

Aus der Klinik für Pferdekrankheiten, Allgemeine Chirurgie und Radiologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Entwicklung eines Schnelltestsystems zum Nachweis von
Equinen Antikörpern (IgG) gegen Tetanus**

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Mareike Stelzmann

Tierärztin aus Wolfenbüttel

Berlin 2011

Journal-Nr.: 3435

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. A. Grabner
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. L. H. Wieler
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. B. Kohn

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Clostridium tetani, tetanus, diagnostic techniques, antibody testing,
ELISA, rapid methods

Tag der Promotion: 29.03.2011

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-000-3

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2011

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Coverbild vorne © Ronny Nöller - Fotolia.com

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2011

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Literatur	3
2.1.	Ätiologie des Tetanus	3
2.2.	Epidemiologie und Pathogenese des Tetanus	4
2.3.	Klinik des Tetanus	8
2.4.	Diagnose und Differenzialdiagnose bei Tetanus	12
2.5.	Therapie bei Tetanus	13
2.6.	Immunologie	14
	2.6.1. Antikörper oder Immunglobuline	16
	2.6.2. Ausbildung des Immunsystems beim Neonaten	18
	2.6.3. Impfung gegen Tetanus	21
2.7.	Konzentrationsangaben für Tetanusantitoxin und Tetanustoxoid	26
2.8.	Möglichkeiten zum Nachweis von Tetanusantitoxin (Diagnostik)	27
	2.8.1. <i>In vivo</i> -Nachweis	27
	2.8.2. <i>In vitro</i> -Nachweis	29
	2.8.2.1. Passive Hämagglutination	31
	2.8.2.2. Enzyme Linked Immunosorbent Assay	32
	2.8.2.3. Toxinbindungsinhibitionstest	33
	2.8.2.4. Radioimmunoassay	34
	2.8.2.5. Schnelltests	34
3.	Material und Methoden	37
3.1.	Material	37
	3.1.1. Material für ELISA	37
	3.1.1.1. Prüf- und Referenzseren	37
	3.1.1.2. Lösungen	39
	3.1.1.3. Puffer	39
	3.1.1.4. Laborgeräte/-technik	41
	3.1.2. Material für den Prototyp „Schnelltest“	42
	3.1.2.1. Prüf- und Referenzseren	42

3.1.2.2. Lösungen	43
3.1.2.3. Puffer	43
3.1.2.4. Laborgeräte/-technik	45
3.1.3. Material für Feldversuche	46
3.1.3.1. Impfstoff	46
3.1.3.2. Pferde- und Mäuseseren	46
3.2. Methoden	51
3.2.1. Entwicklung, Optimierung und Validierung eines ELISA	51
3.2.2. Entwicklung, Optimierung und Validierung des Prototyps „Schnelltest“	55
3.2.2.1. Durchflussverfahren	56
3.2.2.2. Entwicklung des Prototyps „Schnelltest“	58
3.2.3. Prüfung auf Kreuzreaktionen	62
3.2.4. Statistische Auswertung	65
4. Ergebnisse	66
4.1. Ergebnisse Labormethode	66
4.1.1. ELISA	66
4.1.2. Prototyp „Schnelltest“	69
4.2. Ergebnisse der Serentestung mit dem Prototyp „Schnelltest“	79
4.3. Vergleich der Ergebnisse von ELISA und dem Prototyp „Schnelltest“	90
5. Diskussion	93
5.1. Bewertung des entwickelten Prototyps „Schnelltest“	93
5.2. Beurteilung der Handhabung im Feld	99
5.3. Bewertung der Felduntersuchungen	101
6. Zusammenfassung	111
7. Summary	113
8. Literaturverzeichnis	115

9.	Anhang	129
9.1.	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	129
9.2.	Datentabellen	131
	Danksagung	140
	Selbstständigkeitserklärung	141

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
<i>a.p.</i>	<i>ante partum</i>
c	Konzentration
Ca ²⁺	ionisiertes Calcium
CD4/ CD8	Cluster of differentiation
CD1-Mäuse	Charles-River-Wiga Mäuse (Labormäuse)
Chi ²	Signifikanz
°C	Grad Celsius
dl	Deziliter
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EC50	Wendepunkt
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
Fa.	Firma
fzmb	Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie GmbH
GABA	γ-Aminobuttersäure
h	Stunde
HA	Passive Hämagglutination
HCl	Salzsäure
H ₂ O	Wasser
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
IE	Internationale Einheit
Ig	Immunglobulin / Antikörper
IL	Interleukin
IU	International Unit
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Lf	Ausflockungseinheit
M	Molar
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)

min.	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MPa	Megapascal
MW	Mittelwert
µm	Mikrometer
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NaHCO ₃	Natriumbicarbonat
Na ₂ HPO ₄	Di-Natriumhydrogenphosphat
NIBSC	National Institute for Biological Standards and Control
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
NSF	N-Ethylmaleinamid sensitive Fusionsproteine
OD	Optische Dichte
OIE	World Organisation for Animal Health
PD ₅₀	Paralytische Dosis
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität
4PL	4-Parameter-Formel
<i>p.p.</i>	<i>post partum</i>
R ²	Bestimmtheitsmaß
RIA	Radioimmunoassay
SF	Extrempunkt
SI	Système Internationale d'unités (International gültiges Einheitensystem)
SNAP	lösliche NSF-Attachement-Proteine
SNARE	SNAP-Rezeptor
SNT	Serumneutralisationstest
STABW	Standardabweichung
TeNT	Tetanospasmin
Th	T-Helferzelle
ToBI	Toxinbindungsinhibitionstest
UV	Ultraviolett

Vk	Variationskoeffizient
well	Kavität
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentrales Nervensystem
%	Prozent
§	Paragraph

Entwicklung eines Schnelltestsystems zum Nachweis von Equinen Antikörpern (IgG) gegen Tetanus

1. Einleitung

Auch in der heutigen Zeit werden immer wieder an Tetanus erkrankte Pferde als Patienten vorstellig. Häufig wurde die Impfung vom Tierhalter vergessen oder eingespart.

Zum einen scheint einigen Pferdehaltern das hohe Infektionsrisiko durch die ubiquitär vorkommende Sporenform von *Clostridium tetani* nicht bewusst zu sein. Zum anderen scheint nicht allgemein bekannt zu sein, dass die einzige wirksame Bekämpfung des Wundstarrkrampfes die vorbeugende Schutzimpfung ist.

So ist in Deutschland die Impfung für Pferde bis vor kurzem nur in der Leistungsprüfungsordnung von 2008 durch die Deutsche Reiterliche Vereinigung reglementiert worden. Diese schreibt alleinig eine regelmäßige Impfung gegen die Pferdeinfluenza für alle an Wettbewerben oder Leistungsprüfungen teilnehmenden Pferde vor (FN, 2008). In den Leitlinien zur Beurteilung von Pferdehaltungen unter Tierschutzgesichtspunkten vom 9.6.2009 wird eine Impfeempfehlung für Pferde gegen Tetanus ausgesprochen. Darin wird die besondere Empfänglichkeit des Pferdes für Tetanus und das sich daraus ergebende Gebot der Schutzimpfung aus Tierschutzsicht betont (BMELV, 2009).

Gerade vor operativen Eingriffen oder auch bei Verletzungen ist es für den Tierarzt unerlässlich, den Immunstatus des Pferdes bezüglich schützender Tetanusantikörper zu kennen. Fehlerhafte Aussagen zur Tetanusimpfung können dazu führen, dass Patienten entweder gar nicht oder unnötig zusätzlich geimpft werden.

Einhufer sind am empfänglichsten für die Infektion mit *Clostridium tetani*. Die Heilungschancen von erkrankten adulten Pferden liegen bei unter 30% (VAN GALEN et al., 2008). Bei Fohlen liegt die Mortalität sogar bei 80-100%.

In der Humanmedizin sind Schnelltests zum Nachweis von Tetanus-Antikörpern von unterschiedlichen Anbietern erhältlich.

Die Aufgabenstellung dieser Dissertation ist die Etablierung eines Schnelltestsystems, das die Antikörperkonzentration (IgG-Gehalt) gegen Tetanus bei Equiden detektiert. Die IgG-Bestimmung soll in weniger als einer Stunde mit möglichst geringem Aufwand vom Tierarzt direkt vor Ort durchgeführt werden können.

Als Bewertungsmaßstab für den Prototyp „Schnelltest“ wird der indirekte ELISA dienen. Entscheidend wird vor allem sein, ob der Prototyp „Schnelltest“ trotz seiner Schnelligkeit ähnliche Werte für die Sensitivität, Spezifität und den Cut off wie der ELISA erreichen kann. Der Cut off gibt den Grenzwert wieder, der ein Testergebnis als positiv oder negativ beurteilt. Der Cut off liegt beim Serumneutralisationstest, dem Goldstandard, bei 0,01 IE/ml. Bei dem ELISA liegt der Cut off bei 0,1 IE/ml. Ähnliche Werte sollten vom Schnelltest ebenfalls erreicht werden.

2. Literatur

2.1. Ätiologie des Tetanus

Clostridien gehören wie die Gattungen *Bacillus* und *Paenibacillus* zu den sporenbildenden Stäbchen. Sie stellen die Gruppe der Gram-positiven Bakterien dar, die sich durch die Bildung von Endosporen auszeichnen (SELBITZ, 2002). Die Sporen lassen den Bakterienzellkörper spindelförmig erscheinen (*kloster*, griech. = Spindel).

Zu der Gattung der Clostridien werden über 100 Spezies gezählt. Sie werden aufgrund phänotypischer Unterschiede (Gelatineverflüssigung, Sporenlagerung, Wuchsformen auf verschiedenen Nährböden) in verschiedene Gruppen eingeteilt.

Clostridium tetani ist ein Gram-positives, Sporenbildendes Stäbchenbakterium. Die Größe des schlanken Stäbchens beträgt $2,4-5 \times 0,5-1,1 \mu\text{m}$. *Clostridium tetani* ist rundum mit Geißeln besetzt, die der Fortbewegung dienen. Sauerstoffzufuhr kann die Beweglichkeit des Bakteriums einschränken (LINDNER, 1971).

Clostridium tetani bildet in der versporteten Form eine endständige Spore ohne Zelleibauftreibung aus. Diese Ausprägung ist verantwortlich für die häufig beschriebene Trommelschlägerform des versporteten Bakteriums. Die optimalen Wachstumsbedingungen findet *Clostridium tetani* bei 37°C in anaerobem Milieu. Sein Wachstum wird zusätzlich durch Begleitkeime wie *Escherichia coli* und Staphylokokken begünstigt, die als Sauerstoffkonsumenten die Bildung eines anaeroben Milieus fördern.

Clostridium tetani wächst auf Blutagar mit zartem, rasenförmigem Wachstum. Die Ausläufer können hämolysierende Einzelkolonien bilden. Die biochemische Leistung von *Clostridium tetani* beschränkt sich auf die Schwefelwasserstoffbildung, Milchgerinnung und die positive Indolreaktion (GUGLICK et al., 1995).

In versporteter Form sind die Clostridien weitestgehend gegen Hitze, Austrocknung und chemische Einwirkung tenazid. Eine Inaktivierung der Sporen gelingt nur bei einem Druck von 400 MPa für 10-30 Minuten und bei einer Temperatur von $70-110^\circ\text{C}$.

Bei einer feuchten Hitze von 100°C lässt sich die versportete Form von *Clostridium tetani* stammabhängig erst nach Stunden neutralisieren; bei einer trockenen Hitze von 150°C gelingt dies schon nach einer Stunde (BRANDIS et al., 1994). Aus diesem Grund werden Clostridiumsporen auch als Dauerformen bezeichnet. So wird vor allem in Gebieten mit

Botulismus befürchtet, dass der einmal kontaminierte Boden über Jahrzehnte hinweg ein Infektionsrisiko für Tier und Mensch darstellt (BÖHNEL und GESSLER, 2010).

Die Anzucht von *Clostridium tetani* im Labor stellt sich als sehr schwierig dar (www.onmeda.de).

2.2. Epidemiologie und Pathogenese des Tetanus

Bei *Clostridium tetani* handelt es sich um ein ubiquitär vorkommendes Bodenbakterium. Es ist physiologischerweise im Darm und in den Exkrementen von Säugetieren zu finden. Daraus resultiert, dass seine Sporen gehäuft in mit Exkrementen gedüngten Böden zu finden sind. Das Bakterium kann unter anaeroben Bedingungen in den oberen Bodenschichten jahrelang in seiner verspornten Form überdauern. Eine wiederholte Düngung kann zu einer Keimanreicherung führen. Wird von diesen kontaminierten Flächen Futter gewonnen, so sind die Clostridiensporen dann auch im Futter nachzuweisen (BÖHNEL et al., 2003). Dies kann neben den Ausscheidungen der Tiere im Stall zu einer zusätzlichen Keimbelastung führen.

Grundsätzlich sind alle Säugetiere für die Erkrankung empfänglich. Am empfindlichsten sind die Einhufer, gefolgt von den kleinen Wiederkäuern, den Rindern, Schweinen und Carnivoren. So sind Hunde 600-mal unempfindlicher als Pferde. Katzen sind 10-mal unempfindlicher als Hunde (SPROTT, 2008). Vögel sind weitestgehend resistent (SELBITZ, 2002). Die Empfindlichkeit des Menschen gegenüber *Clostridium tetani* ist zwischen der der Einhufer und der der kleinen Wiederkäuer einzuordnen.

Es sind vier Wege der Infektion mit *Clostridium tetani* bekannt:

Wundinfektion:

Die Wundinfektion stellt für das Pferd die häufigste Infektionsquelle dar. Zumeist handelt es sich um Bagatellverletzungen, die von dem Besitzer sogar unbemerkt bleiben.

Der Erreger selbst bleibt hier auf den Wundbereich beschränkt. Das häufig anaerobe Milieu von Wunden trägt zur Erregervermehrung bei. Die gebildeten Toxine gelangen über den neurogenen oder hämatogenen Weg ins ZNS.

Infektion über die geschädigte Darmwand:

Werden in der Darmwand durch Darmparasiten oder auch durch Fremdkörper Mikroläsionen gesetzt, können die im Darm physiologischerweise vorkommenden Clostridien den Darm verlassen und ebenfalls eine Infektion hervorrufen.

Idiopathischer oder kryptogener Tetanus:

Hier sind Sporen auf hämatogenem Weg in Organe wie Milz und Leber gelangt. Erst in den Organen beginnen die Sporen auszukeimen.

Neonataler Tetanus:

Diese Form des Tetanus betrifft vor allem Neugeborene, deren Mütter keinen ausreichenden Impfschutz haben und deren Nabelschnur bei der Geburt nicht steril abgebunden wurde.

Vor allem in Afrika und Asien stellt diese Form der Infektion die häufigste Ursache für den humanen Tetanus dar.

Bei Fohlen mit mangelndem Immunschutz kann die ungenügende Nabelhygiene eine Tetanuserkrankung zur Folge haben.

Das Krankheitsbild des Tetanus wird von einem Neurotoxin hervorgerufen. Somit kann Tetanus zu den Toxininfektionen gezählt werden. Tetanus ist eine Einzeltiererkrankung, der das Merkmal der Kontagiosität fehlt.

Clostridium tetani bildet die Toxine Tetanolysin und Tetanospasmin. Neben ihm existieren auch nichttoxinbildende Stämme.

Das Tetanolysin hat hämolysierende und kardiotoxische Wirkung, ist aber für die Klinik des Tetanus unbedeutend (TURILLAZZI et al., 2009).

Für das Krankheitsbild verantwortlich ist das Tetanospasmin (TeNT). Die letale Dosis für den Menschen wird mit kleiner als 2,5 ng/kg angegeben (BORROW et al., 2006).

Zum Vergleich: Für Phenobarbital, enthalten in Eutha77®, wird die akute Toxizität mit 100.000 µg/kg angegeben (FORTH et al., 1983). Das Tetanospasmin ist nach dem Botulinumtoxin die zweitgiftigste Substanz auf der Erde (REDLI, 2006).

Das Tetanusneurotoxin ist plasmidcodiert. Die extrachromosomale DNS liegt doppelsträngig in Form von freien Plasmiden im Zytoplasma vor. Auf Plasmiden sind zusätzliche Informationen der Bakterien gespeichert, die sich autonom replizieren. Ebenfalls auf dem Plasmid sind die Gene des Transkriptionsregulators codiert, sowie die weiteren Virulenzfaktoren (ROSSKOPF, 2007). Das Tetanusneurotoxin besitzt ein Gewicht von 150

kDa. Es besteht, wie viele andere Toxine auch, aus einer schweren (100 kDa) und einer leichten Kette (50 kDa). Über die schwere Kette kann es an die Nervenzellen binden. Die leichte Kette beinhaltet den toxischen Anteil.

Über enzymatische Aufspaltung kann das Toxin in seine Polypeptidabschnitte aufgetrennt werden. Dabei werden die Fragmente „Iic“ und „Ibc“ isoliert. Das Fragment „Iic“ beinhaltet die Hälfte der schweren Kette. Das Fragment „Ibc“ stellt die andere Hälfte der schweren Kette und die leichte Kette dar (VOLK et al., 1984).

Gleichzeitig kann das Tetanustoxin mit vier antigendeterminierenden Untergruppen beschrieben werden: alpha, beta-1, beta-2, gamma (MATSUDA et al., 1983).

Die Ausbreitung des Toxins kann unterschiedliche Wege beschreiten (BAKER et al., 1986):

- 1) Das Toxin dringt direkt in die motorischen Endplatten der Axone ein, die der Wunde am nächsten sind. Von hier aus kann es retrograd in das Rückenmark (lokalisierter Tetanus) und dann in das Gehirn (generalisierter Tetanus) wandern.
- 2) Das Toxin gelangt in geringen Mengen direkt über die intakte Blut-Hirn-Schranke in das Gehirn (generalisierter Tetanus).
- 3) Ist die Toxinmenge hoch genug, bindet es auch an periphere Nervenendigungen über hämatogenem Weg. Die Ausbreitung des Toxins verläuft über die motorischen, dann über die sensorischen und letztendlich über die autonomen Nerven (COOK et al., 2001).

Das klinische Erscheinungsbild der Tetanuserkrankung kann in unterschiedlichen Ausprägungen auftreten:

- 1) Bei dem generalisierten Tetanus ist der ganze Körper betroffen. Beim Einhufer stellt er die häufigste Form dar.
- 2) Beim lokalisierten Tetanus ist die Toxinwirkung auf bestimmte Körperbereiche begrenzt.

- 3) Der cephale Tetanus tritt sehr selten auf. Er stellt eine Form des lokalen Tetanus dar. In der Literatur wurde vor 20 Jahren von einem Fall von humanem cephalen Tetanus berichtet. Hier erfolgte die Infektion über eine Wunde im Bereich der Orbita. Klinisch fielen eine Dysfunktion der Kopfnerven und der Trismus auf (GUYENNET et al., 2009).

Die retrograde Ausbreitungsgeschwindigkeit des Toxins beträgt 5 mm pro Stunde (KOLBE und CLOUGH, 1999).

Von der Toxinwirkung sind ausschließlich chemische Synapsen betroffen:

Die chemischen Synapsen setzen sich zusammen aus einem präsynaptischen Axonteil, einem synaptischen Spalt der Effektorzelle und der postsynaptischen Membran der Zielzelle. Erfolgt eine Depolarisation des präsynaptischen Axonteils, wird durch eine Ca^{2+} -Freisetzung die Verschmelzung der präsynaptischen Vesikel des Axonteils mit der präsynaptischen Membran induziert. Sie entlassen einen Neurotransmitter in den synaptischen Spalt, wo dieser an die entsprechenden Rezeptoren der postsynaptischen Membran bindet.

