens in the mouse of Freund's incomplete and complete adjuvants, alhydrogel, *Corynebacterium parvum*, *Bordetella pertussis*, muramyl dipeptide and saponin. *Clin. Exp. Immunol.* 39: 435-441

- Bomford R., Stapleton M., Winsor S., McKnight A., Andronova T. (1992), The control of the antibody isotype response to recombinant human immunodeficiency virus gp120 antigen by Adjuvants. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 8: 1765-1771
- Bordet A. L., Michenet P., Cohen C., Arbion F., Ekindi N., Bonneau C., Kerdraon R., Coville M. (2001), Granulome post-vaccinal lié à l'hydroxide d'aluminium [Post-vaccination granuloma due to aluminium hydroxide]. *Ann. Pathol.* 21: 149-152
- Brand K. G., Buoen LC, Johnson KH, Brand I (1975), Etiological factors, stages, and the role of the foreign body in foreign body tumorigenesis: a review. *Canc. Res.* 35: 279-286
- Brand K. G., Buoen L. C., Brand I. (1976), Multiphasic incidence of foreign body-induced sarcomas. *Canc. Res.* 36: 3681-3683
- Brewer J. M., Conacher M., Hunter C. A., Mohrs M., Brombacher F., Alexander J. (1999), Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4- or IL-13-mediated signaling. *J. Immunol.* 163: 6448-6454
- Briscoe C. M., Lipscomb T. P., McKinney L. (1998), Pulmonary metastasis of a feline vaccination-site fibrosarcoma. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10: 79-82
- British Medical Journal* (1896a), The Jenner centenary / Vaccination and its development: Jenner and Pasteur / Our Jenner centenary number: 1299-1303
- British Medical Journal* (1896b), Precursors of Jenner: 1304
- Carew J. S., Schmidt J. A., Humphrey S. A., et al. (1999), Growth factor expression and vaccine-associated sarcoma tumorigenicity, in Proceedings. *19th Annu Vet. Cancer Soc. Conf.:* 11-13
- Chang H. W., Ho S. Y., Lo H. F., Tu Y. C., Jeng C. R., Liu C. H., Wang F. I., Pang V. F. (2006), Vaccine-associated rhabdomyosarcoma with spinal epidural invasion and pulmonary metastasis in a cat. *Vet. Pathol.* 43: 55-58
- Comoy E. E., Capron A., Thyphronitis G. (1997), In vivo induction of type 1 and 2 immune responses against protein antigens. *Int. Immunol.* 9: 523-531
- Chong H., Brady K., Metze D., Calonje E. (2006), Persistent nodules at injection sites (aluminium granuloma) - clinicopathological study of 14 cases with a diverse range of histological reaction patterns. *Histopathol.* 48: 182-188
- Cohrs P. & Schulte F. (1952), Aluminiumhydroxidgranulome bei Tieren [Aluminum hydroxide causing granulomata in animals]. *Zentralbl. Allg. Pathol.* 89: 77-82
- Culora G. A., Ramsay A. D., Theaker J. M. (1996), Aluminium and injection site reactions. *J. Clin. Pathol.* 49: 844-847
- Dambach D., Carlson J., Riddle D., Hendrick M. (1996), Immunohistochemical identification and localisation of growth factors in feline postvaccinal lesions. *Vet. Pathol.* 33: 607

