



# TVT

Tierärztliche Vereinigung für Tierschutz e.V.

## **Tierschutzaspekte bei der Immunisierung von Versuchstieren**

Merkblatt Nr. 4

*Dieses Merkblatt wurde erarbeitet unter Federführung des Arbeitskreises 4 der TVT.*

**Autoren:**

*Dr. Werner Nicklas, Deutsches Krebsforschungszentrum, Zentrales Tierlabor, D-69120 Heidelberg  
Dr. Klaus Cußler und Dr. Joachim Hartinger, Paul-Ehrlich-Institut, Postfach, D-63207 Langen*

Die Verwendung von Antikörpern hat in den letzten 2 oder 3 Jahrzehnten im gleichen Maße zugenommen wie das Arbeiten mit immunologischen Methoden. Das Immunisieren von Versuchstieren ist daher eine sehr häufig eingesetzte Technik, die für eine Vielzahl von Arbeitsgebieten in allen Bereichen der biomedizinischen Forschung eine erhebliche Bedeutung besitzt. Leider sind jedoch viele neuere Entwicklungen nicht in die Praxis des Immunisierens eingeflossen, weil Wissenschaftler oft nicht die Möglichkeit haben, sich mit Detailproblemen der Immunisierung zu beschäftigen. Vielmehr werden häufig bewährte Protokolle zur Immunisierung aus der Literatur übernommen, die nicht mit der heutigen Einstellung zum Versuchstier vereinbar sind bzw. die teilweise auch von den Genehmigungsbehörden nicht mehr toleriert werden. Mit diesem Überblick sollen daher einige Anregungen gegeben werden, wie bei der Immunisierung vermeidbare Belastungen für die verwendeten Versuchstiere verhindert werden können.

Bei der Auswahl einer Immunisierungsmethode sollte ein gangbarer Mittelweg gesucht werden, der einerseits das Immunisierungsergebnis, also Menge und Spezifität der gebildeten Antikörper, und andererseits die bei dem Tier auftretenden Nebenwirkungen berücksichtigt. Ziel muß es sein, mit einer möglichst geringen Anzahl von Injektionen bei minimalen Nebenwirkungen gute Antiseren zu erhalten. Dies läßt sich am ehesten durch die Auswahl optimaler Immunisierungsmethoden unter Verwendung von Adjuvantien, die möglichst wenig Nebenwirkungen zeigen, erreichen. Dazu müssen mehrere Faktoren berücksichtigt werden:

## I. Das Antigen

Je nach Beschaffenheit des Antigens können unterschiedliche Immunisierungsprozeduren sinnvoll sein. Folgende Eigenschaften des Antigens müssen berücksichtigt werden:

**1. Die physikalische Beschaffenheit:** Geformte, korpuskuläre Antigene (z.B. Bakterien, Viren, Zellorganellen) ergeben in der Regel eine starke und schnelle Immunantwort nach intravenöser Injektion. Adjuvantien sind normalerweise nicht nötig. Lösliche Antigene hingegen bewirken alleine nur selten eine deutliche Antikörperbildung. In der Regel erhält man eine bessere Immunantwort in Verbindung mit Adjuvantien.

**2. Die chemische Beschaffenheit:** Proteine und größere Polypeptide (>5-10.000 Dalton) stimulieren meist deutliche Immunantworten (Faustregel: je größer das Molekulargewicht und je komplexer ein Antigen ist, desto besser ist die zu erwartende Immunantwort).

Synthetische Peptide (kleiner als 1000 Dalton) sowie schwach immunogene Substanzen, wie Nukleinsäuren, Polysaccharide und Lipide müssen an Trägermaterialien wie z.B. Serum- oder Eialbumin bzw. an inerte Transporter wie Mikropartikel oder Membranen gekoppelt werden, um ausreichende Immunreaktionen hervorzurufen.

Antigene, die toxische, immunsuppressive oder infektiöse Eigenschaften haben, sollten in Konzentrationen eingesetzt werden, die das Wohlbefinden der Tiere nicht erheblich beeinträchtigen.