Ein Komplex aus den Vesikelproteinen (Synaptobrevin und Synaptotagmin), den Plasmaproteinen (Syntaxin, SNAP-25 und Neurexin) und den cytoplasmatischen Proteinen (NSF-Anheftungsproteine) ermöglicht das Verschmelzen der Vesikel mit der Membran (SNARE-Hypothese) (SZENTKUTI und EHRLEIN, 2000).

TeNT bindet über die Ganglioside GD_{1b} und GT_{1b} der lokalen Nervenendigungen an die neuronale Membran. Sie sind vor allem in der grauen Substanz des Rückenmarks lokalisiert (COOK et al., 2001). Bei einem generalisierten Tetanus ist die graue Substanz im Kleinhirn betroffen (COCO et al., 1999). TeNT gelangt retrograd entlang des Axons in das ZNS. Die leichte Kette des TeNT wirkt als Zinkproteinase im Zytosol von Interneuronen, die die Aktivität der inhibitorischen Motoneuronen regulieren (TURTON et al., 2002). Durch die proteolytische Spaltung der SNARE-Rezeptoren durch die Zinkproteinase wird die Exocytose von synaptischen Vesikeln verhindert (BLASI et al., 1993). Die Ausschüttung der inhibitorischen Neurotransmitter Glycin und GABA wird unterbunden (MADIGAN und MARTINKO, 2006).

Es entsteht das für Tetanus typische Bild der spastischen Paralyse.

2.3. Klinik des Tetanus

Die Inkubationszeit gestaltet sich variabel. Zum einen ist sie abhängig von der Lokalisation der Eintrittspforte. Zusätzlich ist die Menge der in die Wunde gelangenden Clostridien bzw. die von ihnen produzierte Toxinmenge und der Immunstatus des Tieres entscheidend für den klinischen Verlauf. Eine kürzere Inkubation (höhere Toxinmenge) hat eine ungünstigere Prognose.

Es können sich folgenden Grade eines Tetanus ausbilden (THEIN, 2009):

Klinischer Tetanus: Patienten ohne Impfschutz erfahren eine Toxinproduktion. Sie zeigen einen klinisch manifesten Tetanus.

Subklinischer Tetanus: Geringer Toxinkontakt, der nicht zur vollen Ausprägung klinischer Symptome führt, aber das Immunsystem aktiviert.

Kein klinischer Tetanus: Das Tier hat durch eine Schutzimpfung genügend tetanusspezifische Antikörper, um das Antigen zu neutralisieren.

Equiden

Allgemein ist die Inkubationszeit beim Fohlen kürzer als beim adulten Equiden.

Gekennzeichnet ist die Klinik von der Tonuserhöhung der Muskulatur. Je nach Toxinmenge können dabei alle Muskeln betroffen sein (generalisierter Tetanus) oder auch nur einzelne Muskelgruppen (lokalisierter Tetanus).

Erkrankte Equiden fallen anfangs durch gesteigerte Erregbarkeit und Schreckhaftigkeit auf. Der Spasmus der Muskulatur beginnt im Kopfbereich und breitet sich kaudal aus. Durch die Verkrampfung der Nacken- und Kopfmuskulatur kommt es zu einer starren, gestreckten Kopf-Hals-Haltung. Das Ohrenspiel ist beeinträchtigt, die Ohren sind steil aufgerichtet. Die Symptomatik der Tetanuserkrankung findet zuerst im Kopfbereich ihre Ausprägung, weil die motorischen Nerven im Gehirnstamm sehr kurz sind. So werden die Gehirnnerven sehr früh betroffen und verursachen Muskelspasmen im Bereich der durch sie versorgten Muskulatur.

Typisch sind vor allem der Nickhautvorfall sowie Trismus, Schluck- und Kaubeschwerden. Wird mit dem Handrücken gegen den unteren Teil des Unterkiefers geschlagen, kann die

Nickhaut sichtbar werden. Der Vorgang kann als diagnostischer Hinweis für einen Tetanus gewertet werden (STRAITON, 1992).

Im weiteren Verlauf nehmen die Tiere eine Sägebockstellung ein. Dabei wird die Hinterhand nach hinten abgestellt, die Sprunggelenke sind nach außen gerichtet und häufig wird der Schweif aufgestellt. Dadurch erscheint die Bauchmuskulatur aufgeschürzt. In diesem Stadium kann die Halsmuskulatur so angespannt sein, dass sich ein Opisthotonus entwickelt. Dabei ist der Hals aufwärts gebogen, die Drosselrinne tritt deutlich hervor. Es kommt zum Sistieren von Harn- und Kotabsatz. Die erkrankten Pferde zeigen insgesamt eine erhöhte Reflexerregbarkeit. Licht-, Geräusch- und Berührungsreize können die Krampfstände verstärken.

Der Dauerkrampf der gesamten Muskulatur kann bis zum Festliegen des Tieres führen. Beim Niederstürzen besteht eine erhöhte Frakturgefahr.

Kurz vor dem Tod ist durch die ständige Muskelkontraktion ein Körpertemperaturanstieg zu beobachten, der sich auch nach dem Tod noch weiter fortsetzt. Der Tod tritt meist durch Lähmung der Atemmuskulatur ein. Bei einem generalisierten Tetanus tritt der Tod im Zeitraum von 3 Tagen bis zu 2 Wochen nach den ersten klinisch erkennbaren Symptomen ein. Bei einem günstigen Verlauf können die Symptome innerhalb einer Woche nachlassen. Unter intensiver Therapie kann nach 4-6 Wochen die Genesung eintreten (THEIN, 2009).

Die Mortalität liegt bei Fohlen zwischen 80-100%. Bei adulten Pferden liegen die Heilungschancen unter 30% (VAN GALEN et al., 2008).

Bei **kleinen und großen Wiederkäuern** bildet sich eine ähnliche Symptomatik aus. Zusätzlich zeigen erkrankte Wiederkäuer eine Vormagentympanie. Diese entsteht durch spasmische Kontraktionen von Schlund und Kardia. Beide sind mit quergestreifter Muskulatur ausgestattet. Da gleichzeitig die Pansenmotorik erhalten bleibt, ist ein Ruktus nicht mehr möglich. Das Pansenmilieu kippt vollständig, so dass die Pansenmikroben absterben (GASTEINER, 2009).

Die Eintrittspforten beim neugeborenen Kalb oder Lamm kann der Nabel sein. Aber auch die Enthornung, Schwanzamputation, Geburtshilfe oder Kastration können Auslöser sein. Eine Infektion kann auch über die Maulhöhle durch beispielsweise stachliges Futter oder beim Zahnwechsel entstehen. Bei Rindern, die mit Pferden auf einer Weide gehalten werden, wird eine Tetanuserkrankung häufiger beobachtet. Dies ist darin begründet, dass Pferde *Clostridium tetani* natürlicherweise in größerer Menge mit dem Kot ausscheiden.

70%-ige Heilungschancen werden eingeräumt, wenn es sich um frische Fälle handelt, die konsequent therapiert werden (STÖBER, 2002).

Bei gesicherter Diagnose und fortschreitendem Krankheitsstadium sind an Tetanus erkrankte Tiere tierschutzgerecht zu töten (GASTEINER, 2009).

Bei **Hund und Katze** sind zu Beginn einer Tetanuserkrankung ein steifer Gang, aufgerichtete Ohren und Rute und häufig das sardonische Grinsen zu beobachten. Normalerweise kommt es unter intensiver Therapie innerhalb einer Woche zu einer deutlichen Symptomverbesserung. Bei progressiven Symptomen ist die Prognose schlecht.

Bei der therapeutischen Gabe von Tetanusantitoxin ist zu berücksichtigen, dass Unverträglichkeitsreaktionen bis hin zum anaphylaktischen Schock auftreten können. Das Tetanusantitoxin basiert auf equiden Tetanusantikörpern. Vor der intravenösen Applikation sollte daher eine subkutane Testdosis gegeben werden. Außerdem sollte man das Antitoxin nur einmalig applizieren, um Unverträglichkeitsreaktionen zu vermeiden (WHEELER et al., 1994).

Beim **Schwein** tritt eine Tetanuserkrankung sehr selten auf. Vor allem nach der Ferkelkastration kann sie beobachtet werden. Erkrankte Tiere fallen durch einen steifen Gang auf. Die Muskeln sind verhärtet, die Ohren sind hoch aufgestellt und der Schwanz ist gestreckt. Im Endstadium kommt es zum Festliegen, wobei der Kopf und die Gliedmaßen steif vom Körper weggestreckt sind. Licht- und Lautreize lösen Streckkrämpfe aus. Ist dieses Stadium erreicht, endet die Krankheit immer tödlich für das Tier (EICH und SCHMIDT, 2004).

Erkrankte Schweine können ebenfalls mit Tetanusserum behandelt werden.

Vögel werden in der Literatur als weitestgehend immun gegen eine Tetanuserkrankung beschrieben (SELBITZ, 2002).

RUSSEL (1937) beschreibt einen Fall, in dem er annimmt, dass Tauben als Überträger von *Clostridium tetani* fungiert haben. Nachdem ein Kleinkind im Alter von 18 Monaten an der typischen Klinik eines Tetanus gestorben war, aber keine Verletzungen als Infektionsort mit *Clostridium tetani* gefunden werden konnten, wurde das Umfeld untersucht. Im Garten des Vaters wurde ein Taubenschlag gefunden. In genommenen Kotproben der Tauben konnten Sporen von *Clostridium tetani* isoliert werden. Vermutlich hatten die Tauben die Sporen über das Picken in Pferdekot aufgenommen und dann wieder ausgeschieden. Beim Spielen im Garten hat sich das Kleinkind wahrscheinlich über Mikroläsionen in der Haut mit den Sporen

im Taubenkot infiziert. Zum Impfstatus des Kindes wurde in dem Artikel keine Aussage getroffen, aber vermutlich war das Kind nicht gegen Tetanus geimpft.

Tetanus ist auch in der **Humanmedizin** nach wie vor eine gefürchtete Erkrankung.

Nach Schätzungen der WHO sterben jährlich weltweit über eine Million Menschen an Tetanus. Vor allem in Afrika und Asien, in feuchtwarmen Ländern mit einer niedrigen Impfrate und einer schlechten medizinischen Versorgung, erkranken viele Menschen. Es wird pro 100.000 Einwohner mit 10-50 Erkrankungen gerechnet (RKI, 2004).

Ein großes Problem stellt hier hauptsächlich der neonatale Tetanus dar. Schätzungen der WHO zufolge wird ein Viertel der Kindersterblichkeit durch Tetanus verursacht.

In Deutschland sind in den letzten Jahren weniger als 15 Tetanusfälle jährlich aufgetreten. Häufig handelte es sich bei den Erkrankten um ältere Menschen, die keinem regelmäßigen Impfregime unterlagen. Untersuchungen zufolge besitzen in den alten Bundesländern 70% der Frauen und 45% der Männer über 60 Jahren keinen ausreichenden Impfschutz gegen Tetanus. In den neuen Bundesländern sind es etwa 10% der über 60-Jährigen (DEUTSCHES GRÜNES KREUZ, 2010).

Der vom RKI empfohlene Impfkalender sieht im 2., 3., 4. und 11.-14. Lebensmonat jeweils eine Tetanusimpfung zum Aufbau einer ausreichenden Immunität vor. Mit dem 5.-6. Lebensjahr sollte die erste Auffrischung vorgenommen werden. Zwei weitere erfolgen im Alter zwischen 9-11 und 12-17 Jahren. Danach wird eine Auffrischung in 10-jährigem Abstand empfohlen (RKI, 2009).

Seit 2001 besteht für Tetanus laut Infektionsschutzgesetz keine Meldepflicht mehr in Deutschland (IFSG, 2000).

Klinisch äussert sich eine Tetanuserkrankung beim Menschen ähnlich der Symptomatik beim erkrankten Tier: Anfangs kommt es zu Gliederschmerzen und Kopfschmerzen. Der Mund kann nicht mehr vollständig geöffnet werden, es bildet sich eine Kiefersperre aus. Der Trismus und das sardonische Grinsen kommen hinzu. Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme werden fast unmöglich. Es bildet sich eine opisthotone Körperhaltung aus, und klonische Krämpfe ganzer Muskelgruppen treten auf. Zusätzlich können durch Sekretstau, Atelektase oder Bronchialobstruktionen respiratorische Insuffizienzen auftreten, die bis zum Tod führen können. Die Letalität liegt bei frühzeitiger Diagnosestellung und moderner Intensivtherapie bei 10-20%

2.4. Diagnose und Differenzialdiagnose bei Tetanus

Generell erfolgt die Diagnose anhand des klinischen Verlaufs. Die klinischen Befunde sind eindeutig. Pathologisch-anatomische Veränderungen fehlen. Zur Absicherung und zur Differenzierung der Erreger wird der Serumneutralisationstest (SNT) durchgeführt.

SILBERBACH (2005) hat eine *in vitro*-Methode zur Detektion residueller Toxizität in Tetanusimpfstoffen entwickelt. Dazu hat sie die enzymatische Aktivität des Tetanustoxins ausgenutzt: Es spaltet das Membranprotein Synaptobrevin-2 in zwei Fragmente. Diese Spaltprodukte können immunologisch detektiert werden. Ihre Methode soll eine Alternative zum Tierversuch bei der Impfstoffprüfung aufzeigen.

Für die Bestimmung der Antitoxintiter im Serum werden die Hämagglutination oder der ELISA eingesetzt (Kapitel 2.7).

Im Anfangsstadium der Tetanuserkrankung können differenzialdiagnostisch mehrere Krankheiten mit in Betracht gezogen werden:

In Frage kommen hier Meningoenzephalomyelitiden viraler oder bakterieller Genese, wie Borna, Tollwut, die Aujeszky'sche Krankheit oder Streptokokkeninfektionen, Listeriose oder auch Botulismus (schlaffe Lähmung). Weiterhin müssen auch Vergiftungen und Traumata im Hals-Kopf-Bereich als Differenzialdiagnose in Betracht gezogen werden.

So ist beispielsweise aus Mäusexperimenten bekannt, dass die Gabe hoher Tetanustoxindosen eine schlaffe Lähmung ähnlich der bei Botulismus auslöst. Man vermutet, dass bei hohen Toxinkonzentrationen nicht das gesamte Toxin ins ZNS wandert, sondern dass das Toxin schon teilweise bei der Aufnahme in die Nervenzelle wirkt. Es blockiert die Neurotransmitterfreisetzung an der neuromuskulären Endplatte und führt zu einer schlaffen Lähmung (MATSUDA et al., 1982).

Des Weiteren können auch Stoffwechselerkrankungen wie Hypokalzämien oder akuter Vitamin-B-Mangel ähnliche Symptome auslösen.

Beim Rind ist zusätzlich immer an BSE zu denken, bei den kleinen Wiederkäuern an Scrapie.

2.5. Therapie bei Tetanus

Der therapeutische Erfolg ist vor allem von der Früherkennung und von der Ausprägung der Klinik abhängig. Das heißt, je mehr Tetanustoxin von den Clostridien produziert wird, desto schlechter sind die Heilungsaussichten. Akute Fälle, die schnell zum Festliegen kommen, sind aussichtslos. Übersteht der Patient (Equide) die erste Woche und zeigt immer noch eine selbstständige Futteraufnahme, hat er günstige Heilungschancen.

Die Therapie einer akuten Tetanuserkrankung bedingt die hochdosierte Penicillingabe und die Applikation von Antitoxinserum (VÖRÖS et al., 1997). Durch die parenterale Antitoxinapplikation soll noch freies, nicht an das ZNS gebundenes Toxin neutralisiert werden. Allerdings wird bezweifelt, dass die Antikörper durch die Plasmamembran der toxingeschädigten Nervenzellen gelangen können (BARTELS und BIGALKE, 1992). In der Humanmedizin konnte jedoch beobachtet werden, dass an Tetanus erkrankte Menschen nach intrathecaler Antitoxinapplikation eher eine klinische Besserung zeigten (DE BARROS MIRANDA-FILHO et al., 2004).

Bei ungeimpften Patienten sollte eine Simultanimpfung erfolgen, um einem Spättetanus vorzubeugen (RADVILA, 1975).

Die zusätzliche systemische Therapie besteht in der Gabe von Sedativa und der Aufstallung in einem abgedunkelten und ruhigen Stallbereich (SCHOFER, 1995). Sehr oft ist das Anlegen einer Infusion zu empfehlen, da die Tiere aufgrund der Muskulaturspasmen häufig nur noch vermindert Flüssigkeit aufnehmen können. Außerdem schwitzen sie durch die ständige Muskelkontraktion vermehrt und verlieren so zusätzlich Flüssigkeit. Oft ist auch eine parenterale Ernährung nötig. Der Harn- und Kotabsatz muss regelmäßig kontrolliert und eventuell manuell durchgeführt werden. Teilweise ist auch das Anlegen eines Hängegeschirrs zu empfehlen, um ein unkontrolliertes Stürzen des Patienten zu verhindern.

Kann noch eine Verletzung lokalisiert werden, sollte diese versorgt werden. Ein Umspülen der Eintrittspforte mit Antitoxinserum ist umstritten (THEIN, 2009). Sinnvoller ist ein ausreichendes Wunddebridement.

In einigen Fällen wurde festgestellt, dass die Gabe von Tetanusantitoxin bei den behandelten Pferden Nebenwirkungen hervorgerufen hat. Diese zeigten sich in erhöhten Leberenzymwerten und in subklinischen bis klinischen Hepatopathien (GUGLICK et al., 1995).

In Kanada wurde in der Humanmedizin das equine Tetanusantitoxin durch das humane Tetanusimmunglobulin ersetzt. Anaphylaktische Reaktionen der Patienten durch das equine Serum werden so vermieden (SHINDMAN, 1994).

2.6. Immunologie

Nach dem Kontakt mit dem Tetanustoxin können 9 verschiedene monoklonale Antikörper gebildet werden. Jeder einzelne besitzt die Fähigkeit, das Toxin zu neutralisieren. Darüber hinaus wirken die Antikörper in Kombination synergistisch. Allerdings konnte nachgewiesen werden, dass die Antikörper von Pferd, Mensch, Kaninchen und Maus die antigendeterminierenden Untergruppen des Tetanustoxins unterschiedlich neutralisieren. So wurden beim Pferd gegen alle vier antigendeterminierenden Untergruppen (alpha, beta-1, beta-2, gamma) Antikörper nachgewiesen. Anti-gamma zeigte die geringsten neutralisierenden Eigenschaften. Beim Menschen hingegen haben Anti-gamma und Anti-alpha eine hohe neutralisierende Potenz. Anti-beta-1 wirkt kaum neutralisierend. Das Kaninchen ist zwischen Pferd und Mensch einzuordnen. Anti-beta-2 konnte bei allen nachgewiesen werden (MATSUDA et al., 1983).

Eine Immunität gegen das Tetanustoxin ist nur durch eine Impfung mit Formalin-inaktiviertem Toxin zu erreichen. Sie ist das Ergebnis der humoralen Immunität (VOLK et al., 1984).

Das Immunsystem lässt sich einteilen in das angeborene oder unspezifische und in das erworbene oder spezifische Immunsystem. Beide Teile arbeiten mit einer humoralen und einer zellulären Abwehr. Die angeborene und die erworbene Immunität sind eng miteinander verbunden und aufeinander angewiesen (SZENTKUTI und EHRLEIN, 2000).