Literaturverzeichnis

- Davis J. M. (1963), The ultrastructural changes that occur during the formation of lung macrophages to giant cells and fibroblasts in experimental asbestosis. *Br. J. Exp. Pathol.* 44: 568-575
- Day M. J., Schoon H. A., Magnol J. P., Saik J., Devauchelle P., Truyen U., Gruffydd-Jones T. J., Cozette V., Jas D., Poulet H., Pollmeier M., Thibault J. C. (2007), A kinetic study of histopathological changes in the subcutis of cats injected with non-adjuvanted and adjuvanted multi-component vaccines. *Vaccine* 25: 4073-4084
- Debré P. (1994), Louis Pasteur. *Grandes biographies Flammarion*; Flammarion, Paris: S. 325-469, ISBN: 2-08-066646-0
- Deim Z., Palmai N., Cserni G. (2008), Feline vaccine-associated fibrosarcoma induced by aluminium compound in two cats: short communication. *Acta Vet. Hung.* 56: 111-116
- Di Muzio A., Capasso M., Verrotti A., Trotta D., Lupo S., Pappalepore N., Manzoli C., Chiarelli F., Uncini A. (2004), Macrophagic myofasciitis: an infantile Italian case. *Neuromuscul. Disord.* 14: 175-177
- Doddy F. D., Glickman L. T., Glickman N. W., Janovitz E. B. (1996), Feline fibrosarcomas at vaccination sites and non-vaccination sites. *J. Comp. Pathol.* 114: 165-174
- Dubielzig R. R. (1984), Ocular sarcoma following trauma in three cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 184: 578-581
- Dubielzig R. R., Everitt J., Shaddock J. A., Albert D. M. (1990), Clinical and morphologic features of post-traumatic ocular sarcomas in cats. *Vet. Pathol.* 27: 62-65
- Dubielzig R. R., Hawkins K. L., Miller P. E. (1993), Myofibroblastic sarcoma originating at the site of rabies vaccination in a cat. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5: 637-638
- Duchow K., Kiefert C., Jakel V., Thiel H.-J., König M., Cußler K. (2005), Adjuvant-free rabies vaccines: serological immune response in cats. Poster auf der *First International Conference on Rabies in Europe - Kiev, Ukraine, 15-18 June, 2005*
- Edelman K. J., He Q., Makinen J. P., Haanpera M. S., Tran Minh N. N., Schuerman L., Wolter J., Mertsola J. A. (2004), Pertussis-specific cell-mediated and humoral immunity in adolescents 3 years after booster immunization with acellular pertussis vaccine. *Clin. Infect. Dis.* 39: 179-185
- Eisenbarth S. C., Colegio O. R., O'Connor W., Sutterwala F. S., Flavell R. A. (2008), Crucial role for the NALP3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* 453: 1122-1126
- Eisler M. & Eibl H. (1949), Über die Wirkungsweise der Aluminium-Diphtherie-Impfstoffe. *Klin. Med. Osterr. Z. Wiss. Prakt. Med. (Wien)* 4: 441-453

Literaturverzeichnis

- Ellis J. A., Jackson M. L., Bartsch R. C., McGill L. G., Martin K. M., Trask B. R., Haines D. M. (1996), Use of immunohistochemistry and polymerase chain reaction for detection of oncornaviruses in formalin-fixed, paraffin-embedded fibrosarcomas from cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 209: 767-771
- Erdohazi M. & Newman R. L. (1971), Aluminium hydroxide granuloma, *Br. Med. J.* 3: 621-623
- Esplin D. G., McGill L. D., Meininger A. C., Wilson S. R. (1993), Postvaccination sarcomas in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 202: 1245-1247
- Fawcett H. A. & Smith N. P. (1984), Injection-site granuloma due to aluminum. *Arch. Dermatol.* 120: 1318-1322
- Fischer D., Reimann J., Schröder R. (2003), Makrophagische Myofasciitis – Eine Impfungs-assoziierte entzündliche Muskelerkrankung [Macrophagic myofasciitis: inflammatory, vaccination-associated muscular disease]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 128: 2305-2308, ISSN 0012-0472
- Flarend R. E., Hem S. L., White J. L., Elmore D., Suckow M. A., Rudy A. C., Dandashli E. A. (1997), *In vivo* Absorption of aluminium-containing vaccine adjuvants using ²⁶Al. *Vaccine* 15: 1314-1318
- Ford R. B. M., Macy D. W., McGill L. D., Bergmann P. J. (Symposium 2000), Feline vaccine responsibility, Science and Ethics; Notes from American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM)
- Gagnon A.-C. (2000), Drug injection-associated fibrosarcoma in a cat. *Feline Pract.* 28: 18-21
- Gardner L. U. (1937), The similarity of the lesions produced by silica and by the *Tubercle bacillus*. *Am. J. Pathol.* 13: 13-24.3
- Gardner L. U. & Cummings D. E. (1933), The reaction to fine and medium sized quartz and aluminum oxide particles. Silicotic cirrhosis of the liver. *Am. J. Pathol.* 9 (Suppl): 751–764.5
- Garner M. M., Ramsell K., Schoemaker N. J., Sidor I. F., Nordhausen R. W., Bolin S., Evermann J. F., Kiupel M. (2007), Myofasciitis in the domestic ferret. *Vet. Pathol.* 44: 25-38
- Gemmill L. T. (1998), Injection-site sarcomas in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 213: 955
- Gherardi R. K., Coquet M., Cherin P., Belec L., Moretto P., Dreyfus P. A., Pellissier J. F., Chariot P., Authier F. J. (2001), Macrophagic myofasciitis lesions assess long-term persistence of vaccine-derived aluminium hydroxide in muscle. *Brain* 124: 1821-1831
- Gillispie C. C. (1981a), Dictionary of Scientific Biography, New York, Charles Scribner's Sons, Volume 7, Iamblichus – Karl Landsteiner: S. 95, Vol. 7 & 8: ISBN 0-684-16966-5