**3. Der Reinheitsgrad:** Unabhängig von der chemischen Beschaffenheit sollten Antigene möglichst rein vorliegen, da weniger aufgereinigte Präparationen ein hohes Risiko an

Kreuzreaktivität bringen. Oft sind jedoch insbesondere lösliche Substanzen, die aus biologischen Materialien gewonnen werden, in wenig aufgereinigter Form stark immunogen, während eine stärkere Reinigung mit einem Verlust an Immunogenität verbunden sein kann.

**4. Die verfügbare Menge Antigen:** Für Immunisierungen einer Maus werden bei Proteinen durchschnittlichen Molekulargewichts pro Injektion 50 - 100 µg, für Kaninchen und Hühner etwa 100 µg und für größere Tierarten noch größere Antigenmengen (z.B. Schaf 0,1 - 5 mg) empfohlen. Bei der Immunisierung mit Peptiden empfiehlt sich bei Mäusen eine Menge von ca. 100 µg und bei Kaninchen ca. 300 µg Peptid pro Immunisierung. Für die Booster-Immunisierungen reicht jeweils die Hälfte dieser Antigenmengen.

Sollte nur wenig Antigen verfügbar sein, ermöglicht die intrasplenale Applikation, auch ohne stark reizende Adjuvantien, die Immunisierung von Kaninchen mit wenigen Mikrogramm und bei Mäusen sogar mit Nanogramm-Mengen von Antigen. Durch Blotten auf Nitrozellulose aufgetragenes Protein läßt sich bei Mäusen ebenfalls schon mit wenigen Nanogramm zum Immunisieren einsetzen. Die intrasplenale bzw. intranodale Injektion kommt aus Tierschutzgründen nur für Ausnahmefälle infrage.

**5. Phylogenetischer Abstand:** Je weiter das immunisierte Tier phylogenetisch von dem Antigen-produzenten entfernt ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, Antikörper gegen das nicht denaturierte, native Protein zu erhalten.

**6. Prä-Immunseren:** Zur Negativkontrolle der Antikörperexperimente sollte die Abnahme und Lagerung von Prä-Immunseren („Null-Seren“) bzw. Prä-Immun-Eiern vor der ersten Immunisierung eingeplant werden, da sich sonst im Testsystem kein serumspezifischer Nullwert feststellen läßt.

**7. Aseptizität des Antigens:** Das verwendete Antigen oder die Antigen/Adjuvans-Mischung sollte unter sterilen bzw. aseptischen Bedingungen dargestellt werden. Proteine, Peptide und andere niedermolekulare Substanzen sollten dafür nach Möglichkeit sterilfiltriert werden. Dabei muß die Membranbindung des Antigens beachtet und z.B. ein Zellulose-Azetat-Filter verwendet werden; bei ölhaltigen Adjuvantien sollte man den Filter vor der Zugabe des Adjuvans benutzen. Das Ausschlußvolumen des Filters sollte 0,22 µm betragen.

**8. Haptene und Peptid-Antigene:** Haptene und (zumindest kleinere) Peptide müssen an Träger bzw. Carrier gebunden werden, damit sie eine Immunantwort auslösen können. Diese Carrier können inert sein (z.B. Mikropartikel) oder selbst auch adjuvante Eigenschaften haben (z.B. Toxine). Benutzt werden Membranen, Mikropartikel, Proteine und Gele.

## II. Das Adjuvans

**1. Wahl des Adjuvans:** Adjuvantien werden zur Stimulierung des Immunsystems eingesetzt. Sie rufen häufig eine lokale Irritation hervor und aktivieren Phagozytose und Lymphozyten. Der Depoteffekt bewirkt eine Verzögerung der Freisetzung und des Antigenabbaus und verlängert so den Kontakt des Antigens zum Immunsystem.

Der Einsatz von Adjuvantien ist besonders in folgenden Fällen notwendig:

- das Antigen ist nur schwach immunogen (z.B. Peptide, Lipide, Nukleinsäuren)
- nur eine begrenzte Menge des Antigens ist verfügbar
- natives Protein wird als Antigen eingesetzt

Wie jedes andere Experiment mit Versuchstieren dürfen Immunisierungen nur durch autorisiertes Personal mit der entsprechenden Ausbildung und Genehmigung erfolgen. Die Tiere müssen - vor allem, wenn Freundes Adjuvans eingesetzt wurde - täglich von qualifiziertem Personal kontrolliert werden.