Das unspezifische Immunsystem:

Dieser Teil der Immunabwehr ist phylogenetisch älter. Zu ihrer zellulären Abwehr gehören die Mikro- und Makrophagen, Killerzellen, dendritische Zellen und sonstige Retikulumzellen aus Milz, Thymus, Lymphknoten und Knochenmark.

Die humorale Abwehr stellen vor allem die Zytokine und Lysozyme dar. Zu den Zytokinen zählen die Interleukine, Interferone, Tumornekrosefaktoren, Wachstumsfaktoren und die Kolonie-stimulierenden Aktivitäten.

Das unspezifische Immunsystem stellt die erste Hürde für eindringende Noxen dar. Aufgrund unspezifischer Rezeptoren, die häufige Oberflächeneigenschaften von Noxen (Bakterien, Viren) erkennen, ist eine schnelle Aktivierung der Zellen des unspezifischen Immunsystems möglich.

Zusätzlich wird über die unspezifische Abwehr das spezifische Immunsystem alarmiert.

Das spezifische Immunsystem:

Das spezifische Immunsystem wird erst durch die unspezifische Abwehr aktiviert und reagiert somit später auf Noxen. Die zelluläre Abwehr wird erst nach 5-7 Tagen wirksam, die humorale Abwehr braucht 14-21 Tage, um reagieren zu können. Die zelluläre Abwehr wird von den T-Lymphozyten vertreten, die humorale Abwehr von den B-Lymphozyten. Beide Zelltypen entstammen der lymphopoetischen Zellreihe des Knochenmarks. Die T-Lymphozyten erfahren ihre Prägung dabei im Thymus. Die B-Lymphozyten werden durch die *Bursa fabricii* bzw. das Bursa-Äquivalent beeinflusst. Von diesen primären lymphatischen Organen wandern die nun kompetenten Lymphozyten in die sekundären lymphatischen Organe ein, um hier abrufbar zu sein. Die T-Lymphozyten besitzen spezifische Rezeptoren, über die sie nur an spezifische Antigene binden können. Sie erkennen nur Noxen, die im Komplex mit MHC-Molekülen auf den Oberflächen von körpereigenen Zellen präsentiert werden. Stabilisiert wird die Bindung zwischen dem MHC-Antigen-Komplex und dem T-Zell-Rezeptor durch einen Korezeptor. Bei T-Helferzellen ist dies CD4, bei zytotoxischen T-Zellen ist es CD8. Wird die Noxe von einem MHC-I-Komplex präsentiert, folgt die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen. Die T-Helferzellen werden über den MHC-II-Komplex aktiviert. Die Beladung von MHC-I-Molekülen findet im endoplasmatischen Retikulum statt, die der MHC-II-Moleküle im Lysosom (DANNER und BRUNNER, 2002). Welche T-Helferzellen entstehen, ist von den Differenzierungszytokinen der Antigen-präsentierenden Zellen abhängig. Th1-Zellen entstehen bei Interleukin-12 und -18. Th2-Zellen werden bei Interleukin-2 und -4 gebildet. Von beiden Th-Zellpopulationen geht eine gegenseitige Hemmung aus. Die Th2-Zellen bilden Aktivierungszytokine (IL-4) für die B-Lymphozyten. Sie unterstützen die humorale Abwehr. Die Th1-Zellen aktivieren mit Hilfe von Interferon-Gamma die Makrophagen. Zusätzlich zu diesen T-Effektorzellen werden langlebige T-Memory-Zellen gebildet.

Aus den teilungsfähigen B-Lymphozyten gehen kurzlebige Plasmazellen und langlebige B-Memory-Zellen hervor. Die Plasmazellen haben die Aufgabe der Antikörperproduktion (VAHLENKAMP, 2011).

2.6.1. Antikörper oder Immunglobuline

Immunglobuline sind von Plasmazellen sezernierte Glykoproteine. Alle Antikörper haben einen einheitlichen Bauplan. Die symmetrische Grundeinheit besteht aus je zwei schweren H-Ketten und zwei leichten L-Ketten. Die Ketten sind untereinander über Disulfidbrücken verbunden. Sie untergliedern jede Kette in einzelne Domänen. Mit Hilfe von Papain kann der Antikörper in seine einzelnen Fragmente gespalten werden.

Dabei haben die beiden Fab-Fragmente die Aufgabe der Antigenbindung. Sie werden aus den L-Ketten und einem Teil der H-Kette gebildet.

Das Fc-Fragment bindet und aktiviert das Komplement und zelluläre Rezeptoren. Zusätzlich ist es selbst stark immunogen. Vor allem die Gegend der Antigenbindungsstelle weist eine hohe Variabilität der Aminosäuresequenzen auf. Diese hohe Anpassungsfähigkeit ermöglicht den Antikörpern, spezifisch mit verschiedensten Antigenen zu reagieren. Dieses Prinzip wird auch das „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ genannt (LÖFFLER, 2003).

Säugetiere und Menschen weisen fünf Isotypen von Antikörpern auf. Die Unterteilung beruht darauf, dass die schweren H-Ketten in fünf Varianten vorkommen. Zusätzlich zu dieser Einteilung treten innerhalb dieser fünf Klassen Subklassen auf. „Die fortschreitende Evolution ist mit zunehmender Komplexität der Antikörperklassen und -subklassen assoziiert“ (JUNGI, 1996).

Entsprechend ihrer unterschiedlichen Struktur unterscheiden sich die Antikörperklassen auch in ihrer Funktion:

Immunglobulin M (IgM)

IgM liegt im Plasma als Pentamer, auf der Oberfläche von B-Zellen als Monomer vor. Seine Halbwertszeit beträgt fünf Tage, sein molekulares Gewicht 970 kDa. Der erste Antigenkontakt führt zu Beginn hauptsächlich zur Bildung von IgM. Die IgM-Bildung beginnt etwa 3 Tage nach dem Kontakt. Der Höhepunkt der IgM-Produktion ist ungefähr eine Woche nach dem Antigenkontakt erreicht. Zwei Wochen nach dem Kontakt sinkt der IgM-Gehalt gegen null. Bei einem erneuten Antigenkontakt (Boosterung) wird IgM in ähnlichem zeitlichem Verlauf und ähnlicher Menge wie bei der Primärantwort gebildet. Dies erklärt sich damit, dass für die Bildung von IgM kein Gedächtnis existiert. Seine Aufgabe ist vor allem die Aktivierung des Komplementsystems auf dem klassischen Weg. Es bewirkt eine Komplement-vermittelte Lyse und Phagozytose.

Immunglobulin G (IgG)

IgG tritt im Plasma als Monomer auf. Seine Halbwertszeit beträgt 20-30 Tage; sein molekulares Gewicht beträgt 150 kDa. Mengenmäßig liegt IgG in der höchsten Konzentration aller Immunglobuline im Serum vor. Die Bildung von IgG nach Antigenkontakt findet zeitlich verzögert zur IgM-Bildung statt. Dies erklärt sich daraus, dass die IgM-produzierenden Plasmazellen einen Klassenwechsel (Isotyp-Switch) erfahren müssen, damit sie IgG produzieren können. Die Plasmazellen reifen dabei zu B-Zellen. Dieser Reifungsprozess hat zur Folge, dass die B-Zellen IgG produzieren, die eine noch höhere Affinität für das Antigen aufweisen (BEHR et al., 2010). Der Höhepunkt des IgG-Gehalts im Serum kann ungefähr zwei Wochen nach dem Antigenkontakt gemessen werden.

Ein Teil der ausdifferenzierten Plasmazellen stirbt allerdings ab. Nur wenige überleben und stellen langfristig IgG bereit. Der andere Teil der ausdifferenzierten Plasmazellen ruht in der Peripherie und bildet den schnell aktivierbaren Pool der Memory-Zellen (BEHR et al., 2010).

Bei einem erneuten Antigenkontakt steht somit eine Reihe antigenspezifischer IgG-Memory-Zellen zur Verfügung. Die Sekundärantwort fällt dadurch schneller und höher aus. Durch den zweiten Kontakt (Boosterung) wird die bereits vorhandene Anzahl an Memory-Zellen nochmals entscheidend erhöht.

IgG sind die einzigen Immunglobuline, die plazentagängig und Blut-Milchschränken-gängig sind. In ihrer Verantwortung liegt es, die Feten und Neugeborenen mit dem entsprechenden Immunschutz auszustatten.

IgG bewirkt eine Komplement-vermittelte Lyse. Zusätzlich kann auch unabhängig vom Komplementsystem durch Opsonisierung eine Phagozytose ausgelöst werden.

Immunglobulin A (IgA)

IgA liegt im Plasma als Monomer, im Sekret als Dimer vor. Seine Halbwertszeit beläuft sich auf 6 Tage, sein molekulares Gewicht beträgt 320 kDa. IgA ist das Hauptimmunoglobulin von Sekreten. Es ist in hohen Konzentrationen im Speichel, den Tränen- und Nasensekreten, dem Schweiß, sowie den Sekreten von Lunge, Magendarm- und Urogenitaltrakt zu finden. Seine Hauptaufgabe liegt im Schutz der Schleimhäute vor bakteriellen Infektionen. Es kann keine Komplementreaktion aktivieren. Zusätzlich wird IgA von den Milchdrüsen sezerniert, so dass es auch in der Milch zu finden ist. Es bietet so dem Neugeborenen Schutz. Im Gegensatz zu reifer Milch enthält die Kolostralmilch nur wenig IgA. Das Verhältnis von IgA zu IgG im Kolostrum beträgt 1:34 (MC GUIRE und CRAWFORD, 1972).

Immunglobulin E (IgE)

Das im Plasma als Monomer vorliegende IgE hat eine Halbwertszeit von 3 Tagen. Es liegt im Serum in sehr niedrigen Konzentrationen vor. Sein molekulares Gewicht beträgt 190 kDa. IgE wird von Plasmazellen der Haut gebildet. Es löst auf Mastzellen die Freisetzung vasoaktiver, entzündlicher Mediatoren (Histamin) aus. IgE ist somit Vermittler der Überempfindlichkeitsreaktion vom Soforttyp (Typ I). Das mastzellgebundene IgE ist langlebig. Die Mastzellen sind somit sensibilisiert.

Immunglobulin D (IgD)

IgD liegt ebenfalls im Serum als Monomer vor. Seine Halbwertszeit beträgt 3 Tage, sein molekulares Gewicht 175 kDa. Es ist wie IgM auf der Oberfläche von reifen B-Zellen zu finden. Seine Funktion im Plasma ist nicht bekannt.

Der gemessene Tetanusantikörpertiter stellt eine Summation aus protektiven und nichtprotektiven Antikörpern dar. Nur durch den SNT oder den ToBI kann eine Aufschlüsselung erfolgen (Kap. 2.8).

So erkrankte ein 14-jähriger Junge an Tetanus, obwohl er geimpft war und in seinem Serum ein ausreichender Tetanusantikörpertiter von 2,11 IE/ml gemessen werden konnte. Vermutlich war die Menge an neutralisierenden Antikörpern im Blut zu niedrig für die Neutralisation der im Blut zirkulierenden Tetanustoxinmenge (KÖNIG et al., 2007).

2.6.2. Ausbildung des Immunsystems beim Neonaten

Die Neugeborenen sind in den ersten Lebenstagen bis Wochen sehr anfällig für Infektionen bakterieller und viraler Genese. Die Bildung von Immunzellen beginnt im Fetus mit der Bildung von Lymphozyten. Beim Pferd werden im Thymus die ersten T-Lymphozyten zwischen dem 60.-80. Trächtigkeitstag gebildet. Um den 90. Trächtigkeitstag wandern diese in die Mesenteriallymphknoten und in die *Lamina propria* des Darms ein. In der Milz werden ab dem 175. Tag Lymphozyten gebildet. Die ersten Blutlymphozyten sind ab dem 120. Tag messbar, sogar einige Plasmazellen können ab dem 240. Tag nachgewiesen werden (TIZARD, 2000).

Das Pferd hat, wie Rind und Schwein auch, eine *Placenta epitheliochorialis*. Bei diesem Plazentatyp liegen zwischen maternalem Gefäßendothel und fetalem Gefäßendothel das

Endometrium und das Chorion. Sie verhindern einen Blutaustausch von maternalem und fetalem Blut. Im letzten Drittel der Trächtigkeit verringern sich die Anteile von Endometrium und Chorion. Zu diesem Zeitpunkt ist ein Übergang von maternalen Antikörpern und Antigenen in den fetalen Kreislauf möglich (SAMUEL et al., 1976).

Im letzten Trächtigkeitstertel vermag der Fetus geringgradig spezifische Immunglobuline zu synthetisieren (PERRYMAN und MC GUIRE, 1980). Allerdings reichen die fetale Antikörperproduktion und auch der Übergang von maternalen Antikörpern nicht aus, um ein funktionierendes Immunsystem auszubilden. Erst durch das Kolostrum nimmt das Neugeborene die ausreichende Menge an Immunglobulinen auf.

Bekannt ist, dass das Tetanustoxin die Plazentaschranke nicht überwinden kann. Dies gilt sowohl beim Pferd als auch beim Mensch, der nicht wie das Pferd eine *Placenta epitheliochorialis*, sondern ein *Placenta haemochorialis* ausbildet. So wurde beobachtet, dass Frauen mit einem klinisch manifesten Tetanus gesunde Kinder zur Welt brachten.

Kolostrum

Als Kolostrum wird die Biest- oder Erstmilch bezeichnet, die schon vor der Geburt in der Milchdrüse gebildet wird. Die Milch verändert ihre Zusammensetzung während der Laktation. Die Kolostralmilch des Pferdes zeichnet sich, ähnlich wie bei den anderen Haustieren auch, durch einen besonders hohen Eiweißgehalt mit einem starken Globulinanteil aus (KIRCHGESSNER, 2004). Der hohe Globulinanteil kommt durch den Übergang von maternalen Immunglobulinen aus dem Blut in das Milchsekret zustande. Der Immunglobulin-Austausch geschieht in den Kapillaren der Milchdrüse. Der Austausch der Immunglobuline beschränkt sich auf die ersten 16 Stunden nach der Geburt (THEIN, 2007). Direkt nach der Geburt werden die Immunglobuline in der Milch vor allem durch IgG (65-90%) repräsentiert. Ein weiterer großer Teil wird von den IgA abgedeckt. IgM und IgE sind nur in kleineren Mengen vorhanden (TIZARD, 2000).

Schon 9 Stunden nach der Geburt kann die beginnende Verschiebung der Milchezusammensetzung von IgG hin zu IgA beobachtet werden. Dies prägt sich im Verlauf der Laktation weiter aus. Vermutlich ist diese Verschiebung progesteron- und östrogen gesteuert (SMITH et al., 1971).

Die Tabelle gibt einen Überblick wie sich das Immunglobulinverhältnis und der Immunglobulingehalt im Vergleich von Kolostrum und Milch der späteren Laktation beim Pferd ändern:

Tab. 1 (TIZARD, 2000): Immunglobulinverhältnis und Immunglobulingehalt im Kolostrum und in der Milch der späteren Laktation beim Pferd

Ig (mg/dl)	IgA	IgM	IgG
Kolostrum	500-1500	100-350	1500-5000
Milch	50-100	5-10	20-50

Neben den lebensnotwendigen Immunglobulinen enthält das Kolostrum auch Wachstumsfaktoren, die vor allem die Resorption des Darms steigern und somit die Immunglobulinaufnahme zusätzlich fördern.

Resorption der Immunglobuline durch Neugeborene

Die geringe Sekretion von Magensäure und Pepsinogenen bei Neonaten und ein Trypsininhibitor im Kolostrum sorgen dafür, dass die über das Kolostrum aufgenommenen Immunglobuline in den ersten Lebenstagen kaum verdaut werden (SZENTKUTI und EHRLEIN, 2000).

Die kolostralen Immunglobuline binden an spezielle Fc-Rezeptoren intestinaler Epithelzellen, vor allem im Duodenum- und Ileumbereich. Diese Rezeptoren gehören der MHC-Klasse an (TIZARD, 2000).

Die an diese Rezeptoren gebundenen Immunglobuline werden dann durch Pinocytose in die Epithelzellen aufgenommen. Von dort gelangen sie über die Lymphkapillaren in den neonatalen Blutkreislauf.

Bei Pferden und Schweinen konnte eine selektive Immunglobulinaufnahme beobachtet werden. Bevorzugt wurden IgG und IgM aufgenommen, weniger IgA (TIZARD, 2000).

Die IgA heften sich vor allem an die Oberfläche der Darmschleimhaut, um im Darm auftretende Keime direkt vor Ort zu neutralisieren.

Die Resorption der Darmzellen ist in den ersten 6 Lebensstunden am größten. Danach werden die Ig-absorbierenden Darmzellen durch differenzierte Darmzellen ersetzt. Nach 24 Stunden können so gut wie keine Immunglobuline mehr die Darmschranke passieren.

Als Richtwert sollte ein neugeborenes Fohlen 1 Liter Kolostrum in den ersten 6 Lebensstunden getrunken haben. Der Ig-Gehalt im Fohlenserum sollte dem des Muttertieres entsprechen. Ein Immunglobulingehalt von 800 mg/dl wird als ausreichend angesehen. Ein Peak der Immunglobuline ist 12-24 Stunden nach der Geburt zu erwarten (SCHUSSER, 2007). Probleme können durch mangelnden Immunglobulingehalt im Kolostrum oder durch mangelnde Aufnahme entstehen. Hier gilt es, schnellstmöglich therapeutisch einzugreifen.

2.6.3. Impfung gegen Tetanus

Bei der Impfung unterscheidet man die aktive und die passive Immunisierung.

Bei der passiven Immunisierung werden einem Individuum Antikörper eines anderen Individuums übertragen. Dies kann auf diaplazentarem oder laktogenem Weg oder artifiziell erfolgen.

Bei der aktiven Immunisierung wird der Körper durch Antigenkontakt zur Produktion eigener Antikörper angeregt.

Werden die aktive und die passive Immunisierung parallel vorgenommen, spricht man von einer Simultanimpfung.

Für die aktive Tetanusimpfung wird ein Totimpfstoff eingesetzt. Im Speziellen handelt es sich um einen Toxoidimpfstoff. Das verwendete Tetanustoxoid wird durch eine Formaldehydbehandlung inaktiviert.

Dadurch ist das Toxoid immunogen, aber nicht mehr toxisch. Als Adjuvans werden zur Verstärkung der Immunreaktion Aluminiumsalze eingesetzt. Die Aluminiumsalze stimulieren die Makrophagen zur Abgabe immunmodulatorischer Faktoren. Zusätzlich unterstützen sie die Proliferation von Th2-Zellen und aktivieren das Komplementsystem (DANNER und BRUNNER, 2002).

Der Toxoidimpfstoff ist sowohl als monovalenter als auch als Kombinationsimpfstoff auf dem Markt erhältlich. Als Kombinationsimpfstoff wird der Toxoidimpfstoff mit Influenzaimpfstoff kombiniert.

Für die Zulassung wird von einem Tetanusimpfstoff eine Mindestantigenmenge von 150 IE pro Impfdosis gefordert. Diese Konzentrationsangabe ist unabhängig von der Pferderasse, Größe und Körpergewicht. Gleiches gilt bei anderen Tierarten, z.B. den kleinen Wiederkäuern (DANNER und BRUNNER, 2002).

Für die Tetanusimmunisierung ist ein monovalenter Impfstoff vorzuziehen (THEIN, 2007). Bei einem Feldversuch zu monovalentem Herpesimpfstoff im Vergleich zu Herpes-, Influenza-, Tetanus-Kombinationsimpfstoffen wurden 8 Monate alte seronegative Fohlen mit beiden Impfstoffen 3 Mal im Abstand von 4 Wochen und 6 Monaten immunisiert. Eine Titerkontrolle zeigte, dass der Tetanus-Peak bei Verwendung des Kombinationsimpfstoffes erst nach der dritten Impfung erreicht war. Der protektive Titer war allerdings schon nach der ersten Impfung gegeben (HELDENS et al., 2001).