Literaturverzeichnis

- Gillispie C. C. (1981b), Dictionary of Scientific Biography, New York, Charles Scribner's Sons, Volume 10, S. G. Navashin – W. Piso: S. 350, Vol. 9 & 10: ISBN 0-684-16967-3
- Gillispie C. C. (1981c), Dictionary of Scientific Biography, New York, Charles Scribner's Sons, Volume 1, Pierre Abailard – L. S. Berg: S. 574, Vol. 1 & 2: ISBN 0-684-16963-0
- Gillispie C. C. (1981d), Dictionary of Scientific Biography, New York, Charles Scribner's Sons, Volume 3, Pierre Cabanis – Heinrich von Dechen: S. 22, Vol. 3 & 4: ISBN 0-684-16964-9
- Gillispie C. C. (1981e), Dictionary of Scientific Biography, New York, Charles Scribner's Sons, Volume 11, A. Pitcairn – B. Rush: S. 271, Vol. 11 & 12: ISBN 0-684-16968-1
- Glenny A., Pope C., Waddington H., Wallace U. (1926), Immunological notes XVII to XXIV. *J. Path. Bact.* 29: 31-40
- Goto N., Kato H., Maeyama J., Shibano M., Saito T., Yamaguchi J., Yoshihara S. (1997), Local tissue irritating effects and adjuvant activities of calcium phosphate and aluminium hydroxide with different physical properties. *Vaccine* 15: 1364-1371
- Gupta R. K., Alroy J., Alonso M. J., Langer R., Siber G. R. (1997), Chronic local tissue reactions, long term immunogenicity and immunologic priming of mice and guinea pigs to tetanus toxoid encapsulated in biodegradable polymer microspheres composed of poly lactide-co-glycolide polymers. *Vaccine* 15: 1716-1723
- Gupta R. K., Rost B. E., Relyveld E., Siber G. H. (1995), Adjuvant properties of aluminium and calcium compounds. *Pharm. Biotechnol.* 6: 229-248
- Hamilton J. A. (2003), Nondisposable materials, chronic inflammation, and adjuvant action. *J. Leukoc. Biol.* 73: 702-712
- Hamilton J. A., Byrne R., Whitty G. (2000), Particulate adjuvants can induce macrophage survival, DNA synthesis, and a synergistic proliferative response to GM-CSF and CSF-1. *J. Leukoc. Biol.* 67: 226-232
- Harrison W. T. (1935), Some observations on the use of alum precipitated diphtheria toxoid. *Am. J. Pub. Health* 25: 298-300
- Hem S. L. (2002), Elimination of aluminum adjuvants. *Vaccine* 20 Suppl 3: 40-43
- Hendrick M. J. (1998), Feline vaccine-associated sarcomas: current studies on pathogenesis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 213: 1425-1426
- Hendrick M. J. & Brooks J. J. (1994), Postvaccinal sarcomas in the cat: histology and immunohistochemistry. *Vet. Pathol.* 31: 126-129