**2. Freundes Adjuvans:** Komplettes Freundes Adjuvans (KFA) besitzt wohl den stärksten stimulierenden Effekt und wird daher sehr häufig verwendet. Für die starke Adjuvanswirkung des KFA sind die darin enthaltenen hitzeinaktivierten Mykobakterien verantwortlich. Eine weitere Komponente besteht aus nicht metabolisierbarem Mineralöl, das für den Depoteffekt verantwortlich ist. Als dritte Komponente bewirkt ein Emulgator, daß die wässrige Antigenlösung mit dem Öl eine stabile Wasser-in-Öl-Emulsion ergibt.

Leider sind die Nebenwirkungen von KFA, unter anderem in Form von Entzündungsherden, Abszessen und Granulomen - manchmal auch Fieber - erheblich. Intraperitoneale Applikation (Maus, Ratte) bewirkt eine Peritonitis, intramuskuläre Injektion führt leicht zur Abszeßbildung. Grundsätzlich ist von der Schmerzhaftigkeit all dieser Entzündungsprozesse auszugehen. KFA sollte deshalb im Regelfall nur subkutan oder intradermal gegeben werden. Wegen der starken Nebenwirkungen ist die Verwendung von KFA nur dann zu vertreten, wenn seine starke immunstimulierende Wirkung wirklich notwendig ist. Eine intravenöse Applikation darf nicht erfolgen, da sie zum Tode des Versuchstieres führen kann.

Neben dem Kompletten Freundes Adjuvans gibt es auch Inkomplettes Freundes Adjuvans (IFA), dem der Zusatz von Mykobakterien fehlt. Während KFA für die Primärinjektion verwendet wird, dient IFA für Booster-Injektionen, um allergische Reaktionen gegen Mykobakterien-Protein zu vermeiden. Außerdem hat es geringere Nebenwirkungen.

Aufgrund der Tierschutzgesetzgebung ist in Deutschland die Notwendigkeit des Einsatzes ölhaltiger Adjuvantien zu begründen. Bei der Aufstellung des Immunisierungsprotokolls sollte deshalb in jedem Fall überlegt werden, ob

- der Einsatz eines Adjuvans überhaupt notwendig ist und
- ob ein alternatives Adjuvans, das keine Bakterien enthält bzw. frei von Mineralöl ist (oder zumindest ein sehr reines Mineralöl mit geringer Reizwirkung enthält), verwendet werden kann.

### Sicherheitshinweise für den Umgang mit KFA

Bei der Herstellung und Immunisierung nur sterile Spritzen und Kanülen mit luer-lock-Anschluß benutzen! Nadeln und Kanülen niemals wiederverwenden. (Sonderbehälter!). Erfahrungsgemäß besteht hohe Verletzungsgefahr. Bei Verwendung ölhaltiger Adjuvantien wird das Tragen von Schutzkleidung und Schutzbrille empfohlen. In Großbritannien wurden zwischen 1989 - 1994 elf Zwischenfälle durch Selbsinjektion mit mineralöhlhaltigen Adjuvantien beschrieben, die chirurgische Behandlungen bis hin zur Fingeramputation zur Folge hatten.

**3. Alternativen zu Freundes Adjuvans:** Es existieren mehrere Alternativen zu Freundes Adjuvans mit deutlich geringeren Nebenwirkungen, die allerdings nicht für alle Antigene gleich gut geeignet sind. In vielen Fällen bieten sie jedoch einen Ersatz für Freundes Adjuvans.