Außerdem ist der Antikörpertiteranstieg nach einer Tetanusimpfung höher als nach einer Influenzaimpfung. Die Halbwertszeit der Tetanus-Antikörper ist länger als die der Influenza-Antikörper (WILSON et al., 2001).

Auch ROSSKOPF (2005) beschreibt einen niedrigeren Impferfolg bei der Verwendung eines Tetanus-Influenza-Kombinationsimpfstoffs.

Die Grundimmunisierung gegen Tetanus besteht aus zwei Einzelimpfungen im Abstand von 4-8 Wochen. Die Boosterung erfolgt meist nach 12 Monaten.

In einem Feldversuch wurden 5 Monate alte nicht geimpfte New Forest Fohlen erstmalig mit einem Influenza-Tetanus-Kombinationsimpfstoff geimpft. Die Boosterung erfolgte allein für Influenza. Trotzdem konnte ein protektiver Tetanus-Titer über 20 Monate nachgewiesen werden (MUMFORD et al., 1994).

Wird die Mutterstute während der Trächtigkeit geimpft, sollte das Fohlen nicht vor dem 6. Lebensmonat geimpft werden, da die maternale Immunität mit der Impfung interferieren kann (FA. INTERVET).

Die vom Neugeborenen aufgenommenen maternalen Antikörper nehmen aufgrund ihrer Halbwertszeit innerhalb der ersten beiden Lebensmonate erheblich ab. Zusätzlich nimmt bei einem wachsenden Fohlen das Plasmavolumen stetig zu, was einen Verdünnungseffekt auf die Antikörperkonzentration hat. Trotzdem ist ihr Spiegel in dieser Zeit zu hoch für eine aktive Immunisierung. Die maternalen Antikörper würden die Impfantigene neutralisieren, indem sie einen Immunkomplex mit ihnen eingehen. Dieser würde von der körpereigenen Abwehr beseitigt werden und so dem Körper verloren gehen. Trotz Einsatz eines kompetenten Impfstoffes kann es zu einem nur mäßigen Immunitätsaufbau kommen (VAN MAANEN, 1992).

Neben dem Verpuffen der Impfwirkung kann sich darüber hinaus eine Immuntoleranz ausbilden. Dabei wird das Antigen nicht als Immunogen vom Körper erkannt, sondern als ein

Tolerogen mit immunologischer Akzeptanz eingestuft (THEIN, 2007). Als Folge kann das betroffene Fohlen lebenslang keine vergleichbare Immunität zu einem später geimpften Fohlen entwickeln. In einem Infektionsexperiment konnte sogar nachgewiesen werden, dass zu früh geimpfte Fohlen lebenslang für eine Tetanusinfektion empfänglich bleiben können (WILSON et al., 2001 und BALJER et al., 1982). Deshalb wird eine aktive Immunisierung von Fohlen gegen Tetanus nicht vor dem 6. Lebensmonat empfohlen (GRABNER, 2008).

Die Immuntoleranz bei Fohlen, die vor dem 4. Lebensmonat gegen Tetanus geimpft wurden, ist schon vor 30 Jahren beschrieben worden (JANSEN und KNOETZE, 1979).

Um den 6. Lebensmonat befindet sich das Fohlen allerdings in einer kritischen immunologischen Phase. Seine maternalen Antikörper sind so weit abgebaut, dass sie keinen Schutz mehr vor einer Infektion bieten. Die Bildung eines schützenden Antikörpertiters nach der aktiven Immunisierung wird allerdings auch erst im Laufe einiger Wochen ausgebildet. In dieser Zeit vollzieht sich der Übergang von der passiven zur aktiven Immunität (VAHLENKAMP, 2011). Hier sind die Fohlen sehr empfänglich für Infektionen aller Art, auch Tetanus. Vor allem in diesem Lebensabschnitt sind die Fohlen viel unterwegs und somit neuen äußeren Einflüssen ausgesetzt: Fohlenschauen, Brenntermine, Absetzen und Ausstallen auf eine Fohlenweide oder ähnliche öffentliche Zusammenkünfte.

Ausschlaggebend für den Zeitpunkt der Erstimpfung sollte immer sein, ob es sich um eine regelmäßig geimpfte Mutterstute handelt.

Einige Impfstoff-Hersteller empfehlen, die trächtige Stute 4-6 Wochen vor dem Abfohltermin zu boostern, um den kolostralen Immunschutz des Fohlens zu steigern. Bei Fohlen von Mutterstuten, die 2 Monate *ante partum* geboostert wurden, konnten noch 26 Wochen *post partum* maternale Antikörper nachgewiesen werden (DANNER und BRUNNER, 2002).

Ist der Impfstatus der Mutterstute unbekannt, wird angeraten, das Fohlen erstmalig mit Ende des 3. Lebensmonats zu impfen. Im 6. Monat sollte dann mit der regulären Grundimmunisierung begonnen werden (FA. INTERVET).

Werden seronegative Jährlinge gegen Tetanus immunisiert, ist ihr Antikörperpeak wesentlich höher als bei Fohlen, die mit 6 Monaten geimpft werden. Das Erreichen des Peaks ist bei beiden zeitlich gleich. Die zweite Impfung 4 Wochen später erzielt bei den Jährlingen keine Titerzunahme. Fohlen, die im 3. Lebensmonat geimpft werden, brauchen 1-3 Impfungen, um ebenso hohe Titer zu erreichen wie Jährlinge, die 2 Mal immunisiert wurden (WILSON et al., 2001).

Zur Aufrechterhaltung der Basisimmunität sind Nachimpfungen erforderlich. In untersuchten Einzelfällen konnte 5 Jahren nach der letzten Impfung noch ein belastbarer Immunschutz

nachgewiesen werden (DANNER und BRUNNER, 2002). Die Halbwertszeit der Tetanusantikörper wird für Mensch und Pferd mit 6-12 Jahren angegeben (RADVILA, 1975). Dementsprechend könnten auch die Impfintervalle gewählt werden (THEIN, 2007).

Experimentell wurde beim Pferd nachgewiesen, dass Tiere mit einem Antikörpertiter unterhalb des Cut off scheinbar trotzdem noch über eine belastbare Immunität verfügen (LÖHRER und RADVILA, 1970).

Bei einem Impfversuch zum Wirksamkeitsnachweis von Tetanustoxoid wurden 35.000 Pferde 3-malig mit Tetanustoxoid immunisiert. Über einen Beobachtungszeitraum von 10 Jahren trat kein einziger Tetanusfall auf. Die Kontrollgruppe umfasste 10.000 ungeimpfte Pferde. In den 10 Jahren gab es hier 30 Tetanuserkrankungen, wovon 23 tödlich endeten (SCHEIBEL, 1955).

In einem anderen Feldversuch konnte durch eine Erstimpfung mit 8-16 Lf Tetanustoxoid und eine nachfolgende Boosterung mit 8 Lf Tetanustoxoid bei den Pferden ein ausreichender Antikörpertiter für 3,5 Jahre erzielt werden (JANSEN und KNOETZE, 1979).

Trotzdem haben sich die Hersteller der Impfstoffe bei den Auffrischungsimpfungen auf ein Intervall von 1-3 Jahren geeinigt.

Von einem kürzeren Impfintervall ist abzuraten. So können beim Menschen beispielsweise bei zu frühen Auffrischungsimpfungen Nebenwirkungen wie Polyneuritiden oder tonische Muskelkrämpfe auftreten (IMMUNOLAB, 2007). Auch beim Pferd kann ein zu häufiges Auffrischungsimpfen zu einer Überstimulierung vor allem des humoralen Immunsystems führen. Klinische Folge kann eine immunvermittelte Gefäßschädigung sein.

So wurde beispielsweise in einigen Rennställen in den USA, in denen alle 2 Monate eine Influenzaimpfung vorgenommen worden war, beobachtet, dass die durchschnittlichen Antikörpertiter in diesen Beständen abnahmen (MUIRHEAD und MC CLURE, 2006).

Die passive Immunisierung wird bei akutem Infektionsverdacht mit Sporen von *Clostridium tetani* ohne ausreichenden Impfschutz nötig. Hier ist ein rascher Schutz erforderlich. Diese hierfür verwendeten Antitoxinpräparate sind Immunsereen, die im Labor gefiltert und gereinigt werden. Sie werden von Pferden gewonnen, die gegen Tetanus immunisiert worden sind.

Die Schutzwirkung der Immuntherapie beginnt unmittelbar nach der Injektion. Um die optimale Schutzwirkung des Antitoxinserums garantieren zu können, ist es wichtig, dass die Gabe möglichst zeitnah zur Verletzung erfolgt. Außerdem muss auf eine korrekte Dosierung des Antitoxinserums geachtet werden (FA. WDT, 2010).

Bei Infektionsverdacht wird immer zu einer Simultanimpfung geraten. Nach einer Infektion bietet die alleinige aktive Impfung keinen ausreichenden Schutz, da die Bildung von Immunzellen zu lange dauert (RADVILA, 1975).

Bei der Simultanimpfung kann die Effizienz des Impfstoffs durch das Antitoxinserum gemindert werden. Umgekehrt beeinflusst der Impfstoff das Antitoxinserum aber nicht. Der passive Immunschutz bei der Simultanimpfung wird mit maximal 10 Tagen angegeben (FA. WDT, 2010). Mit einer Verdopplung der Impfstoffdosis kann die Neutralisation durch das Serum überwunden werden (THEIN, 2007). Ein Vergleich der alleinigen aktiven bzw. passiven Immunisierung und einer Kombination aus beiden zeigte, dass das beste Impfergebnis durch die Simultanimpfung erzielt wurde. Hier wurde der effizienteste Schutz für nicht immunisierte prädisponierte Pferde erreicht (LIEFMAN, 1980).

Zusätzlich ist zu der Simultanimpfung eine erste Boosterung nach 4 Wochen zu empfehlen. Eine zweite Boosterung sollte nach 12 Monaten folgen, um einen optimalen Schutz vor einem Spättetanus zu erzielen (FA. INTERVET, 2010). Dieser kann eintreten, wenn die Wirksamkeit des Antitoxins nachlässt, aber der Körper noch nicht genügend eigene Antikörper produzieren konnte.

SCHMALL (1997) empfiehlt sogar eine erneute Impfung gegen Tetanus, wenn bei einem verletzten Pferd die letzte Tetanusvakzination länger als 6 Monate zurückliegt.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass es sich bei der Tetanusimpfung um eine unerlässliche individuelle Impfung handelt. Im Vordergrund steht der Schutz des einzelnen Impflings. Bei tragenden Stuten wird durch die Impfung ein zusätzlicher passiver Immunschutz des Neugeborenen erreicht.

Um Impfkomplicationen zu vermeiden, dürfen nur klinisch gesunde Tiere geimpft werden. Dies festzustellen ist Aufgabe des Tierarztes. Auch ein fachgerechter Einsatz der Impfstoffe reduziert das Auftreten von Nebenwirkungen. Eine regelmäßige Entwurmung der Tiere sollte mit in den Impfplan eines jeden Pferdes einbezogen werden (EDMONDS et al., 2001).

Zu berücksichtigen ist außerdem, dass die Gabe von Antitoxinserum auch Nebenwirkungen zur Folge haben kann. So konnten teilweise akute Hepatopathien beobachtet werden (SCHMALL, 1997). Aus diesem Grund ist davon abzuraten, neugeborenen Fohlen von ungeimpften Müttern Antitoxinserum zu verabreichen. Die Gabe von Kolostrum geimpfter Stuten ist sinnvoller.

2.7. Konzentrationsangaben für Tetanustoxin und Tetanustoxoid

(WHO, 2007):

Die Konzentration von gereinigtem Tetanustoxoid wird mit Hilfe des Ausflockungstests oder Ramon-Assay bestimmt. Dabei handelt es sich um einen immunologischen Bindungsassay, bei dem Antigen-Antikörper-Komplexe optisch beurteilt werden:

Der Menge an Tetanustoxoid, die die schnellste Ausflockung mit 1 IE Tetanusantitoxin zeigt, wird die Einheit 1 Lf (Ausflockungseinheit) zugeordnet.

Dies gilt nur, wenn das Verhältnis der *in vivo*-Testung zur *in vitro*-Testung des Toxoids 1 beträgt (SPAUN und LYNG, 1970).

Konzentrationsangabe für den Tetanustoxoidstandard

Die Konzentration des gereinigten Tetanusantitoxinstandards wird in Internationalen Einheiten (IE, englisch IU) angegeben. Sie gehört nicht zu den SI-Einheiten, sondern wird durch Referenzpräparate oder international vereinbarte Standards definiert. Sie gibt die reproduzierbare Dosierung der Präparate anhand der Wirkung wieder. Definiert werden die teilweise willkürlichen Verhältnisse zwischen Stoffmenge und Internationaler Einheit von der WHO. Sie sind für jedes Präparat anders.

So wurde der international gültige Tetanusantitoxinstandard im Auftrag der WHO 1969 durch das State Serum Institute Kopenhagen festgelegt (SPAUN und LYNG, 1970):

1 IE (IU) Antitoxin = 0,39044 mg Tetanus-IgG (gefriergetrocknetes Referenzimmenserum vom Pferd) (DANNER und BRUNNER, 2002).

Bei Versuchen zur Kreuzreaktivität von Equinem Tetanusantitoxin konnte keine Kreuzreaktivität mit den Toxinen von *Clostridium chauvoei*, *Clostridium novyi*, *Clostridium perfringens* und *Clostridium sordellii* beobachtet werden (MC GUIRE und CRAWFORD, 1972).

2.8. Möglichkeiten zum Nachweis von Tetanusantitoxin (Diagnostik)

2.8.1. *In vivo*-Nachweis

Im EUROPÄISCHEN ARZNEIBUCH wird als offiziell anerkannte Methode zur Bestimmung der Wirksamkeit von Tetanus-Adsorbat-Impfstoff der SNT angegeben. Dabei handelt es sich um einen *in vivo*-Test, der mit Mäusen oder Meerschweinchen durchgeführt werden kann. Zur Prüfung der Impfstoffwirksamkeit wird den Versuchstieren diejenige Menge Impfstoff verabreicht, die nötig ist, um die paralytische Dosis Tetanustoxin zu neutralisieren. Mit Hilfe einer Standardzubereitung des Impfstoffs wird die Dosis des zu prüfenden Impfstoffs abgeglichen (EUROPÄISCHES ARZNEIBUCH, 2008).

Die WHO bezeichnet den Serumneutralisationstest zum Nachweis von Tetanusantikörpern als Goldstandard. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,01 IE/ml neutralisierender Antikörper. Nachteilig ist, dass häufig kein direkter Vergleich von SNTs verschiedener Labore möglich ist, da kein international standardisiertes Versuchsprotokoll zur Verfügung steht. Zu unterschiedlich sind außerdem die subjektiven Beurteilungen des Zeitpunktes des Eintretens der paralytischen Symptome. Weitere Einflussfaktoren sind die individuellen Tiergegebenheiten (Gewicht, Gesundheitszustand etc.) (SCHEIBEL, 1955).

Zusätzliche Probleme hat es bei der anfänglichen Einführung der Monographie zur Tetanusvakzine im EUROPÄISCHEN ARZNEIMITTELBUCH 1970 gegeben. Zwar sollte der letale Endpunkt die Hauptmethode darstellen, aber es wurde nicht eindeutig zwischen dem letalen Endpunkt und dem paralytischen Endpunkt unterschieden, so dass es zu unterschiedlichen Ergebnissen und Auswertungen kam. In der 3. Ausgabe des EUROPÄISCHEN ARZNEIBUCHS von 1997 wurde als Hauptmethode der paralytische Endpunkt definiert (CASTEL, 2009).

In der EU-DIREKTIVE 86/609 "Protection of animals used for experimental and other scientific purposes" sind von den EU-Mitgliedsstaaten die 3 Rs erarbeitet worden:

Replacement = Ersatz

Reduction = Reduktion

Refinement = Verbesserung

Endziel ist auch hier der Ersatz der *in vivo*-Versuche durch vergleichbare *in vitro*-Versuche.

Die Durchführung des SNT ist sehr kostenintensiv, und es wird Fachpersonal benötigt (AYBAY et al., 2003). Dabei ist auch die Infektion des Fachpersonals durch den Umgang mit infizierten Tieren oder Material nicht außer Acht zu lassen (WWW.VACCINETRAINING.COM/PROJECT.HTML). Weitere Nachteile des SNT sind seine Subjektivität und der Zeitaufwand. Außerdem müssen bei Versuchen mit lebenden Tieren immer die ethischen Vertretbarkeiten überprüft werden (VAN HOEVEN et al., 2008).

Auch zur Absicherung der Diagnose in der Pathologie wird der SNT genutzt:

Mäusen oder Meerschweinchen wird Wundmaterial subkutan oder intramuskulär appliziert. Serum oder Kulturflüssigkeit kann auch intraperitoneal appliziert werden. Die Tiere verenden bei Vorhandensein von Tetanustoxin nach 1-3 Tagen mit den typischen Symptomen eines Tetanus (Robbenstellung) (SELBITZ, 2002). Als Negativkontrolle muss eine mit Tetanusantitoxin behandelte Maus mitgeführt werden, welche den Test überleben muss. Der SNT drückt in dem Fall die biologische Aktivität des Tetanustoxins aus (AYBAY et al., 2003). Für die Anzüchtung der Keime aus Untersuchungsmaterial erkrankter Tiere muss das Wundmaterial 10 Minuten bei 80°C erhitzt werden. Danach kann es in eine Leberboullion oder auf einem Hochschichtagar verimpft werden. Die hieraus isolierten Keime können neben dem Einsatz im Tierversuch biochemisch getestet werden. Auch ein Anfärben der Keime für eine mikroskopische Beurteilung ist möglich. Allerdings ist eine Diagnose im angefärbten Ausstrich nur wenig zuverlässig. Auch andere Clostridienspezies bilden endständige Sporen aus, jedoch nicht alle Stämme zeigen die typische Trommelschlägerform (GUGLICK et al., 1995).

Im TIERSCHUTZGESETZ (2009) werden in §7-§9 Tierversuche geregelt:

Tierversuche sind am lebenden Tier durchgeführte Eingriffe oder Behandlungen zu Versuchszwecken. Eingriffe oder Behandlungen zu Versuchszwecken dürfen nur durchgeführt werden, wenn das Ziel auf keinem anderen Weg zu erreichen ist und der Tierversuch damit unumgänglich ist.

Die Durchführung eines Tierversuchs bedarf einer amtlichen Genehmigung.

So gehen 15% aller in der Europäischen Union durchgeführten Tierversuche auf das Konto der Impfstofftestung auf Verträglichkeit und Wirksamkeit (WWW.VACCINETRAINING.COM/PROJECT.HTML).

2.8.2. *In vitro*-Nachweis

Internationale Standards sind nötig, um sicherzugehen, dass international gültige und vergleichbare Ergebnisse gewonnen werden. Dies ist vor allem für den weltweiten Tierverkehr wichtig. Hier müssen die Tiere verlässlich auf ansteckende Infektionskrankheiten getestet werden können (WRIGHT, 1998).

Aus diesem Grund schreibt die OIE (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH, 2009) bei der Validierung von *in vitro*-Tests bestimmte Arbeitspunkte vor, die erfüllt werden müssen. Sie gibt vier Vorgehensweisen an, die zur Validierung und Zertifizierung von diagnostischen Tests genutzt werden sollten.