Literaturverzeichnis

- Hendrick M. J. & Dunagan C. A. (1991), Focal necrotizing granulomatous panniculitis associated with subcutaneous injection of rabies vaccine in cats and dogs: 10 cases (1988-1989). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 198: 304-305
- Hendrick M. J. & Goldschmidt M. H. (1991), Do injection site reactions induce fibrosarcomas in cats? *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 199: 968
- Hendrick M. J., Goldschmidt M. H., Shofer F. S., Wang Y. Y., Somlyo A. P. (1992), Postvaccinal sarcomas in the cat: epidemiology and electron probe microanalytical identification of aluminum. *Cancer Res.* 52: 5391-5394
- Hendrick M. J., Shofer F. S., Goldschmidt M. H., Haviland J. C., Schelling S. H., Engler S. J., Gliatto J. M. (1994), Comparison of fibrosarcomas that developed at vaccination sites and at nonvaccination sites in cats: 239 cases (1991-1992). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 205: 1425-1429
- Herrmann J. B., Kanhouwa S., Kelley R. J., Burns W. A. (1971), Brief recordings: fibrosarcoma of the thigh associated with a prosthetic vascular graft. *N. Engl. J. Med.* 284: 91
- Hornung V., Bauernfeind F., Halle A., Samstad E. O., Kono H., Rock K. L., Fitzgerald K. A., Latz E. (2008), Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat. Immunol.* 9: 847-856
- Illmensee K. & Mintz B. (1976), Totipotency and normal differentiation of a single teratocarcinoma cell cloned by injection into blastocysts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 549-553
- Iomhair M. M. & Lavelle S. M. (1997), Effect of film size on production of foreign body sarcoma by perforated film implants. *Technol. Health Care* 5: 331-334
- Jakel V., Thiel H.-J., König M., Duchow K., Wolff D., Neubert D., Kiefert C., Cußler K. (2006), Comparison of serological immune responses in cats and ferrets induced by adjuvanted and non-adjuvanted rabies vaccines. Poster auf der *4th International Veterinary Vaccines and Diagnostics Conference in Oslo, June 25-29, 2006, Norway*; Tagungsmonographie ISBN 82-905550-52-9, Editors Ingrid Olsen, National Veterinary Institute and Tor Gjøen, University of Oslo, Norway; Request for Reprint: National Veterinary Institute, POBox 8156 Dep., 0033 Oslo, Norway; post@vetinst.no
- Jelínek F. (2003), Postinflammatory sarcoma in cats. *Exp. Toxicol. Pathol.* 55: 167-172
- Jenner E. J. (1798), An inquiry into the causes and effects of the variolae vaccinae, a disease discovered in some of the western counties of England, particularly Gloucestershire, and known by the name of the cow-pox. London, printed in Soho by Sampson Low, N^o. 7: S. 32-34
- Jennings T. A., Peterson L., Axiotis C. A., Friedlaender G. E., Cooke R. A., Rosai J. (1988), Angiosarcoma associated with foreign body material. A report of three cases. *Cancer* 62: 2436-2444