Derartige kommerziell erhältliche Adjuvantien enthalten z.B. Substanzen, die von Bestandteilen des KFA abgeleitet sind. So wurden ganze Mykobakterien durch ihre Zellwandbestandteile bzw. Muramylpeptid (MDP) ersetzt. MDP ist sehr gut verträglich und verursacht im Gegensatz zu größeren Bestandteilen von Mykobakterien kaum Nebenwirkungen. Andere Inhaltsstoffe mit Adjuvanswirkung aus Mykobakterien, aber auch aus Corynebakterien und Nocardien, sind Trehalose-Diester (Trehalose Dimycolat, TDM), ebenfalls mit geringer Nebenwirkung. Ein Depoteffekt wird durch Verwendung von metabolisierbarem Öl anstelle des Mineralöls erreicht. Manche Adjuvantien verwenden Lipopeptide aus der Zellwand gramnegativer Bakterien, die sich auch gut zur Bindung an schwach immunogene Antigene eignen, um ihre Immunogenität zu verstärken. Das für den Einsatz in der Humanmedizin als Adjuvans verwendete Aluminiumhydroxyd besitzt zwar kaum Nebenwirkungen, ist aber wegen seiner schwachen immunstimulierenden Wirkung für die meisten Antigene nicht zu empfehlen.

Der hauptsächliche Nachteil der „alternativen Adjuvantien“ besteht darin, daß über ihre Anwendung - verglichen mit dem KFA - bisher noch zu wenig Erfahrung besteht.

Eine Übersicht über kommerziell erhältliche Adjuvantien enthält Tab. 1

**4. Herstellung einer Adjuvans/Antigen-Emulsion:** Wenn KFA benutzt wird, sollten die enthaltenen Bakterien vor der Präparation durch Vortexen aufgemischt werden. In der Regel wird ein Teil des ölhaltigen Adjuvans pro Teil wässriger Antigenphase eingesetzt. Zwei sterile (Glas-)spritzen mit luer-lock-Ansatz, von denen eine das Adjuvans und die andere das Antigen enthält, werden mit einem Zweibegehahn verbunden. Die Emulsion wird so lange (mehrere Minuten) hin- und zurückgepreßt, bis sie dick geworden und schwer zu spritzen ist und sich auch durch längeres Stehenlassen nicht mehr trennt.

### III. Applikation

Ein anderer Faktor, der sowohl Qualität und Menge der gebildeten Antikörper als auch die Belastung für das Tier beeinflussen kann, ist das Applikationsschema. Bei depotbildenden Adjuvantien wie z. B. Freundes Adjuvans bewirkt eine einmalige subkutane oder intradermale Injektion normalerweise eine gute, lang anhaltende Immunantwort. Häufige Wiederholungsinjektionen bringen keinen wesentlichen Vorteil. Eine Boosterinjektion führt nur dann zum gewünschten Effekt, wenn die Immunantwort ein Plateau erreicht hat (Titerkontrolle vornehmen!). Das ist zum Beispiel bei Freundes Adjuvans frühestens 4 Wochen nach der Erstinjektion der Fall. Frühere Boosterinjektionen bringen keine Steigerung der Immunantwort, sondern belasten nur das Tier.

Auch in Abhängigkeit von dem Applikationsweg können mehr oder weniger starke Belastungen für die Tiere auftreten. Bei löslichen Antigenen ist eine steigende Antikörperstimulation von der intravenösen über die in-

tramuskuläre, subkutane, intradermale, intraartikuläre zur intranodalen Applikation zu erwarten. In ähnlicher Reihenfolge wie die Antikörperstimulation nehmen allerdings auch die Belastungen für die Tiere zu. Daher sollten zum Beispiel auch die Immunogenität des Antigens, die Wahl des Adjuvans und andere Faktoren bei der Auswahl eines Applikationsweges mit berücksichtigt werden. Bei löslichen Antigenen lassen sich in der Regel mit subkutanen, intradermalen oder intramuskulären Injektionen gute Antikörpertiter erzeugen, die intramuskuläre Applikation ruft keine vergleichsweise bessere Immunreaktion hervor. Andere Applikationswege wie foot pad, intraartikulär oder intranodal bringen keine wesentlichen Vor-teile und müssen daher, insbesondere bei Verwendung von Freund's

Adjuvans, wegen der starken Nebenwirkungen als Routineverfahren abgelehnt werden. Die bei subkutanen Injektionen von Freund's Adjuvans häufig auftretenden sterilen Abszesse und Gewebnekrosen können weitestgehend vermieden werden, wenn die subkutan injizierte Menge 0,1 ml nicht überschreitet.