Für die Validierung des Tetanusschnelltests wurde die Vorgehensweise 1 gewählt. Hier müssen folgende Arbeitspunkte erfüllt werden:

Kalibration:

- Die Kalibration soll gegen den gebräuchlichen Standardtest geführt werden:

Dies ist im speziellen Fall der SNT. Jedoch wurde hier zur Vermeidung von Tierversuchen und aufgrund der guten Übereinstimmung von SNT und indirektem ELISA auf den *in vitro*-Test zurückgegriffen. Aus einem bereits durchgeführten SNT wurden die noch vorhandenen Seren im indirekten ELISA und Schnelltest getestet.

- Eichung mit Referenzstandards:

Bei der Kalibration soll ein Referenzstandard mit einbezogen werden. Hier wurde der Tetanusantitoxinstandard der NIBSC zur Eichung sowohl des indirekten ELISA als auch des Schnelltests genutzt.

- Reproduzierbarkeit der Ergebnisse:

Für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wird als Minimum eine Dreifachbestimmung der Proben gefordert.

In einem Intraassay werden die gleichen Proben unter den gleichen Bedingungen, also am gleichen Tag, getestet. Es soll mindestens eine Vierfachbestimmung der Proben erfolgen. Die Messwertstreuung darf dabei 5% nicht überschreiten.

In einem Interassay werden die gleichen Proben über einen längeren Zeitraum unter unterschiedlichen Bedingungen wiederholt neu hergestellt und gemessen. Hierfür wird eine 20-fache Probenbestimmung gefordert. Die Messwertstreuung sollte unter 20% liegen (OIE, 2000).

Um ein möglichst breites Spektrum abzudecken, sollten für Intra- und Interassay Proben mit einer niedrigen, einer mittleren und einer hohen Antikörperkonzentration und ein Nullwert eingesetzt werden.

- Spezifität und Sensitivität

Mögliche Kreuzreaktivitäten des Schnelltests mit anderen im Blut befindlichen Antikörpern müssen abgeklärt werden, um falsch positive Aussagen zu vermeiden.

Die Sensitivität und die Spezifität sollen ein Minimum von 75% nicht unterschreiten.

Weiterhin ist es wichtig, bei der Beurteilung von *in vitro*-Testmethoden zu prüfen, ob es ihnen möglich ist, zwischen IgG- und IgM-Antikörpern zu unterscheiden. Nur die IgG-Antikörper können als neutralisierende Antikörper bewertet werden (SCHEIBEL, 1955).

In der DIN EN ISO/IEC 17025 (2005) werden folgende Kriterien als Grundelemente für eine Validierung aufgezeigt und wie folgt beschrieben:

- Genauigkeit

Die Genauigkeit stellt eine qualitative Bezeichnung für das Ausmaß der Annäherung von Analyseergebnissen an den Bezugswert dar. Dies wird mit der Eichung festgelegt. Dabei ist die Richtigkeit ein Maß für die Abweichung des Messwerts vom Bezugswert aufgrund eines systematischen Fehlers (FUNK et al., 1992).

- Selektivität / Spezifität

Durch die Selektivität wird die Fähigkeit einer Methode definiert, die gesuchte Zielsubstanz eindeutig zu identifizieren. Häufig werden die Begriffe Selektivität und Spezifität synonym verwendet. Das heißt, die Methode wird nur dann als spezifisch bezeichnet, wenn sie für einen Analyten oder eine Gruppe von Analyten uneingeschränkt selektiv ist (PERSSON und VESSMAN, 1998).

- Robustheit

Vor allem in der Routineanalytik gewinnt der Begriff Robustheit immer mehr an Bedeutung. Die Robustheit ist gekennzeichnet durch die Toleranz der Methode gegenüber Schwankungen im Verfahrensablauf.

Durch eine Validierung soll ein Qualitätsstandard erreicht werden, der die Vergleichbarkeit von Analysedaten verbessert und der besonders beim Einsatz neuer Verfahren beziehungsweise bei der Übernahme von Verfahren von entscheidender Bedeutung für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist (KETTRUP und KRÄMER, 2000).

Die Gefahr des Einsatzes von diagnostischen Tests am Tier, die allein im Labor validiert worden sind, liegt in der Fehlbeurteilung des Infektionsstatus des Tieres. Wichtig sind daher auch die Testung im Feld und die richtige Interpretation der Ergebnisse (JACOBSON, 1998).

2.8.2.1. Passive Hämagglutination (HA)

Bei der HA werden Erythrozyten mit dem diagnostischen Antigen (Tetanustoxoid) vorbehandelt. Häufig werden Schaferythrozyten dafür verwendet. Treten nun spezifische Tetanusantikörper hinzu, erfolgt eine Agglutination der Erythrozyten.

Der Test wird in einer Mikrotiterplatte durchgeführt. Durch gleichzeitiges Testen mehrerer Verdünnungen des Antiserums lässt sich der Endpunkt der Agglutination semiquantitativ bestimmen. Dazu müssen aber positive und negative Referenzseren in den Test mit einbezogen werden.

Anfangs wurde die HA zum Nachweis von Röteln-Antikörpern beim Menschen eingesetzt. Zum Nachweis des Influenzavirus und des Reovirus wird die HA heute noch verwendet (JAMES, 1990).

Vorteilhaft ist die schnelle und einfache Durchführbarkeit. Nachteilig ist allerdings, dass der HA nicht zwischen IgG- und IgM-Antikörpern unterscheiden kann. So kann es vor allem bei niedrigtitrigen Seren zu falsch positiven Aussagen kommen (SCHEIBEL, 1955).

Eine signifikante Zunahme von Antikörpern nimmt man dann an, wenn die Agglutination um zwei Titerstufen zunimmt (JUNGI, 1996).

2.8.2.2. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Je nach Versuchsaufbau werden Antigen oder Antikörper über physikalische Vorgänge an eine Kunststoffplatte gebunden. Mit der hinzugegebenen komplementären Komponente (Antikörper bzw. Antigen) bilden sie Immunkomplexe aus. Diese können mit konjugierten Sekundärantikörpern oder -antigenen sichtbar gemacht werden. Hierbei werden Hilfssubstanzen, die dem Sichtbarmachen von Antikörpern dienen, mit chemischen Methoden kovalent an Antikörper gekoppelt. Als Hilfssubstanzen werden gebräuchlicher Weise Biotin, Avidin oder Streptavidin eingesetzt. Mit diesen Hilfssubstanzen wiederum gehen Enzyme wie die Alkalische Phosphatase oder die Meerrettich-Peroxidase Verbindungen ein. Diese Enzyme setzen ein zugegebenes Substrat um. Der Farbumschlag kann detektiert werden (WENDEL, 2005).

Der ELISA wird zur Wirksamkeitsprüfung von Impfstoffen (Antikörpertiterbestimmung) genutzt. Der Immunstatus einzelner Individuen bzw. die Prävalenz einer Population bezüglich Tetanus kann so überprüft werden (VAN HOEVEN et al., 2008).

Um auch niedrige Antikörpertiter nachweisen zu können, wurde der ELISA immer weiter modifiziert. So sind heute mehrere ELISA-Varianten gebräuchlich (DIN 58967-30, 2000):

Kompetitiver oder direkter ELISA:

Ein definierter enzymmarkierter Reaktionspartner konkurriert mit dem nachzuweisenden Reaktionspartner um eine Bindungsstelle.

Nichtkompetitiver oder indirekter ELISA:

Der nachzuweisende Reaktionspartner wird durch einen definierten Reaktionspartner gebunden. Ein weiterer enzymmarkierter Reaktionspartner dient zum Nachweis. Dabei konkurrieren die Reaktionspartner nicht um die Bindungsstellen.

Dazu gehören:

- Doppel-Antigen-Sandwich-ELISA zum direkten Antikörpernachweis
- Doppel-Antikörper-Sandwich-ELISA zum indirekten Antigennachweis
- Antikörper-capture-ELISA zum Nachweis von IgM; nicht zum IgG-Nachweis geeignet (JAMES, 1990)

Eine gute Übereinstimmung zwischen ELISA-Werten und SNT-Werten kann beim indirekten ELISA bei Antikörperkonzentrationen über 0,16-2IE/ml beobachtet werden (SCHEIBEL, 1955).

Bei niedrigen Antitoxinkonzentrationen wird der ELISA jedoch unzuverlässig (AYBAY et al., 2003). Bei der vergleichenden Testung von Seren frisch gegen Tetanus geimpfter Tiere fällt eine Diskrepanz zwischen den SNT- und den ELISA-Ergebnissen auf: Die frühen Antikörper binden im ELISA an das Toxoid und werden als Titer detektiert, im SNT neutralisieren sie hingegen das Toxoid nicht. Sie können somit nicht als neutralisierende Antikörper gewertet werden. Man erhält in diesem speziellen Fall im ELISA also eine falsch positive Aussage (AYBAY et al., 2003).

2.8.2.3. Toxinbindungsinhibitionstest (ToBI)

Der ToBI kann als modifizierter ELISA bezeichnet werden. Das Tetanustoxoid wird dabei mit dem zu untersuchenden Serum vorinkubiert, so dass mögliche Antikörper binden können. Das Gemisch wird dann auf eine Kunststoffplatte mit enzymmarkiertem Antitoxin aufgetragen. Ist in dem Gemisch noch freies Toxoid vorhanden, wird es von dem Antitoxin gebunden. Durch die Enzymreaktion kann es detektiert werden.

Das Prinzip des ToBI entspricht dem des SNT: Beide basieren auf der Detektion von freiem Toxin (HENDRIKSEN et al., 1989).

Die Übereinstimmungen der Ergebnisse beider Tests sind so einheitlich, dass der ToBI für die Qualitätskontrolle von Tetanus- und Diphtherie-Impfstoffen herangezogen wird (MATOS et al., 2003).

Der ToBI kann aber ebenso gut unter Feldbedingungen eingesetzt werden (HONG et al., 1996). Zwar korreliert der ToBi besser mit dem SNT als der Standard-ELISA, doch sind auch hier bei niedrigtitrigen Seren Einschränkungen zu beobachten (SCHEIBEL, 1955).

Für die Bestimmung von Tetanusantikörpertitern sind der ELISA und der ToBI immunochemische Methoden, die sich zur Bestimmung des Antikörpertiters als geeignet erwiesen haben (EUROPÄISCHES ARZNEIBUCH, 2008).

So hat im April 2009 die Expertenkommission des EUROPÄISCHEN ARZNEIBUCHS beschlossen, dass ELISA und ToBI als Methoden zur Qualitätskontrolle von

Tetanusantitoxinserum für den Menschen neben der *in vivo*-Methode in das EUROPÄISCHE ARZNEIBUCH aufgenommen werden (GROSS et al., 2009).

Am häufigsten findet der indirekte ELISA Anwendung. Neben dem ELISA sind als weitere Immunoassay-Verfahren der Radioimmunoassay (RIA) und der Fluoreszenzassay zu nennen.

2.8.2.4. Radioimmunoassay (RIA)

Beim RIA werden die gebildeten Immunkomplexe durch radioaktiv markierte Antigene beziehungsweise Antikörper detektiert. Dabei wird die Strahlungsaktivität nach einer gewissen Reaktionszeit gemessen. Genutzt wird ¹²⁵Iod. In der Regel wird der RIA kompetitiv durchgeführt. Die Testantikörper konkurrieren mit den gleichen radioaktiv markierten Antikörpern. Je mehr radioaktive Antikörper gebunden werden, desto weniger Antikörper sind in der Probe vorhanden. Trotz seiner hohen Sensitivität und Reproduzierbarkeit, ist der RIA wegen seines hohen gesundheitsgefährdenden Potentials wenig verbreitet (HUET, 1989).

Beim Fluoreszenzassay werden die Immunkomplexe durch einen Farbstoff detektiert, der in UV-Licht fluoresziert. Als Fluoreszenz-Farbstoffe werden häufig Rhodamin, Fluorescein-Isothiozyanat oder Phycoerythrin verwendet. Die Auswertung ist nur mit einem speziellen Fluoreszenz-Mikroskop möglich. Diese Technik wird hauptsächlich in der Virusdiagnostik eingesetzt.

Ein Vorteil ist, dass man mit einem Konjugat und einem Patientenserum mehrere unterschiedliche Antikörper in einem Versuchsassay detektieren kann.

2.8.2.5. Schnelltests

Das Anwendungsgebiet von Schnelltests liegt vor allem im klinischen Bereich. Sie werden in der Umwelt- und Lebensmittelanalytik sowie bei Spezialanwendungen, wie zum Beispiel als Drogenschnelltests, überwiegend zu Screeningzwecken eingesetzt.

Es gibt eine Reihe unterschiedlicher Bauformen.

Die bekannteste Form des Schnelltests ist der Lateral-flow-Streifentest. Ein weiteres immunologisches Schnelltestverfahren stellen die Assayformate auf Basis von Partikeln (Beads), Chips oder Platten dar:

Lateral-flow-Streifentest

In der Humanmedizin werden unterschiedliche Varianten und Ausführungen von Tetanus-Schnelltests angeboten. Dabei handelt es sich um membranbasierende Schnelltests, auch Lateral-flow-Streifentests genannt, wie beispielsweise den Tetanus Quick Stick, Fa. MedLance Pharma GmbH (Wien, Österreich) (KOLLARITSCH, 2007).

Die Streifentests sind einstufige immunochromatographische Tests zur qualitativen Messung von Tetanus-Antikörpern. Das Prinzip der Tests ähnelt dem des ELISA. Auch beim Schwangerschaftstest wird diese Funktionsweise verwendet.

Sie werden in der Regel auf Basis von Nitrozellulosestreifen hergestellt, über die im oberen Teil eine Glasfasermembran gesetzt wird. Die Probe wird am oberen Teil der Glasfasermembran aufgetragen und reagiert während der Wanderung durch das Flies mit dem dort eingebrachten Tetanustoxoid. Das Tetanustoxoid wurde zuvor mit Goldpartikeln konjugiert. Sind in der aufgetragenen Probe Tetanusantikörper, so bilden sie mit dem Tetanustoxoidkonjugat einen Immunkomplex. Dieser migriert weiter durch die Nitrozellulosemembran und wird an dort immobilisiertes Sekundärantigen (Tetanustoxoid) gebunden. Im Resultat entsteht eine gefärbte Bande. Sind keine Antikörper zur Komplexbildung in der Probe vorhanden, bindet das Toxoid-Farbstoff-Konjugat am Kontrollreagenz. In der Messbande kommt es zu keiner Verfärbung. Häufig wird bei diesen Tests auch eine Positivkontrollbande mitgeführt.

Vorteil dieser Streifentests ist ihre einfache Handhabung. Allerdings sind in der praktischen Handhabung teilweise Probleme beim Laufverhalten der Probe aus der Glasfasermembran über das Flies zu beobachten. Vor allem bei Vollblutproben kann ein schlechteres Laufverhalten beobachtet werden.

Ihre Spezifität wird mit 100% angegeben; ihre Sensitivität mit 85,8% (KOLLARITSCH, 2007).

Nachteilig ist vor allem, dass es sich bei den Tests um rein qualitative Aussagen handelt. Eine Titerangabe ist mit ihnen nicht möglich.

Es hat in der Vergangenheit vielfältige Versuche gegeben, diese Teststreifen quantitativ, entweder reflektometrisch oder fluorimetrisch auszulesen. Dies ist bisher nicht überzeugend gelungen, da es sich als schwierig erwiesen hat, die zugrunde liegenden Membranen in ausreichend guter Qualität zu reproduzieren (MIETHE, 2009). Für qualitative Analysen sind diese Tests aber ideal geeignet und können problemlos in hohen Stückzahlen kosteneffizient hergestellt werden.

In der Veterinärmedizin sind diese Tests zum Nachweis von Tetanusantikörpern nicht kommerziell erhältlich.

Partikel (Beads)

Bei den Partikeln (Beads) handelt es sich um 20 nm-10 µm große Magnetitkügelchen. Häufig wird dazu Magnetit aus gelösten Eisensalzen präzipitiert und mit Hilfe einer Emulsionsflüssigkeit in tröpfchenförmige Polymerpartikel eingehüllt. An der Polymeroberfläche können nun beispielsweise Antikörper oder auch Tetanustoxoid immobilisiert werden. Serumantikörper können Immunkomplexe eingehen. Über magnetische Extraktion können dann die Immunkomplexe aus der Emulsion gewonnen werden (MEYER, 2008).

Die Anwendbarkeit von magnetischen Partikeln wird auch in Verbindung mit Bioassays beschrieben. Einen Überblick über die Nutzung von PCR-, Elektroden- und ELISA-basierter Detektion mit magnetischen Partikeln geben HAUKANES und KVAM (1993).

Das bekannteste Laborverfahren mit magnetischen Partikeln ist das Luminexverfahren. Hier sind die Beads zusätzlich mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Mit dem Durchflußzytometer erfolgt die Analyse. Das Verfahren ist aufgrund seines großen gerätetechnischen Aufwands praktisch nur im Labor nutzbar.

Das wichtigste etablierte Partikelschnelltestverfahren ist die Latexagglutination. Hier werden Antikörper mit Latexpartikeln gekoppelt. Die gebildeten Immunkomplexe werden durch die Partikel sichtbar gemacht (ROCHE, 1999). Genutzt wird die Latexagglutination bei der Speziesidentifizierung von Streptokokken. Eine Einteilung in die Lancefieldgruppen wird so möglich. Allerdings ist die Latexagglutination ein semiquantitatives Verfahren. Ein quantitatives Verfahren wurde von der FIRMA AXIS-SHIELD entwickelt. Es basiert auf der Latexagglutination in Kombination mit Lichtstreuung. Damit können bei moderater Sensitivität Einzelparameteranalysen durchgeführt werden.

Allgemein ist zur diagnostischen Beurteilung des Krankheitsbildes Tetanus zu sagen, dass Laborergebnisse nicht alleine die Grundlage des medizinischen Befundes bilden können. Hier müssen immer auch das klinische Bild und weiterführende klinische Untersuchungen mit berücksichtigt werden.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Material für ELISA

3.1.1.1. Prüf- und Referenzseren

Primär-Antigen

- Tetanustoxoid, c = 1500 Lf/ml +/- 10%; Chargennr.: TET 98-55; Lagerung bei +4°C; Fa. rivm (Bilthoven, Niederlande)
- Tetanustoxin, c = 25 µg/20 ml NaCl; Lagerung bei +4°C; Fa. Sigma-Aldrich (Seelze, Deutschland)
- Bovines Serumalbumin, Albumin Fraktion V (BSA), lot. 1.10218.0025; Lagerung bei +2 bis +8°C; Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Biotinyliertes BSA, c = 1,601 mg/ml, hergestellt am 16.05.2008; Fa. Senova GmbH (Jena, Deutschland)
- Botulinum-A-Toxin, c = 1 µg/ml (in PBS, 12.2.2009); Robert-Koch-Institut (Berlin, Deutschland)
- Botulinum-B-Toxin, c = 1 µg/ml (in PBS, 12.2.2009); Robert-Koch-Institut
- Botulinum-C-Toxin, c = 1,48 mg/ml (in PBS, 12.2.2009); Robert-Koch-Institut
- Botulinum-E-Toxin, c = 800 µg/ml (in PBS, 12.2.2009); Robert-Koch-Institut

Antikörper

- Tetanusserum, Zulassungsnr. A258/79
Hierbei handelt es sich um Immuserum von Pferden, die mit Toxoid und Toxin von *Clostridium tetani* immunisiert wurden.
1 ml Lösung enthält mindestens 1000 IE Tetanusantitoxin und maximal 0,25 m/v % Phenol.
Lagerung bei +2 bis +8°C; Fa. WDT eG (Garbsen, Deutschland)
- Tetanusantitoxinstandard, NIBSC Code: 60/013
Hierbei handelt es sich um Immuserum von Pferden, die mit Toxoid und Toxin von *Clostridium tetani* immunisiert wurden.
Das Immuserum ist gefriergetrocknet. Eine Ampulle enthält 230 IE Tetanus-Antitoxin. Eine Ampulle wird auf 23 ml Natriumchloridlösung 0,9% gelöst.
1 ml Lösung enthält 10 IE Tetanusantitoxin.
Lagerung bei +4°C; National Institut for Biological Standards and Control (NIBSC) (Hertfordshire, England)
- Pferdeseren, Kaninchenseren, Mäuseseren (Registrierungsnummer: 14-102/07)
Die Seren konnten aus dem praktischen Teil einer vorangegangenen Dissertation (MÜLVERSTEDT, 2006) an der fzmb GmbH übernommen werden.
Die Blutproben, die den Tieren des Haflingergestüts Meura in diesem Zusammenhang entnommen worden sind, dienten gleichzeitig klinischen Untersuchungen.
(Haflingergestüt Meura, Tiere aus Tierversuchen, Patienten der Tierklinik des Forschungszentrums für Medizintechnik und Biotechnologie in Bad Langensalza);
Lagerung bei -28°C.