Literaturverzeichnis

- Kanneganti T.-D., Body-Malapel M., Amer A., Park J.-H., Whitfield J., Franchi L., Taraporewala Z. F., Miller D., Patton J. T., Inohara N., Núñez G. (2006), Critical role for Cryopyrin/NALP3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA. *J. Biol. Chem.*, 281: 36560-36568
- Katayama R., Huelsmeyer M. K., Marr A. K., Kurzman I. D., Thamm D. H., Vail D. M. (2004), Imatinib mesylate inhibits platelet-derived growth factor activity and increases chemosensitivity in feline vaccine-associated sarcoma. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 54: 25-33
- Kass P. H., Barnes W. G., Jr., Spangler W. L., Chomel B. B., Culbertson M. R. (1993), Epidemiologic evidence for a causal relation between vaccination and fibrosarcoma tumorigenesis in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 203: 396-405
- Kinne J. & Tarello W. (2007), Vaccine-associated fibrosarcoma in a lion (*Panthera leo*). *Revue Méd.Vét.* 158: 73-74
- Kolmer J. A. (1915), A practical textbook of infection, immunity and specific therapy. 1st ed. Philadelphia and London; W. B. Saunders Company: S. 140-141
- Kool M., Pétrilli V., De Smedt T., Rolaz A., Hammad H., van Nimwegen M., Bergen I. M., Castillo R., Lambrecht B. N., Tschopp J. (2008), Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. *J. Immunol.* 181: 3755-3759
- Koskela P. & Herva E. (1982), Cell-mediated and humoral immunity induced by a live *Francisella tularensis* vaccine. *Inf. Imm.* 36: 983-989
- Lafaye S., Authier F. J., Fraitag S., Rethers L., Bagot M., Wechsler J. (2004), Granulome vaccinal avec hyperplasie lymphocytaire: 10 cas [Granuloma with lymphocytic hyperplasia following vaccination: 10 cases. Presence of aluminium in the biopsies.]. *Ann. Dermatol. Venereol.* 131: 769-772
- Lanzafame S. & Micali G. (1993), Iperplasia linfoide cutanea (pseudolinfoma) secondaria a vaccinazione [Cutaneous lymphoid hyperplasia (pseudolymphoma) secondary to vaccination]. *Pathologica* 85: 555-561
- Larsen R. S. & Carpenter J. W. (1999), Suspected vaccine- and/or dart-associated fibrosarcoma in a tiger (*Panthera tigris*). *Verh. ber. Erkr. Zootiere* 39: 401-404
- Lou J. L., Maeda S., Hsu L.-C., Yagita H., Karin M. (2004), Inhibition of NF- κ B in cancer cells converts inflammation induced tumor growth mediated by TNF- α to TRAIL-mediated tumor regression. *Cancer Cell* 6: 297-305
- Li H., Nookala S., Re F. (2007), Aluminum hydroxide adjuvants activate caspase-1 and induce IL-1 β and IL-18 release. *J. Immunol.* 178: 5271-5276
- Madewell B. R., Gieger T. L., Pesavento A., Kent M. S. (2004), Vaccine site-associated sarcoma and malignant lymphoma in cats: a report of six cases (1997-2002). *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 40: 47-50

Literaturverzeichnis

- Madewell B. R., Griffey S. M., McEntee M. C., Leppert V. J., Munn R. J. (2001), Feline vaccine-associated fibrosarcoma: an ultrastructural study of 20 tumors (1996-1999). *Vet. Pathol.* 38: 196-202
- Mark A., Bjorksten B., Granstrom M. (1997), Immunoglobulin E and G antibodies two years after a booster dose of an aluminium-adsorbed or a fluid DT vaccine in relation to atopy. *Pediatr. Allergy Immunol.* 8: 83-87
- Martinon F., Burns K., Tschopp J. (2002), The inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . *Mol. Cell* 10: 417-426
- Martinon F., Pétrilli V., Mayor A., Tardivel A., Tschopp J. (2006), Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 440: 237-241
- Martins-Green M., Boudreau N., Bissell M. J. (1994), Inflammation is responsible for the development of wound-induced tumors in chickens infected with Rous sarcoma virus. *Cancer Res.* 54: 4334-4341
- Maubec E., Pinquier L., Viguier M., Caux F., Amsler E., Aractingi S., Chafi H., Janin A., Cayuela J. M., Dubertret L., Authier F. J., Bachelez H. (2005), Vaccination-induced cutaneous pseudolymphoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* 52: 623-629
- McGinnes G. F. & Stebbins E. L. (1934), Immunity to Diphtheria and Response to Artificial Immunization of Children in Rural Virginia. *Am. J. Pub. Health* 24: 319-324
- Miliauskas J. R., Mukherjee T., Dixon B. (1993), Postimmunization (vaccination) injection-site reactions. A report of four cases and review of the literature. *Am. J. Surg. Pathol.* 17: 516-524
- Moriyama H., Huang C. C., Shirahata Y., Abramson M. (1984), Effects of keratin on bone resorption in experimental otitis media. *Eur. Ar. Oto-Rhino-Laryn.* 239: 61-68
- Mosmann T. R. & Coffman R. L. (1989), TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7: 145-173
- Munday J. S., Stedman N. L., Richey L. J. (2003), Histology and immunohistochemistry of seven ferret vaccination-site fibrosarcomas. *Vet. Pathol.* 40: 288-293
- Murray J. (1998), Vaccine injection-site sarcoma in a ferret. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 213: 955
- Nakamura T., Ueda H., Tsuda T., Li Y. H., Kiyotani T., Inoue M., Matsumoto K., Sekine T., Yu L., Hyon S. H., Shimizu Y. (2001), Long-term implantation test and tumorigenicity of polyvinyl alcohol hydrogel plates. *J. Biomed. Mater. Res.* 56: 289-296
- Oppenheimer B. S., Oppenheimer E. T., Stout A. P., Willhite M., Danishefsky I. (1958), The latent period in carcinogenesis by plastics in rats and its relation to the presarcomatous stage. *Cancer* 11: 204-213