Angaben über das Vorgehen bei der **Immunisierung von Hühnern** sowie über die tierschutzgerechte **Blutentnahme** sind den TVT- Merkblättern „Gewinnung von Antikörpern aus dem Hühnerer“ bzw. „Hinweise zur Blutentnahme bei kleinen Versuchstieren“ zu entnehmen (erhältlich bei der Geschäftsstelle der TVT, siehe Impressum).

## Tabellen

**Tabelle 1**                      **Zusammensetzung einiger kommerziell erhältlicher Adjuvantien**

Adjuvans	Einzel-Bestandteile	Bemerkungen
Freund'sches Adjuvans (inkomplett)	Mannose Monooleat + Paraffinöl	Öl-Adjuvans
Freund'sches Adjuvans (komplett)	Mannose Monooleat + Paraffinöl + <i>Mycobacterium butyricum</i> oder <i>M. tuberculosis</i>	Öl-Adjuvans , toxisch
Gerbu-Adjuvans®	GMDP + DDA + Zink-L-Prolinat	Keine Emulsifizierung notwendig
Hunter´s TiterMax®	Block-Kopolymer (CRL89-41) + mikro-partikulärer Stabilisator + Squalen	Öl-Adjuvans , vergleichsweise teuer
Pam <sub>3</sub> Cys-Ser-Lys <sub>1</sub> -OH	Lipohexapeptid	
Ribi´s Adjuvant System	CWS + MPL + Squalen + TDCM+ Tween 80 + Wasser	Öl-in-Wasser Emulsion (metabolisierbares Öl)
Specol	Marcol 52 (Mineralöl, Paraffine)+ Span 85 + Tween 85	Öl-Adjuvans

### Abkürzungen:

GMPD: N-Acetylglucosaminyl-(β,1-4)-N-acetylmuraminyl-L-alanyl-D-isoglutamin  
 DDA: Dimethyldioctadecylammoniumbromid  
 CWS: Zellwand-Skelett  
 MPL: Monophosphoryl Lipid A  
 TDCM: Trehalose-Dicorynomycolat

**Tabelle 2**                      **Maximales Volumen (ml) des Inokulums pro Injektionsstelle**

	iv	id	sc	im	ip
Maus	0,1	-	0,5	(0,01) <sup>a</sup>	1,0
Ratte	0,5	0,05	1,0	0,1	5
Meerschweinchen	1,0	0,05	2,0	0,1	10
Kaninchen	5	0,05	1,5	0,5	20 <sup>a</sup>
Schaf/Ziege/Rind	c	0,1	1-5	3/20	50 <sup>a</sup> ml/kg
Huhn	1,0	-	1,0 <sup>b</sup>	0,5	-

iv: intravenös; id: intradermal; sc: subkutan; im: intramuskulär; ip: intraperitoneal

a: dieser Applikationsweg wird aus Tierschutzgründen nicht empfohlen

b: im Halsbereich

c: die erheblichen Gewichtsunterschiede erlauben keine Maximalwert-Festlegung

**Tabelle 3 Immunisierungsschema für lösliche Antigene (Beispiel)**

Tag 1	100 µg Antigen s.c. in Adjuvans-Mischung
Tag 28	100 µg Antigen s.c. in Adjuvans-Mischung
Blutentnahme	ca. 10 Tage später
Bei Bedarf (ungenügender Titer):	100 µg Antigen gelöst in PBS i.v.

**Tabelle 4 Maximales Volumen [ml] des Inokulums pro Injektionsstelle, wenn KFA oder anderes öl- und bakterienhaltiges Adjuvans benutzt wird (Antigen : KFA = 1:1)**

	id	sc	im	ip
Maus	-	0,1	-	0,2*
Ratte	-	0,1	-	0,2*
Meerschweinchen	0,05	0,1	-	-
Kaninchen	0,05	0,1	0,5	-
Schaf/Ziege/Rind	0,05	0,1	1	-
Huhn	-	0,1	0,5	-

id: intradermal; sc: subkutan; im: intramuskulär; ip: intraperitoneal

\*:nur bei Induktion einer Autoimmun-Erkrankung oder bei Immunisierung mit nativem Protein

**Tabelle 5 Vorläufige Klassifizierung der Beeinträchtigung von Versuchstieren bei häufig benutzten Kombinationen von Adjuvantien und Immunisierungswegen<sup>1</sup>**