Sekundär-Antikörper bzw. -Antigen

- Biotin conjugated goat anti Horse IgG, c = 1,3 mg/ml; Fa. Senova GmbH
- Biotinyliertes Tetanustoxoid, c = 1,4956 mg/ml; Fa. Senova GmbH

- Biotinyliertes Tetanustoxoid, c = 1,338 mg/ml, hergestellt am 01.08.2008
Hierfür wurde oben genanntes Tetanus-Toxoid verwendet; Fa. Senova GmbH
- Goat-Anti-Rabbit-IgG-HRP, # 111-035-045, c = 0,8 mg/ml; Fa. Dianova

3.1.1.2. Lösungen

Konjugatlösung

- SA-Poly-HRP 40; (Streptavidinperoxidase mit Biotin konjugiert), lot 292504,
c = 1 mg/ml; Fa. Senova GmbH

Substratlösung

- S(HS)TMB-Lösung (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin + Hydrogenperoxid), lot.#722933,
Lagertemperatur +4°C; Fa. SDT (Baseweiler, Deutschland)
- OPD (o-Phenylenediamine Tablets); c = 200µmol/Tablette;
Die Tablette wird in 12 ml Zitrat-Carbonat-Puffer aufgelöst; Fa. Sigma-Aldrich

Stoplösung

- Schwefelsäure 8% (H₂SO₄)
920 ml Aqua bidest
80 ml H₂SO₄, 98%; Fa. Merck

3.1.1.3. Puffer

(alle Puffer sind steril filtriert und entgast)

- Carbonatpuffer (CBB), pH= 9,6
1,59 g Na₂CO₃; Fa. Merck
2,93 g NaHCO₃; Fa. Merck
ad 1000 ml Aqua dest.

Material und Methode

- PBS-Stammlösung (20x)
160 g NaCl; Fa. Merck
4 g KCl; Fa. Merck
28,8 g Na₂HPO₄ x 12 H₂O; Fa. Merck
4,8 g KH₂PO₄; Fa. Merck
ad 1000 ml Aqua dest., pH 7,4 mit 2 M HCl; Fa. Merck
- Blockierungspuffer
0,2% BSA in PBS
(20 ml BSA 10% + 980 ml PBS)
- UCDB-Puffer (Blockierung)
Casein Buffer 20x-4x Concentrate (CBC1) → 1 Teil; Fa. SDT
1x PBS-Puffer (aus PBS-Stammlösung) → 3 Teile
- Waschpuffer
0,1% BSA
0,05% Tween
in 1x PBS-Puffer versetzt mit 0,05% 5-Bromo-5nitro-1,3-dioxane (BND), Fa. Molekula (Vaterstetten, Deutschland)
- Zitrat-Phosphat-Stammlösung
10,63 g Zitronensäure-Monohydrat; Fa. Merck
18,16 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O; Fa. Merck
ad 1000 ml Aqua dest., pH 5,0 äquillibrieren
- Zitrat-Phosphat Gebrauchslösung
12 ml Zitrat-Phosphat-Stammlösung
12 µl Wasserstoffperoxid, 30%; Fa. Merck
- Reinstwasser
Demineralisiertes Wasser

3.1.1.4. Laborgeräte/-technik

Abdeckklebefolie; Fa. Parafilm (Wertheim, Deutschland)

ELISA-Reader Digiscan; messen bei 450nm gegen 620nm; Fa. Digiscan (Oberursel, Deutschland)

ELISA-Reader Dias; Fa. Dyntech Immuno Assay System (Leverkusen, Deutschland)

Kryoröhrchen; Fa. Greiner (Frickenhausen, Deutschland)

Magnetrührer; Fa. Heidolph (Schwabach, Deutschland)

Mehrkanalpipette; Fa. Biohit Plc. (Helsinki, Finnland)

Mikrotiterplatten; Fa. Greiner

Pipetten; Fa. Discovery (Langenfeld, Deutschland)

Pipettenspitzen; Fa. ROTH (Karlsruhe, Deutschland)

Reaktionsgefäße, 50 ml; Fa. Greiner

Reaktionsgefäße, 15 ml; Fa. VWR

Reaktionsgefäße, 2 ml; Fa. Brand (Wertheim, Deutschland)

Reaktionsgefäße, 1,5 ml; Fa. Brand

Rührfischchen; Fa. ROTH

Schüttler Titramax; Fa. Heidolph

Serum-, EDTA-, Heparinröhrchen; Fa. Heiland Medical Vertriebs-GmbH (Hamburg, Deutschland)

Sterilfilter Stericup / 0,22µm Porendurchmesser; Fa. Millipore (Billerica, Massachusetts)

Sterile Laborflaschen mit Schraubverschluss; 100/250/500 ml; Fa. Schott Duran (Mainz, Deutschland)

Vakuumbehälter, Fa. Nalgene (Roskilde, Dänemark)

Vakuumpumpe „Vacobox KNF“; Fa. KNF (Freiburg, Deutschland)

Zentrifuge „Centifuge 58810“; Fa. Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, Deutschland)

3.1.2. Material für den Prototyp „Schnelltest“

3.1.2.1. Prüf- und Referenzseren

Primär-Antigen

- Tetanustoxoid; c = 1500 Lf/ml +/- 10%, Chargennr.: TET 98-55, Lagerung bei +4°C; Fa. rivm (Bilthoven, Niederlande)
- Bovines Serumalbumin, Albumin Fraktion V (BSA), lot. 1.10218.0025, Lagerung bei +2 bis +8°C; Fa. Merck
- Biotinyliertes BSA, c = 1,601 mg/ml, hergestellt am 16.05.2008; Fa. Senova GmbH

Antikörper

- Tetanusserum, Zulassungsnr. A258/79
Hierbei handelt es sich um Immuserum von Pferden, die mit Toxoid und Toxin von *Clostridium tetani* immunisiert wurden.
1 ml Lösung enthält mindestens 1000 IE Tetanusantitoxin und maximal 0,25 m/v % Phenol.
Lagerung bei +2 bis +8°C; a. WDT eG
- Tetanusantitoxinstandard, NIBSC Code: 60/013
Hierbei handelt es sich um Immuserum von Pferden, die mit Toxoid und Toxin von *Clostridium tetani* immunisiert wurden.
Das Immuserum ist gefriergetrocknet. Eine Ampulle enthält 230 IE Tetanus-Antitoxin.
Eine Ampulle wird auf 23 ml Natriumchloridlösung 0,9% gelöst.
1 ml Lösung enthält 10 IE Tetanusantitoxin.
Lagerung bei +4°C; National Institut for Biological Standards and Control (NIBSC)

Sekundär-Antigen

- Biotinyliertes Tetanustoxoid (siehe oben), c = 1,338 mg/ml, hergestellt am 01.08.2008

3.1.2.2. Lösungen

- Ethanol 96% vergällt,
5 Liter-Kanister, Ar.-Nr. 10887.5300, Fa. Bernd Kraft GmbH (Duisburg, Deutschland)
- Ethanol 50%
Ethanol 96% → 1 Teil
Reinstwasser → 1 Teil

Konjugatlösung

- SA-Poly-HRP 40; (Streptavidinperoxidase mit Biotin konjugiert), lot 292504,
c = 1mg/ml; Fa. Senova GmbH

Substratlösung

- S(HS)TMB-Lösung (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin + Hydrogenperoxid), lot.#722933,
Lagertemperatur +4°C; Fa. SDT
- Abionrot; AR#071112JA1; Fa. Senova GmbH

3.1.2.3. Puffer

(alle Puffer sind steril filtriert und entgast)

- Carbonatpuffer (CBB), pH = 9,6
1,59 g Na₂CO₃; Fa. Merck
2,93 g NaHCO₃; Fa. Merck
ad 1000 ml Aqua dest.

Material und Methode

- PBS-Stammlösung (20x)
160 g NaCl; Fa. Merck
4 g KCl; Fa. Merck
28,8 g Na₂HPO₄ x 12 H₂O; Fa. Merck
4,8 g KH₂PO₄; Fa. Merck
ad 1000 ml Aqua dest., pH 7,4 mit 2 M HCl; Fa. Merck
- Blockierungspuffer
0,2% BSA in PBS
(20 ml BSA 10% + 980ml PBS)
- UCDB-Puffer
Casein Buffer 20x-4x Concentrate (CBC1) → 1 Teil; Fa. SDT
1x PBS-Puffer (aus PBS-Stammlösung) → 3 Teile
- Waschpuffer
0,1% BSA
0,05% Tween
in 1x PBS-Puffer versetzt mit 0,05% BND
- Substratpuffer; pH = 4,9
0,1 M Natriumacetat (82,03 g/mol) → 4 Teile; Fa. Merck
0,1 M Zitronensäure-Monohydrat (182 g/mol) → 1 Teil; Fa. Merck
0,05% BND
- Trockenpuffer
5% Saccharose
1% BSA in PBS
(50 g Saccharose + 100 ml BSA 10% + 900 ml PBS)

- U1-Puffer
0,8 l demineralisiertes Wasser
0,2 g KCl; Fa. Merck
8,01 g NaCl; Fa. Merck
3,58 g Na₂HPO₄ x 12 H₂O
Tween 20 (10%); Fa. Merck
ca. 0,2 g KH₂PO₄ (Titration bis pH 7,2); Fa. Merck
5,0 ml Bronidol X (5-Bromo-5-Nitro-1,3 dioxane); Fa. Merck
ad 1000 ml Reinstwasser
- Reinstwasser
Demineralisiertes Wasser

3.1.2.4. Laborgeräte/-technik

Abdeckklebefolie; Fa. Parafilm

Abicap Reader; Fa. Senova GmbH

Abicap Workstation; Fa. Senova GmbH

Karl-Fischer Titrator „Aqua 30.000“; Fa. Elektrochemie (Halle, Deutschland)

Kryoröhrchen; Fa. Greiner

Kunststoffsäulen; Fa. Senova GmbH

Magnetrührer; Fa. Heidolph

Photometer; Fa. Shimadzu (Duisburg, Deutschland)

Pinzette; Fa. Senova GmbH

Pipetten; Fa. Discovery

Pipettenspitzen; Fa. ROTH

Polyethylenfilter „Fritten“, 5 x 2,5 mm; Fa. Porex (Singwitz/Bautzen, Deutschland)

Polyethylenfilter „Fritten“, 5 x 5 mm; Fa. Porex

Polyethylenfilter „Fritten“, 5 x 1,6 mm; Fa. Porex

Reaktionsgefäße, 50 ml; Fa. Greiner

Reaktionsgefäße, 15 ml; Fa. VWR

Reaktionsgefäße, 2 ml; Fa. Brand

Reaktionsgefäße, 1,5 ml; Fa. Brand

Rührfischchen; Fa. ROTH

Schüttler „Titramax 100“; Fa. Heidolph

Serum-, EDTA-, Heparinröhrchen; Fa. Heiland Medical Vertriebs-GmbH

Sterilfilter Stericup / 0,22µm Porendurchmesser; Fa. Millipore

Sterile Laborflaschen mit Schraubverschluss; 100/250/500 ml; Fa. Schott Duran

Stopfer für Fritten; Fa. Senova GmbH

Vakuumbehälter, Fa. Nalgene

Vakuumpumpe, Vaccum oil, ISO V6; Fa. Busch

Wirbelbettrockner “Fluid Bed Dryer”, FBD 2000; Fa. Endecotts (London, England)

Zentrifuge „Centifuge 58810“; Fa. Eppendorf

3.1.3. Material für Feldversuche

3.1.3.1. Impfstoff

- Duvaxyn IE-T-Plus ®; Fa. Fort Dodge (Würselen, Deutschland)
- Equilis Tetanusvaccine ®; Fa. Intervet (Unterschleißheim, Deutschland)
- Tetanustoxin, c = 25 µg / 20 ml Lösungsmittel; Fa. Sigma-Aldrich
- Lösungsmittel (Wasser für Injektionszwecke); Fa. Merial (Halbergmoos, Deutschland)

3.1.3.2. Pferde- und Mäuseseren

Für die Validierung des Schnelltest im Feldversuch wurde vorhandenes Probenmaterial einer vorangegangenen Dissertationsarbeit (MÜLVERSTEDT, 2006) an der fzmb GmbH genutzt.

Bei den Seren handelt es sich zum einen um Pferdeseren von Tieren des Haflinger Gestüts Meura in Thüringen und Seren von 5 Patienten der Tierärztlichen Klinik der fzmb GmbH.

Die Untersuchungen wurden an 37 Stuten, 10 hochtragenden Stuten, sowie an 6 Saugfohlen und 9 Jährlingsstuten des Gestütes Meura vorgenommen. Weitere 86 Blutproben von willkürlich ausgewählten Pferden des Gestütes wurden für die Eichung herangezogen.

Die Blutprobenentnahme am Haflinger Gestüt Meura diente gleichzeitig klinischen Untersuchungen bezüglich der Bestandsbetreuung durch die Tierärztliche Klinik der fzmb GmbH.

Zum anderen wurde im Zusammenhang mit der obigen Arbeit ein Serumneutralisationstest (SNT) (Registrierungsnummer: 14-102/07) *in vivo* an Mäusen durchgeführt. Davon wurden ebenfalls 72 Seren zur Validierung herangezogen.

Pferdeseren

Bei allen zur Probennahme herangezogenen Tieren des Haflingergestüts Meura in Thüringen handelte es sich um Haflinger.

Die Pferde des Gestüts wurden während des Erprobungszeitraums teils auf der Weide teils im Stall gehalten. Bei den zugänglichen Weiden handelte es sich um Mittelgebirgsweiden. Auf Grund der günstigen Witterung war kaum eine Zufütterung nötig. Die Stallhaltung erfolgte auf dem Gestüt in Laufställen zu je 30-40 Tieren auf Stroh nach dem Tiefstreuverfahren.

Hochtragende und frischlaktierende Stuten mit ihren Fohlen wurden in großzügigen Laufställen sowie stundenweise auf gestütnahen Koppeln gehalten.

Die Stallfütterung erfolgte leistungsabhängig mit Rau- und Kraftfuttermitteln. Heu wurde auf eigenen Mähweiden produziert. Salzlecksteine waren im Stall und auf den Koppeln zu jeder Zeit für die Pferde frei zugänglich. Wasser wurde in den Stallungen über Selbsttränken und auf den Weiden in Sammeltränken angeboten (MÜLVERSTEDT, 2006).

Zur Probenentnahme wurden die Probanden in fünf Untersuchungsgruppen eingeteilt:

1. Gruppe

37 Stuten in ganztägiger Weidehaltung wurden im Zeitraum von August bis November 2004 untersucht. Die jährliche Tetanus-Auffrischungsimpfung wurde in Meura im März vor Weideaustrieb vorgenommen.

2. Gruppe

10 hochtragende Stuten wurden in Stallhaltung im Zeitraum von Januar bis Mai 2005 untersucht. Der Beobachtungszeitraum umfasste die letzten Wochen *ante partum* bis 100 Tage *post partum*.

→ die Stuten wurden vor Weideaustrieb Anfang April (05.04.2005) erneut geboostert

3. Gruppe

6 Saugfohlen der Stuten aus der Gruppe 2 wurden über einen Zeitraum von 6 Monaten *post partum* (Februar bis September 2005) untersucht.

→ 3 Tiere erhielten nach 4-5 Monaten die erste Grundimmunisierung

→ 3 Tiere wurden nicht geimpft

4. Gruppe

9 Jährlingsstuten vom Frühjahr 2004 wurden von Februar bis September 2005 in Stallhaltung untersucht. Die Untersuchungen erstreckten sich auf den Zeitraum vor, während und nach der Tetanusgrundimmunisierung.

(Erstimpfung: 30.03.2005; Boosterung: 29.04.2005)

Impfschema Tetanus, Meura (2004/2005)

- Grundimmunisierung nach dem 1. Lebensjahr
→ Duvaxyn IE-T-Plus ® (Kombinationsimpfstoff Influenza und Tetanus) (Fort Dodge)
- Boosterung nach 4 Wochen → Duvaxyn IE-T-Plus ® (Fort Dodge)
- Danach jährliche Boosterung im März/April vor Weideaustrieb → Equilis Tetanusvaccine ® (Intervet)

Die Impfstoffgabe erfolgte tief intramuskulär in die Halsmuskulatur nach vorheriger Desinfektion der Injektionsstelle.

5. Gruppe

In dieser Gruppe wurden an Tetanus erkrankte Patienten der Tierärztlichen Klinik der fzmb GmbH in Bad Langensalza, Thüringen, untersucht:

- Von den erkrankten Pferden „Schindler-Jung“ und „Pairo“ war jeweils nur eine Serumprobe vorhanden. Weitere Angaben zu diesen Tieren fehlten.
- Bei der Stute „Tara“ handelte es sich um eine nicht regelmäßig gegen Tetanus geimpfte Stute. Die Stute war klinisch gesund. An Tetanus erkrankt war ihr 4 Monate altes Fohlen.
- Von dem erkrankten Wallach „Prinz“ existierten lediglich zwei Serumproben. Eine vor Therapiebeginn und eine während der Serumtherapie. Weitere Angaben fehlten.

Mäuseseren (Registrierungsnummer: 14-102/07)

Bei den für den SNT genutzten Mäusen handelte es sich um CD1-Mäuse der Firma Charles River Wiga (Sulzfeld, Deutschland). Es wurden insgesamt 72 weibliche Tiere mit einem Körpergewicht zwischen 15-20 Gramm für den Versuch eingestallt.

SNT:

1. Gruppe (je Käfig 5 Tiere)

Impfstoffverträglichkeitstest, Käfig 1:

Den Mäusen wurden unterschiedliche Impfstoffdosen des Tetanusimpfstoffs Equima Te ® (Fa. WdT eG) subkutan injiziert: 20 IE; 15 IE; 10 IE; 7,5 IE; 5 IE.

Die Mäuse wurden nach 4 Wochen unter Narkose entblutet.

2. Gruppe (je Käfig 5 Tiere)

Ermittlung der paralytischen Dosis (PD₅₀):

Den Mäusen wurden je Kiste unterschiedliche Dosen des Tetanustoxin (Fa. Sigma-Aldrich) injiziert:

Käfig 2 → Negativkontrolle NaCl

Käfig 3 → 5 ng/ml

Käfig 4 → 1 ng/ml

Käfig 5 → 0,5 ng/ml

Käfig 6 → 0,1 ng/ml

Die Mäuse wurden bei den ersten Anzeichen der Toxinwirkung unter Narkose entblutet.