Literaturverzeichnis

Panisset M. (1949), Voilà vingt-cinq ans, un vétérinaire, Gaston Ramon découvrait les anatoxines. *Can. J. Comp Med. Vet. Sci.* 13: 60-63

Parish H. J. (1965a), A history of immunization. Edinburgh and London; E. & S. Livingstone Ltd.: S. 1-2

Parish H. J. (1965b), A history of immunization. Edinburgh and London; E. & S. Livingstone Ltd.: S. 63

Parish H. J. (1965c), A history of immunization. Edinburgh and London; E. & S. Livingstone Ltd.: S. 99-102

Parish H. J. (1965d), A history of immunization. Edinburgh and London; E. & S. Livingstone Ltd.: S. 217-219

Perper R. J., Oronsky A. L., Sanda M. (1976), The effect of BCG on extravascular mononuclear cell accumulation *in vivo*. *Int. J. Cancer* 17: 670-677

Pikarsky E., Porat R. M., Stein I., Abramovitch R., Amit S., Kasem S., Gutkovich-Pyest E., Urieli-Shoval S., Galun E., Ben-Neriah Y. (2004), NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 431: 461-466

Pineau A., Durand C., Guillard O., Bureau B., Stalder J. F. (1992), Role of aluminium in skin reactions after diphtheria-tetanus-pertussis-poliomyelitis vaccination: an experimental study in rabbits. *Toxicology* 73: 117-125

Ramon G. (1950), Le principe des anatoxines et ses applications. Paris, Masson & Cie: S. 1-229

Rivas E., Gomez-Arnaiz M., Ricoy J. R., Mateos F., Simon R., Garcia-Penas J. J., Garcia-Silva M. T., Martin E., Vazquez M., Ferreira A., Cabello A. (2005), Macrophagic myofasciitis in childhood: a controversial entity. *Pediatr. Neurol.* 33: 350-356

Ryu R. K., Bovill E. G., Jr., Skinner H. B., Murray W. R. (1987), Soft tissue sarcoma associated with aluminum oxide ceramic total hip arthroplasty. A case report. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 216: 207-212

Sauerbruch F. (1961), Das war mein Leben. 2. Auflage, Mohndruck Reinhard Mohn OHG, Gütersloh, Buch Nr. 2624, Fallbericht: S. 355-356

Savage J. (1973), Proceedings: Aluminium hydroxide granuloma. *Proc. R. Soc. Med.* 66: 984-985

Schoemaker N. J., Lumeij J. T., Rijnberk A. (2005), Current and future alternatives to surgical neutering in ferrets to prevent hyperadrenocorticism. *Vet. Med.* 100: 484-496