Schwache Beeinträchtigung	Mittlere Beeinträchtigung	(Sehr) Starke Beeinträchtigung
		KFA: fp, im, id, sc, ip
		Mikrobielle Produkte: fp, im, id, sc, ip
	IFA: im, id, sc, ip	IFA: fp
Alum: iv, ip, sc	Alum: im, id	Alum: fp, is
DDA: iv, ip, sc	DDA: im, id	DDA: fp, is
ISCOM: sc	ISCOM: im, id	ISCOM: fp, is, iv, ip
Liposomen: iv, ip, sc	Liposomen: im, id	Liposomen: fp, is
	NBP: ip, sc	NBP: im, id
	Saponin: im, id	Saponin: fp, is, iv, ip
Specol: iv, ip, sc	Specol: im, id	Specol: fp, is
	Synthetische Lipopeptide: im, id, iv, ip, sc	
Inerte Transporter: sc	Inerte Transporter: im, id	Inerte Transporter: fp, is
	Zytokine <sup>2</sup>	

<sup>1</sup> Der Immunisierungsweg allein bestimmt oft die Beeinträchtigung, die beim immunisierten Versuchstier hervorgerufen wird:

(sehr) stark: fp, is

mittel: im, id

schwach: iv, ip, sc

<sup>2</sup> Oder deren Peptid-Derivate

Kommerziell erhältliche Adjuvantien enthalten oft mehrere verschiedene Komponenten und sollten deshalb immer unter „sehr starke Beeinträchtigungen“ eingestuft werden, es sei denn, sie seien davon ausdrücklich ausgenommen.

fp: foot pad; is: intrasplenal; iv: intravenös; id: intradermal; sc: subkutan; im: intramuskulär; ip: intraperitoneal

**Literaturhinweise**

CCAC/Canadian Council on Animal Care (1991): CCAC guidelines on acceptable immunologic procedures, Ottawa (Ontario) Canada.

Grumstropp-Scott, J. und Greenhouse, D.D. (1988): NIH intramural recommendations for the research use of Freund's adjuvant. ILAR News 30, 9.

Jackson, L. R. und Fox, J.G. (1995): Institutional policies and guidelines on adjuvants and antibody production. ILAR Journal 37, 141-152.

VPHIN Veterinary Public Health Inspectorate (1993): Code of Practise for the immunisation of laboratory animals Rijswijk, The Netherlands.

**Weitere Literatur kann bei den Verfassern dieses Merkblatts erfragt werden.**

*Dieses Merkblatt wurde erarbeitet vom Arbeitskreis 4 (Tierversuche) der Tierärztlichen Vereinigung für Tierschutz (Stand: Februar 1997).*

**Werden Sie Mitglied der Tierärztlichen Vereinigung für Tierschutz e.V.**

*Die Tierärztliche Vereinigung für Tierschutz wurde im Jahre 1985 gegründet, um der Schutzbedürftigkeit des Tieres in allen Bereichen und Belangen Rechnung zu tragen. Gerade der Tierarzt mit seinem besonderen Sachverstand und seiner Tierbezogenheit ist gefordert, wenn es gilt, Tierschutzaufgaben kompetent wahrzunehmen. Dieses geschieht in Arbeitskreisen der TVT, die zu speziellen Fragenkomplexen Stellung nehmen.*

*Jede Tierärztin und jeder Tierarzt sowie alle immatrikulierten Studenten der Veterinärmedizin können Mitglied werden. Der Mitgliedsbeitrag beträgt zur Zeit 60,00 DM jährlich. Insbesondere für Studenten kann auf Antrag Ermäßigung gewährt werden.*

*Durch Ihren Beitritt stärken Sie die Arbeit der TVT und damit das Ansehen der Tierärzte als Tierschützer. Unser Leitspruch lautet: „Im Zweifel für das Tier.“*

*Weitere Informationen und ein Beitrittsformular erhalten Sie bei der*

*Geschäftsstelle der TVT*

*Dr. Christine Kimpfel-Neumaier*

*Ittisstieg 5*

*Telefon und Fax: (0 40) 6 43 04 25*