3. Gruppe (je Käfig 6 Tiere)

Hier wurde allen Mäusen einer Käfiggruppe die gleiche Menge Impfstoff verabreicht. Je Käfig wurden aber unterschiedliche Impfdosen gewählt:

Käfig 7 → 25 LF/ml

Käfig 8 → 10 LF/ml

Käfig 9 → 2,5 LF/ml

Käfig 10 → 1,25 LF/ml

Käfig 11 → 1 LF/ml

Käfig 12 → 0,5 LF/ml

Käfig 13 → 0,25LF/ml

3 Mäuse einer Käfiggruppe wurden nach 4 Wochen entblutet, den anderen 3 Mäusen wurde 50 x PD₅₀ (= 50 x 5 ng/ml) des Tetanustoxins injiziert.

Die Mäuse wurden bei den ersten Anzeichen der Toxinwirkung unter Narkose entblutet.

Dazu wurden die Mäuse vorher mit Domitor ® (Medetomidin) und Ketamin ® (Ketamin) narkotisiert. Dosierung: 75 mg/kg Ketamin und 1 mg/kg Domitor intraperitoneal.

Alle Blutproben (Pferde, Mäuse) wurden zentrifugiert, um Serum und zelluläre Blutbestandteile zu trennen. Das Serum wurde dann in Kryoröhrchen abpipettiert und bei -20°C gelagert.

Für die Serentestung wurden die Serumproben vor Versuchsbeginn im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und geschwenkt.

Für diese Arbeit wurden ausschließlich Serumproben verwendet, da anzunehmen ist, dass unterschiedliches Probenmaterial (Serum, Plasma, unterschiedliche Gerinnungshemmer) den Anti-Tetanus-IgG-Gehalt nicht beeinflusst (MÜLVERSTEDT, 2006).

3.2. Methoden

3.2.1. Entwicklung, Optimierung und Validierung eines ELISA

Für die Entwicklung des Schnelltests war der Aufbau eines ELISA nötig. Anhand des ELISA wurden erwünschte und unerwünschte Interaktionen der einzelnen Reaktionspartner überprüft. Außerdem wurden die optimalen Konzentrationen der Testreagenzien ermittelt. Die Ergebnisse wurden als Orientierungshilfe und Ausgangsposition für die Entwicklung des Schnelltests genutzt.

Erreicht werden sollte ein/e:

- Auswahl der Coatingreagenz und Festlegung der einzusetzenden Coating-Konzentration
- Prüfung von nichtspezifischen Bindungen anhand verschiedener Block- und Verdünnungspuffer
- Auswahl eines geeigneten Detektions-Antikörpers bzw. -Antigens und seiner einzusetzenden Konzentration
- Sichtbarmachen der Immunkomplexbildung durch geeignetes Substrat

Bei der Erarbeitung des ELISA mussten mehrere Varianten verfolgt werden.

Allgemein gelten für alle ELISA-Varianten:

- Alle Komponenten wurden nach der jeweiligen Inkubationszeit aus den Wells ausgeklopft, mit Ausnahme vom Substrat sTMB.
- Die Mikrotiterplatten wurden zwischen den Inkubationsschritten mit Abdeckklebefolie verschlossen.
- Die Intensität der gebildeten Farbe nach der Substratreaktion ist proportional zur Antigen-Konzentration in den Proben.
- Null-Probe: Hier wurde keine Serumprobe aufgetragen.
- Doppelnull-Probe: Hier wurden keine Serumprobe und kein Detektionsantikörper aufgetragen.

Variante I: Indirekter ELISA

1. Coating: 100 µl/well Tetanustoxoid bzw. Tetanustoxin in verschiedenen Verdünnungen mit CBB
2. Inkubation über Nacht bei 4°C
3. Blocken: 200 µl/well UCDB-Puffer, 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
4. 5 x Waschen mit je 200 µl/well Waschpuffer
5. Auftragen der Probe: Tetanusserum (WdT eG) in verschiedenen Verdünnungen mit PBS-Puffer, 100 µl/well; Inkubation 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
6. 3 x Waschen mit je 200 µl/well Waschpuffer
7. Auftragen des Detektionsantikörpers: *Biotin conjugated goat anti horse IgG*, Verdünnung 1:400.000 mit PBS-Puffer, 100 µl/well; Inkubation 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
8. 3 x Waschen mit je 200 µl/well Waschpuffer
9. Konjugat auftragen: *SA-Poly-HRP*, Verdünnung 1:5000 mit PBS-Puffer, 100 µl/well,
10. Inkubation 30 min. auf dem Schüttler
11. 6 x Waschen mit je 200 µl/well Waschpuffer
12. Substrat auftragen: S(HS)TMB-Lösung, 100 µl/well; Inkubation 15 min. auf dem Schüttler, lichtgeschützt
13. Stoppen der Reaktion mit 8%-iger H₂SO₄-Lösung, 50 µl/well
14. Messen mit dem ELISA-Reader bei 450 nm gegen 620 nm Referenzlichtwelle

Variante II: Doppel-Antigen ELISA

1. Coating: 100 µl/well Tetanustoxoid bzw. Tetanustoxin in verschiedenen Verdünnungen mit CBB
2. Inkubation über Nacht bei 4°C
3. Blocken: 200 µl/well UCDB-Puffer, 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
4. 5 x Waschen mit je 200 µl/well Waschpuffer
5. Auftragen der Probe: Tetanusserum (WdT eG) in verschiedenen Verdünnungen mit PBS-Puffer, 100 µl/well; Inkubation 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
6. 3 x Waschen mit je 200 µl/well Waschpuffer
7. Auftragen des Detektionsantigens: *biotinyliertes Tetanustoxoid*, c = 1,4958 mg/ml, in verschiedenen Verdünnungen mit PBS-Puffer, 100 µl/well; Inkubation 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
8. 3 x Waschen mit je 200 µl/well Waschpuffer

9. Konjugat auftragen: SA-Poly-HRP, Verdünnung 1:5000 mit PBS-Puffer, 100 µl/well; Inkubation 30 min. auf dem Schüttler
10. 6 x Waschen mit je 200 µl Waschpuffer
11. Substrat auftragen: S(HS)TMB-Lösung, 100 µl/well; Inkubation 15 min. auf dem Schüttler, lichtgeschützt
12. Stoppen der Reaktion mit 8%-iger H₂SO₄-Lösung, 50 µl/well
13. Messen mit dem ELISA-Reader bei 450 nm gegen 620 nm Referenzlichtwelle

Variante III: Doppel-Antigen ELISA

1. Coating: 100µl/well Tetanustoxoid in verschiedenen Verdünnungen mit CBB
2. Inkubation über Nacht bei 4°C
3. *Blocken*: Hier wurden mehrere Möglichkeiten getestet:
 - a. 200 µl/well UCDB-Puffer
 - b. 250 µl/well 0,5% BSA in 1x PBS-Puffer
 - c. 100 µl/well 5% Magermilchpulver in 1x PBS-Puffer versetzt mit 0,2% TweenAlle jeweils 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
4. 5 x Waschen mit je 200 µl/well Waschpuffer
5. Auftragen der Probe: Tetanusserum (WdT eG) in verschiedenen Verdünnungen mit PBS-Puffer, 100 µl/well und Pferdeseren in der Verdünnung 1:100 mit PBS, 100 µl/well; Inkubation 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
6. 5 x Waschen mit je 200 µl/well Waschpuffer
7. Auftragen des Detektionsantigens: biotinyliertes Tetanustoxoid, c = 1,338 mg/ml verdünnt mit PBS-Puffer, 100 µl/well; Inkubation 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
8. 5 x Waschen mit je 200 µl/ml Waschpuffer
9. Konjugat auftragen: SA-Poly-HRP, Verdünnung 1:5000 mit PBS-Puffer, 100 µl/well; Inkubation 30 min. auf dem Schüttler
10. 6 x Waschen mit je 200 µl Waschpuffer
11. Substrat auftragen: S(HS)TMB-Lösung, 100 µl/well; Inkubation 15 min. auf dem Schüttler, lichtgeschützt
12. Stoppen der Reaktion mit 8%-iger H₂SO₄-Lösung, 50 µl/well
13. Messen mit dem ELISA-Reader bei 450 nm gegen 620 nm Referenzlichtwelle

Variante IV: Doppel-Antigen ELISA

1. Coating: 100 μl /well Tetanustoxoid in verschiedenen Verdünnungen mit CBB;
2. Inkubation über Nacht bei 4°C
3. 3 x Waschen mit je 300 μl /well 1x PBS-Puffer
4. *Blocken*: 300 μl /well 0,1% BSA in 1x PBS-Puffer; 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
5. 3 x Waschen mit je 300 μl /well 1x PBS-Puffer
6. Auftragen der Probe: Tetanusserum (WdT eG) in verschiedenen Verdünnungen mit PBS-Puffer, 100 μl /well und Pferdeseren in der Verdünnung 1:100 mit PBS, 100 μl /well; Inkubation 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
7. 3 x Waschen mit je 300 μl /well 1x PBS-Puffer
8. Auftragen des Detektionsantigens: biotinyliertes Tetanustoxoid, $c = 1,338 \text{ mg/ml}$ verdünnt mit PBS-Puffer, 300 μl /well; Inkubation 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
9. 2 x Waschen mit je 300 $\mu\text{l/ml}$ Waschpuffer und 3 x Waschen mit je 300 μl 1x PBS-Puffer
10. Substrat auftragen: *OPD in Zitrat-Carbonatpuffer* gelöst, 100 μl /well; Inkubation 15 min. auf dem Schüttler, lichtgeschützt
11. Stoppen der Reaktion mit 8%-iger H_2SO_4 -Lösung, 50 μl /well
12. Messen mit dem ELISA-Reader bei 450 nm gegen 620 nm Referenzlichtwelle

Variante V (endgültiger Assay): Doppel-Antigen ELISA

1. Coating: 100 μl /well Tetanustoxoid verdünnt mit CBB; Inkubation über Nacht bei 4°C
2. 2 x Waschen mit je 300 μl /well Waschpuffer
3. Blocken: 200 μl UCDB-Puffer, 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
4. 1 x Waschen mit 300 μl /well Reinstwasser und 1 x Waschen mit 300 μl /well Waschpuffer
5. Auftragen der Serumproben in der Verdünnung 1:100 mit UCDB-Puffer, 100 μl /well bzw. Eichung mit Tetanusantitoxinstandard (NIBSC) verdünnt mit UCDB-Puffer, 100 μl /well
6. Inkubation 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
7. 2 x Waschen mit je 300 μl /well Waschpuffer
8. Auftragen des Detektionsantigens: 200 μl /well: biotinyliertes Tetanustoxoid,

$c = 1,338 \text{ mg/ml}$ verdünnt mit UCDB-Puffer auf $0,005 \text{ }\mu\text{g/ml}$; Inkubation 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler

9. 2 x Waschen mit je $300 \text{ }\mu\text{l/well}$ Waschpuffer
10. Konjugat auftragen: SA-Poly-HRP, verdünnt 1:5000 mit UCDB-Puffer, $200 \text{ }\mu\text{l/well}$; Inkubation 30 min. auf dem Schüttler
11. 3 x Waschen mit je $300 \text{ }\mu\text{l/well}$ Waschpuffer
12. Substrat auftragen: S(HS)TMB-Lösung, $100 \text{ }\mu\text{l/well}$; Inkubation 5 min. auf dem Schüttler, lichtgeschützt
13. Stoppen der Reaktion mit 8%-iger H_2SO_4 -Lösung, $50 \text{ }\mu\text{l/well}$
14. Messen mit dem ELISA-Reader bei 450 nm gegen 620 nm Referenzlichtwelle

Eichung des ELISA (Variante V)

Die Eichung des ELISA erfolgte mit dem Tetanusantitoxinstandard (NIBSC) mit definierten Einheiten in Dreifachbestimmung. Die Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm Origin.

Auswertung der Testseren

Die Testseren wurden in einer Dreifachbestimmung gemessen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Umkehrfunktion, der aus der Eichung erhaltenen Funktionsgleichung über das Programm Microsoft Office Excel 2003.

3.2.2. Entwicklung, Optimierung und Validierung des Prototyps „Schnelltest“

Die für den Schnelltest genutzte *Reaktionseinheit* besteht aus einer Kunststoffsäule. In sie wird ein $5 \times 5 \text{ mm}$ großer Filter eingebracht („gestopft“). Der Filter ist dreidimensional aufgebaut und basiert auf Polyethylenmaterial. Im weiteren Verlauf wird der Filter als „Fritte“ bezeichnet. Es handelt sich dabei um eine laboreigene, gebräuchliche Bezeichnung der Herstellerfirma (FA. POREX).

Die Fritte hat einen mittleren Porenradius von $50\text{-}80 \text{ }\mu\text{m}$ und einen mittleren Porenvolumenanteil von 50%. Sowohl das Tetanustoxoid als auch die IgGs haben eine Größe von ca. 150 kDa . Im Durchschnitt sind das ungefähr 10 nm . Das bedeutet, dass die Immunglobuline und das Tetanustoxoid ohne spezifische Bindungsreaktionen durch die Filterporen hindurchgleiten können.

Durch Auftragen einer absteigenden Alkoholreihe binden die OH-Gruppen des Alkohols an der Filteroberfläche. Der Filter nimmt hydrophile Eigenschaften an. Diese ermöglichen eine Fixation des Tetanustoxoids an der Filteroberfläche. Das fixierte Tetanustoxoid wiederum geht einen Immunkomplex mit den durchfließenden Tetanusantikörpern ein. An diese bindet dann der Detektionsantikörper, der mit einem Farbstoff optisch detektiert werden kann.

3.2.2.1. Durchflussverfahren

Der Durchfluss diene als Vorversuch für den eigentlichen Assayaufbau des Schnelltests. Beim Durchflussverfahren wird eine Polyethylenfritte der Größe 5 x 5 mm in die Kunststoffssäule gestopft.

Die Interaktionen der einzelnen Testreagenzien sind im ELISA schon getestet worden und waren im Durchfluss daher nicht mehr von Interesse. Hierbei war es wichtig, die geeigneten Konzentrationen der Reagenzien auf den Fritten zu finden.

Die aus ELISA-Variante V erhaltenen Ergebnisse wurden auf das Durchflussverfahren übertragen.

Zusätzlich diene das Durchflussverfahren als Entscheidungshilfe bei der Auswahl des Farbstoffes.

Variante I: (SA-Poly-HRP + STMB)

1. Je eine 5 x 5 mm Fritte wird in eine Kunststoffssäule gestopft.
2. Die Säulen werden in ein Becherglas mit 96%-igem Ethanol gestellt. Dabei muss der Ethanol die Fritten bedecken. Sie werden für 10 Minuten mit Hilfe von Unterdruck entgast und hinterher in den Abicapständer zum Abtropfen gehängt.
3. Auf jede Säule werden 750 µl von 50%-igem Ethanol pipettiert.
4. Dann werden 2 x 750 µl CBB-Puffer auf jede Säule pipettiert. Die Inkubationszeit beträgt jeweils je 20 Minuten.
5. Je Säule werden 750 µl Coatinglösung aufgetragen. Die Coatinglösung ist das mit CBB-Puffer verdünnte Tetanustoxoid in unterschiedlichen Verdünnungsstufen. Die Inkubationszeit beträgt 45 Minuten bei Raumtemperatur.
6. Auf jede Säule werden dann 500 µl Probe in verschiedenen Verdünnungen mit PBS-Puffer aufgetragen. Die Inkubationszeit beträgt 6 Minuten bei Raumtemperatur.

7. Danach werden auf jede Säule 500 µl des Detektionsantigens Tetanus-Biotin in verschiedenen Verdünnungen mit PBS-Puffer aufgetragen. Die Inkubationszeit beträgt 6 Minuten bei Raumtemperatur.
8. Auftragen der Konjugatlösung: SA-Poly-HRP 1:1000 verdünnt mit PBS-Puffer, 500 µl je Säule.
9. 2 x hintereinander werden je Säule 750 µl Waschpuffer aufpipettiert. Dies erfolgt ohne Inkubationszeit.
10. Je 750 µl Substratpuffer werden auf jede Säule pipettiert.
11. Individualkalibration des Abicapreaders.
12. Es werden je 500 µl **STMB-Substrat** auf jede Säule pipettiert. Die Inkubationszeit beträgt 6 Minuten bei Raumtemperatur.
13. Zum Stoppen der Färbereaktion müssen je 750 µl Substratpuffer auf jede Säule pipettiert werden.
14. Individualmessung mit dem Abicapreader.

Variante II (endgültiger Assay): (Abionrot)

1. Je eine 5 x 5 mm Fritte wird in eine Kunststoffsäule gestopft.
2. Die Säulen werden in ein Becherglas mit 96%-igem Ethanol gestellt. Dabei muss der Ethanol die Fritten bedecken. Sie werden für 10 Minuten mit Hilfe von Unterdruck entgast und hinterher in den Abicapständer zum Abtropfen gehängt.
3. Auf jede Säule werden 750 µl von 50%-igem Ethanol pipettiert.
4. Dann werden 2 x 750 µl Säule CBB-Puffer auf jede Säule pipettiert. Die Inkubationszeit beträgt jeweils 20 Minuten.
5. Je Säule werden 750 µl Coatinglösung aufgetragen. Die Coatinglösung ist das mit CBB-Puffer verdünnte Tetanustoxoid in unterschiedlichen Verdünnungsstufen. Die Inkubationszeit beträgt 45 Minuten bei Raumtemperatur.
6. Je 750 µl Waschpuffer werden auf jede Säule aufpipettiert.
7. Auf jede Säule werden dann 500 µl Probe in verschiedenen Verdünnungen mit PBS-Puffer aufgetragen. Die Inkubationszeit beträgt 6 Minuten bei Raumtemperatur.
8. Danach werden auf jede Säule 500 µl des Detektionsantigens Tetanus-Biotin in verschiedenen Verdünnungen mit PBS-Puffer aufgetragen. Die Inkubationszeit beträgt 6 Minuten bei Raumtemperatur.
9. Individualkalibration des Abicapreaders.

10. Je 200 μl **Abionrot** verdünnt mit U1-Puffer werden anschließend auf jede Säule pipettiert. Die Inkubationszeit beträgt 6 Minuten bei Raumtemperatur.
11. Zum Abspülen von überschüssigem Farbstoff werden je 600 μl Reinstwasser auf jede Säule pipettiert.
12. Individualmessung mit dem Abicapreader.

3.2.2.2. Entwicklung des Prototyps „Schnelltest“

Der Aufbau der Reaktionseinheit des Prototyps „Schnelltest“ ähnelt dem des Durchflussverfahrens. Die hier verwendeten Polyethylenfritten sind 5 x 2,5 mm groß. Sie werden über ein vorgeschaltetes Verfahren („Batch“) mit einer definierten Menge des Tetanustoxoids beschichtet.

Batch

Um die Fritten zu aktivieren, müssen sie zuerst eine absteigende Alkoholreihe durchlaufen. Die OH-Gruppen des Alkohols binden dabei an der Filteroberfläche, so dass diese hydrophile Eigenschaften annimmt. Sie ermöglichen die Fixation des Tetanustoxoids an der Filteroberfläche. Dazu werden die Fritten in 96% Ethanol, 250 μl /Fritte, für 10 Minuten unter Vakuum entgast. Anschließend werden die Fritten in 50% Ethanol, 250 μl /Fritte, für 10 Minuten unter Vakuum entgast.