Seftor E. A., Meltzer P. S., Kirschmann D. A., Margaryan N. V., Seftor R. E. B., Hendrix M. J. C. (2006), The epigenetic reprogramming of poorly aggressive melanoma cells by a metastatic microenvironment. *J. Cell. Mol. Med.* 10: 174-196

Literaturverzeichnis

- Sharma M. C., Prentice A., Schmidt P. F., Sharma N., Goebel H. H. (2004), Macrophagic myofasciitis in a 3-month-old child. *J. Pediatr. Neurol.* 2: 225-229
- Sharp F. A., Ruane D., Claass B., Creagh E., Harris J., Malyala P., Singh M., O'Hagan D. T., Pétrilli V., Tschopp J., O'Neill L. A., Lavelle E. C. (2009), Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 106: 870-875
- Shingde, M., Hughes J., Boadle R., Wills E. J., Pamphlett R. (2005), Macrophagic myofasciitis associated with vaccine-derived aluminium. *Med. Jour. Aust.* 183: 145-146
- Sieweke M. H., Stoker A. W., Bissell M. J. (1989), Evaluation of the cocarcinogenic effect of wounding in Rous sarcoma virus tumorigenesis. *Cancer Res.* 49: 6419-6424
- Sieweke M. H., Thompson N. L., Sporn M. B., Bissell M. J. (1990), Mediation of wound-related Rous sarcoma virus tumorigenesis by TGF-beta. *Science* 248: 1656-1660
- Silverstein A. M. (1989a), A history of immunology. San Diego, California 92101, Academic Press Inc.: S. 352
- Silverstein A. M. (1989b), A history of immunology. San Diego, California 92101, Academic Press Inc.: S. 373
- Sinibaldi K., Rosen H., Liu S. K., DeAngelis M. (1976), Tumors associated with metallic implants in animals. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 118: 257-266
- Shi Y., Evans J. E., Rock K. L. (2003), Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 425: 516-521
- Slater D. N., Underwood J. C. N., Durrant T. E., Gray T., Hopper I. P. (1982), Aluminium hydroxide granulomas: light and electron microscopic studies and x-ray microanalysis. *Br. J. Dermatol.* 107: 103-108
- Speroni L., Bustuoabad V. de los A., Gasparri J., Chiaramoni N. S., Taira M. C., Ruggiero R. A., Alonso S. del V. (2009), Alternative site of implantation affects tumor malignancy and metastatic potential in mice: its comparison to the flank model. *Cancer Biol. Ther.* 8: 375-379.
- Stahl S. & Ben-Asher Y. (2000), Foreign body hair granuloma in barbers. *Eur. J. Plastic Surg.* 23: 333-334
- Stavrianeas N. G., Katoulis A. C., Kanelleas A., Hatziolou E., Georgala S. (2002), Papulonodular lichenoid and pseudolymphomatous reaction at the injection site of hepatitis B virus vaccination. *Dermatology* 205: 166-168
- Vahey J. W., Simonian P. T., Conrad E. U., III (1995), Carcinogenicity and metallic implants. *Am. J. Orthop.* 24: 319-324
- Valtulini S., Macchi C., Ballanti P., Cherel Y., Laval A., Theaker J. M., Bak M., Ferretti E., Morvan H. (2005), Aluminium hydroxide-induced granulomas in pigs. *Vaccine* 23: 3999-4004

Literaturverzeichnis

- Valtulini S., Macchi C., Gelmetti D., Ferretti E., Alborali G. L., Zanoni M. G. *et al.* (2001), Analisi dei fattori di rischio nel ritrovamento di granulomi in 6000 suini inoculati con un vaccino adiuvato con idrossido di alluminio. *Atti del XXVII Meeting Annuale della Società Italiana de Patologia ed Allevamento dei Suini, Parma, 23.-24.03.2001*: 243-265
- Vascellari M., Melchiotti E., Bozza M. A., Mutinelli F. (2003), Fibrosarcomas at presumed sites of injection in dogs: characteristics and comparison with non-vaccination site fibrosarcomas and feline post-vaccinal fibrosarcomas. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* 50: 286-291
- Vascellari M., Melchiotti E., Mutinelli F. (2006), Fibrosarcoma with typical features of postinjection sarcoma at site of microchip implant in a dog: histologic and immunohistochemical study. *Vet. Pathol.* 43: 545-548
- Verdier F., Burnett R., Michelet-Habchi C., Moretto P., Fievet-Groyne F., Sauzeat E. (2005), Aluminium assay and evaluation of the local reaction at several time points after intramuscular administration of aluminium containing vaccines in the *Cynomolgus monkey*. *Vaccine* 23: 1359-1367
- Walls R. S. (1977), Eosinophil response to alum adjuvants: involvement of T cells in non-antigen-dependent mechanisms. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 156: 431-435
- Warren K. S. & Domingo E. O. (1970), Granuloma formation around *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, and *S. japonicum* eggs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 19: 292-304
- White R. G., Coons A. H., Connolly J. M. (1955), Studies on antibody production: III. The alum granuloma. *J. Exp. Med.* 102: 73-82
- Wilcock B. P. & Yager J. A. (1986), Focal cutaneous vasculitis and alopecia at sites of rabies vaccination in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 188: 1174-1177

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bedanken

- bei allen **Mitarbeitern des Paul-Ehrlich-Institutes in Langen**, die mir die Arbeit im Institut ermöglicht haben und mir in der Zeit der Ausarbeitung zur Seite standen.

Hierbei sind besonders zu erwähnen:

- Herr Dr. Roland Plesker, der mich die Beurteilung der histologischen Schnitte lehrte
- Herr Dr. Klaus Cußler und Herr Dr. Andreas Hoffmann, die mir die Durchführung der Arbeit in ihrem Referat ermöglichten
- Herr Dr. Ingo Spreitzer, der mir ab Dezember 2006 als Mentor Beistand leistete und großen Einsatz zeigte
- Herr Dr. Klaus Boller, der mir die Arbeit in der Elektronenmikroskopie ermöglichte
- Frau Regina Horvath für die Betreuung der Frettchen der zweiten Versuchsserie
- Frau Inge Ringelstetter († 2006), die mich im ersten Jahr in die Arbeiten in der Histologie einführte.

- bei allen **Mitarbeitern des Institutes für Veterinärpathologie der Justus-Liebig-Universität in Gießen**, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben.

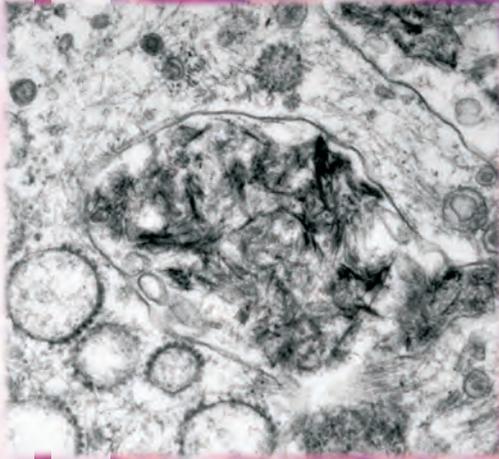
Hierbei ist besonders zu erwähnen:

- Herr Professor Dr. Manfred Reinacher, der sich als externer „Doktorvater“ zur Verfügung stellte. Er stand mir bei Problemen während der Entwicklung der Methoden zum Nachweis von Aluminium im Gewebe, bei Fragen zur Beurteilung der histologischen Schnitte und bei der korrekten Ausführung der Dissertation jederzeit als Ansprechpartner zur Verfügung.

- bei **den Mitarbeitern des Bundesamtes für Risikobewertung in Berlin**, die die Versorgung der Frettchen der ersten Versuchsserie übernahmen.

- bei Herrn Gottfried Glocke für die Hilfe im Verständnis der französischsprachigen Literatur

- beim **EQUAL-Projekt** für die finanzielle Unterstützung.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN 3-8359-5565-9



9 7 8 3 8 3 5 1 9 5 5 6 5 3 1