Die optimale pH-Wert-Einstellung für das Beschichten der Fritten wird durch dreimaliges Entgasen unter Vakuum für 10 Minuten in CBB-Puffer erreicht (250 μl /Fritte).

Nach diesen Vorbereitungsschritten folgt das eigentliche Beschichten („Coating“) der Fritten. Pro Fritte wird mit einem Coatingvolumen von 100 μl gerechnet (MIETHE, 2009). Die Coatinglösung besteht je nach Frittenart aus Tetanustoxoid, BSA, biotinyliertem BSA und CBB-Puffer, in der die Fritten über Nacht unter Vakuum gerührt werden. Das BSA dient zum zusätzlichen Absättigen eventuell freier Filterstellen, die nicht vom Tetanustoxoid belegt worden sind. Man setzt eine maximal mögliche Belegung des Filters von 10 μg voraus.

Es wurden unterschiedliche Frittentypen hergestellt:

Messfritten: Hier wurden mehrere Beschichtungskonzentrationen der Fritten getestet. Es wurde eine Beschichtungskonzentration von 5 μg /Fritte Tetanustoxoid und 5 μg /Fritte BSA gewählt.

Positivkontrollfritten: Sie sind beschichtet mit 2 µg/Fritte biotinyliertem BSA und 2,5 µg/Fritte BSA. Das biotinylierte BSA reagiert mit dem Detektionsantigen, das ebenfalls biotinyliert ist.

Negativkontrollfritten: Sie sind mit Blockierungspuffer beschichtet, der verhindert, dass die Testreagenzien an den Fritten haften bleiben.

Trennfritten: Die Trennfritten sind ebenfalls mit Blockierungspuffer beschichtet.

Um die beschichteten Fritten lagerfähig zu machen, wurden sie nach dem Beschichten in einem Wirbelbettrockner getrocknet. Ihre Restfeuchte wurde über den Karl-Fischer-Titrator bestimmt.

Monolayer

Zuerst wurden nur die Messfritten, oben und unten je durch eine Trennfritte begrenzt, in die Säule verbracht. Dieses Modell wird als Monolayer bezeichnet, da nur eine Messebene vorhanden ist.

Es erfolgte eine Probeeichung mit diesem Monolayer.

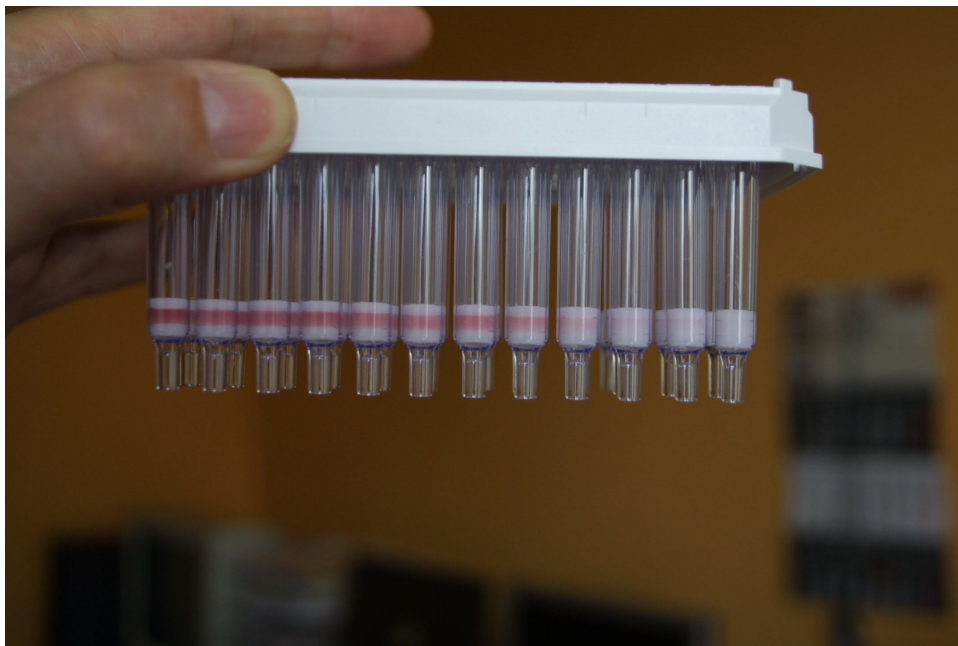


Abb. 1: Eichung des Monolayers, d.h. nur mit einer Messfritte in der Säule

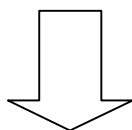
Multilayer

Anschließend wurden die Negativkontrollfritte und die Positivkontrollfritte ergänzt. Bei dem Modell des Multilayers wurden mehrere Anordnungsvarianten getestet.

Jede Messebene wurde dabei von oben und unten jeweils von einer Trennfritte begrenzt.

Dies ist nötig, damit das Messgerät die Fritten klar abgrenzen kann. Gleichzeitig sind die Fritten so auf die Höhe der Messköpfe des Messgeräts ausgerichtet.

Als Anordnung der Fritten in der Säule wurde schließlich folgende Variante gewählt:



Durchflussrichtung

Negativkontrollfritte
Positivkontrollfritte
Messfritte

Abb. 2: Schematische Darstellung der Frittenanordnung in der Säule

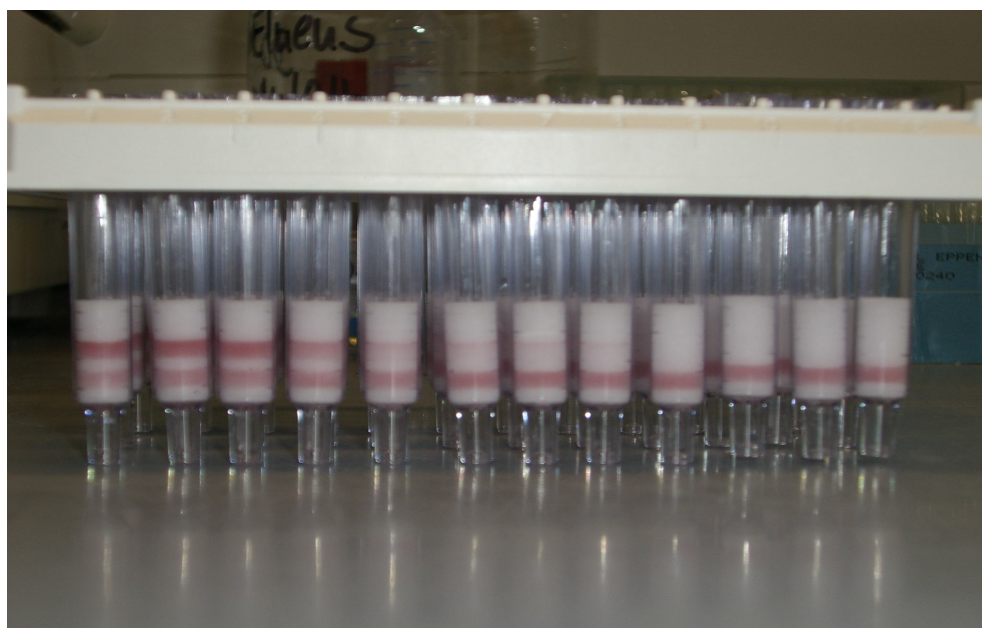


Abb. 3: Eichung Multilayer in der Anordnung Nk, Mf, Pk (von oben beginnend)

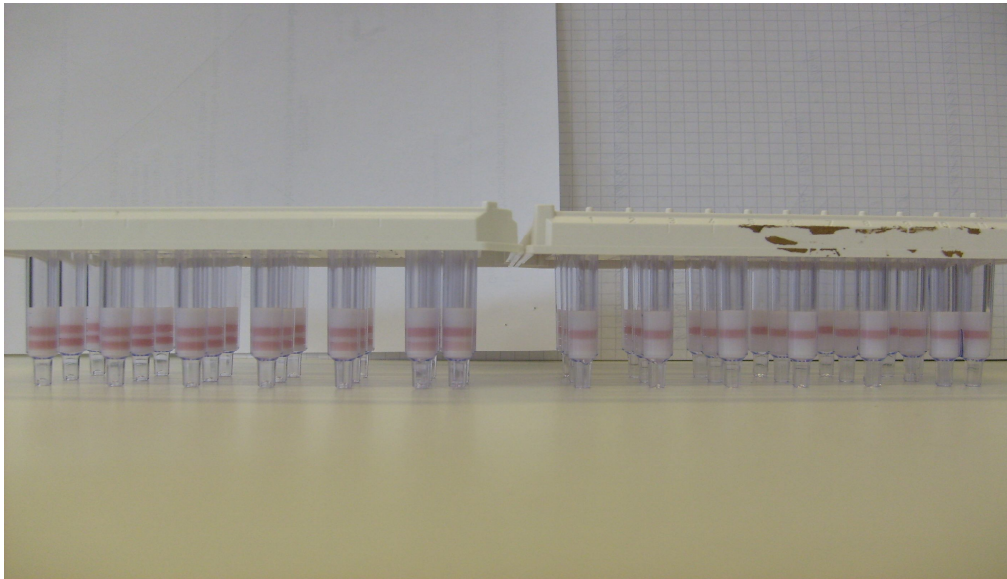


Abb. 4: Eichung Multilayer in Endausführung (Nk, Pk, Mf)

Assayablauf des Prototyps „Schnelltest“:

1. Auftragen von 600 μ l/Säule Waschpuffer.
2. Auftragen der Serumprobe 500 μ l/Säule; 1:10 verdünnt mit UCDB-Puffer, Inkubationszeit 6 Minuten bei Raumtemperatur.
3. Auftragen des Tetanus-Biotin als Detektionsantigen 500 μ l/Säule; 0,5 μ g/ml in UCDB, Inkubationszeit 6 Minuten bei Raumtemperatur.
4. Individualkalibrierung des Messgeräts.
5. Auftragen des Farbstoffs Abionrot; 1:6 verdünnt mit U1-Puffer, Inkubationszeit 6 Minuten bei Raumtemperatur.
6. Auftragen von 600 μ l/Säule Reinstwasser zum Durchspülen.
7. Messen im Messgerät.

An den mit Tetanustoxoid beschichteten Messfritten bleiben die tetanusspezifischen Immunglobuline haften und bilden einen Immunkomplex. Das als Detektionsantigen fungierende Tetanus-Biotin bindet ebenfalls an die Immunglobuline. Das Biotin dient wiederum als Bindungsanker für den Farbstoff.

Eichung des Prototyps „Schnelltest“:

Eine erste Eichung erfolgte mit Tetanusserum (WdT eG).

Die eigentliche Eichung des Prototyps „Schnelltest“ erfolgte wie schon beim ELISA mit Tetanusantitoxinstandard (NIBSC). Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Matlab (wxMaxima) über eine sigmoidale Funktion.

Auswertung der Testseren:

Die Testseren wurden in einer Dreifachbestimmung gemessen. Die Auswertung erfolgte über die Umkehrfunktion der Eichfunktion mit dem Programm Matlab (wxMaxima).

3.2.3. Prüfung auf Kreuzreaktionen

Das Tetanustoxin ist in großen Bereichen homolog zum Botulinum-Neurotoxin (SCHIAVO et al., 1992). Vor allem BoNT/B und TeNT weisen eine strukturelle Ähnlichkeit auf (TURTON et al., 2002). Die höchste Aminosäuresequenzhomologie konnte zwischen BoTN/B und TeNT mit 41% Identität festgestellt werden (REDLI, 2006).

Die Botulinumtoxine (BoTx/B, D, F, G) und das Tetanospasmin erkennen ihr zu spaltendes Substrat, das Synaptobrevin, über zwei Bindungsstellen: eine unspezifische und eine spezifische Bindungsstelle (PELLIZZARI et al., 1995, TONELLO et al., 1995, TURTON et al., 2002). Durch die unspezifische Bindungsstelle können Kreuzreaktivitäten einiger Antikörper gegen Synaptobrevin entstehen (CORNILLE et al., 1995).

Wegen der Ähnlichkeit der Bindungsstelle der Hc-Domäne von BoTN/B und TeNT wird vermutet, dass Interaktionen beider Toxine möglich sind (SWAMINATHAN und ESWARAMOORTHY, 2000).

Daher muss eine mögliche Kreuzreaktivität des im Schnelltest verwendeten Tetanustoxoids mit eventuell in den Serumproben vorhandenen Botulinum-Antikörpern ausgeschlossen werden. Dies könnte möglicherweise falsch positive Ergebnisse hervorbringen.

Mit Hilfe eines ELISA wurde dies überprüft. Als ELISA-Aufbau wurde die Variante V gewählt. Anstelle der Tetanusserumproben wurden positive Botulinumserumproben aufgetragen. Zusätzlich wurde als Positivkontrolle der Tetanusantitoxinstandard genutzt. Als Negativkontrolle wurde UCDB-Puffer aufgetragen.

ELISA-Aufbau zum Prüfen auf Kreuzreaktionen zwischen dem Tetanustoxoid und Botulinumantikörpern in Serumproben:

1. Coating: 100 µl/well Tetanustoxoid verdünnt mit CBB; Inkubation über Nacht bei 4°C
2. 2 x Waschen mit je 300 µl/well Waschpuffer
3. Blocken: 200 µl UCDB-Puffer, 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
4. 1 x Waschen mit 300 µl/well Reinstwasser und 1 x Waschen mit 300 µl/well Waschpuffer
5. Auftragen der Serumproben (mit Botulinum-Antikörpern) in der Verdünnung 1:100 und 1:10 mit UCDB-Puffer, 100 µl/well bzw. Eichung mit Tetanusantitoxinstandard (NIBSC) verdünnt mit UCDB-Puffer, 100 µl/well; Inkubation 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
6. 2 x Waschen mit je 300 µl/well Waschpuffer
7. Auftragen des Detektionsantigens: 200 µl/well: biotinyliertes Tetanustoxoid, $c = 1,338\text{mg/ml}$ verdünnt mit UCDB-Puffer auf $0,005\ \mu\text{g/ml}$; Inkubation 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
8. 2 x Waschen mit je 300 µl/well Waschpuffer
9. Konjugat auftragen: SA-Poly-HRP, verdünnt 1:5000 mit UCDB-Puffer, 200 µl/well; Inkubation 30 min. auf dem Schüttler
10. 3 x Waschen mit je 300 µl/well Waschpuffer
11. Substrat auftragen: S(HS)TMB-Lösung, 100 µl/well; Inkubation 5 min. auf dem Schüttler, lichtgeschützt
12. Stoppen der Reaktion mit 8%-iger H_2SO_4 -Lösung, 50 µl/well
13. Messen mit dem ELISA-Reader bei 450 nm gegen 620 nm Referenzlichtwelle

Zusätzlich konnte die NIBSC nicht garantieren, dass der von ihnen gelieferte Tetanusantitoxinstandard nicht mit Botulinumtoxin kreuzreagiert. Um dies zu überprüfen, wurden die Botulinumtoxine A, B, C, E, F im ELISA getestet. Als Probe wurde der Tetanusantitoxinstandard (NIBSC) gewählt. Als Positivkontrolle wurde das positive Botulinumserum eines Kaninchens genutzt. Zur Detektion des Kaninchenserums wurde ein *Goat-Anti-Rabbit-IgG-HRP*-Antikörper verwendet. Der übrige ELISA-Aufbau wurde vom Tetanus-ELISA (Variante V) übernommen.

ELISA-Aufbau zur Prüfung auf Kreuzreaktionen zwischen dem Antitoxinstandard und Botulinumtoxinen:

1. Coating: 100 µl/well Botulinumtoxin A, B, C, E, F verdünnt mit CBB in einer Konzentration von 100 ng/ml; Inkubation über Nacht bei 4°C
2. 2 x Waschen mit je 300 µl/well Waschpuffer
3. Blocken: 200 µl UCDB-Puffer, 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
4. 1 x Waschen mit 300 µl/well Reinstwasser und 1 x Waschen mit 300 µl/well Waschpuffer
5. Auftragen der Serumproben (1:100) bzw. des Tetanusantitoxinstandards (Verdünnungsreihe) mit UCDB-Puffer, 100 µl/well
6. Inkubation 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
7. 2 x Waschen mit je 300 µl/well Waschpuffer
8. Auftragen des Detektionsantigens: 200 µl/well:
 - biotinyliertes Tetanustoxoid, c = 1,338 mg/ml verdünnt mit UCDB-Puffer auf 0,005 µg/ml;
 - Goat-Anti-Rabbit-IgG-HRP, c = 0,8 mg/ml verdünnt mit UCDB-Puffer auf 1:10000;
9. Inkubation 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
10. 2 x Waschen mit je 300 µl/well Waschpuffer
11. Konjugat auftragen: SA-Poly-HRP, verdünnt 1:5000 mit UCDB-Puffer, 200 µl/well, Inkubation 30 min. auf dem Schüttler
12. 3 x Waschen mit je 300 µl/well Waschpuffer
13. Substrat auftragen: S(HS)TMB-Lösung, 100 µl/well; Inkubation 5 min auf dem Schüttler, lichtgeschützt
14. Stoppen der Reaktion mit 8%-iger H₂SO₄-Lösung, 50 µl/well
15. Messen mit dem ELISA-Reader bei 450 nm gegen 620 nm Referenzlichtwelle

Die Intensität der gebildeten Farbe nach der Substratreaktion ist proportional zur Antigen-Konzentration in den Proben.

Null-Probe: Hier wird keine Serumprobe aufgetragen.

3.2.4. Statistische Auswertung

Die Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Office Excel 2003.

Die Auswertung der Eichung des ELISA erfolgte mit dem Computerprogramm Origin. Die Auswertung der Eichung des Prototyps „Schnelltest“ erfolgte mit dem Computerprogramm Matlab (wxMaxima). Beide Eichfunktionen sind dabei durch die nichtlineare Regression nach der Methode der kleinsten Quadrate festgelegt worden.

Zur Beschreibung des erhobenen Datenmaterials wurden arithmetischer Mittelwert (MW), Standardabweichung (STABW) und Variationskoeffizient (VK) ausgewählt.

Die Graphiken sind ebenfalls mit Microsoft Office Excel 2003 erstellt worden.

4. Ergebnisse

4.1. Ergebnisse Labormethode

4.1.1. ELISA

Eichung

Die Eichung des ELISA erfolgte mit dem Tetanusantitoxinstandard (NIBSC). Das Referenzserum wurde in einer Dreifachbestimmung über sieben Verdünnungsstufen austitriert. Die Auswertung der mit dem ELISA gemessenen Extinktionswerte erfolgte mit dem Computerprogramm Origin.

Die Funktion ist dabei durch die nichtlineare Regression nach der Methode der kleinsten Quadrate festgelegt worden.

Sowohl für die Eichung des ELISA als auch für die Eichung des Prototyps „Schnelltest“ wurden sigmoidale Funktionen gewählt, da sie das dose-response-Verhältnis vieler Assays gut darstellen und mathematisch robust sind (RAAB, 1983).

Die Eichkurve kann mit folgender sigmoidaler Funktion beschrieben werden:

$$y = A_2 + ((A_1 - A_2) / (1 + (X/X_0)^P))$$

$A_1 = 0,01637$	(+/- 0,03023)	(unterer Grenzwert)
$A_2 = 3,6909$	(+/- 0,28822)	(oberer Grenzwert)
$X_0 = 0,008$	(+/- 0,0012)	(Wendepunkt)
$P = 1,13227$	(+/- 0,08575)	(Steigung im Wendepunkt)
X	(eingesetzte Konzentration, IE/ml)	
Y	(gemessene optische Dichte)	

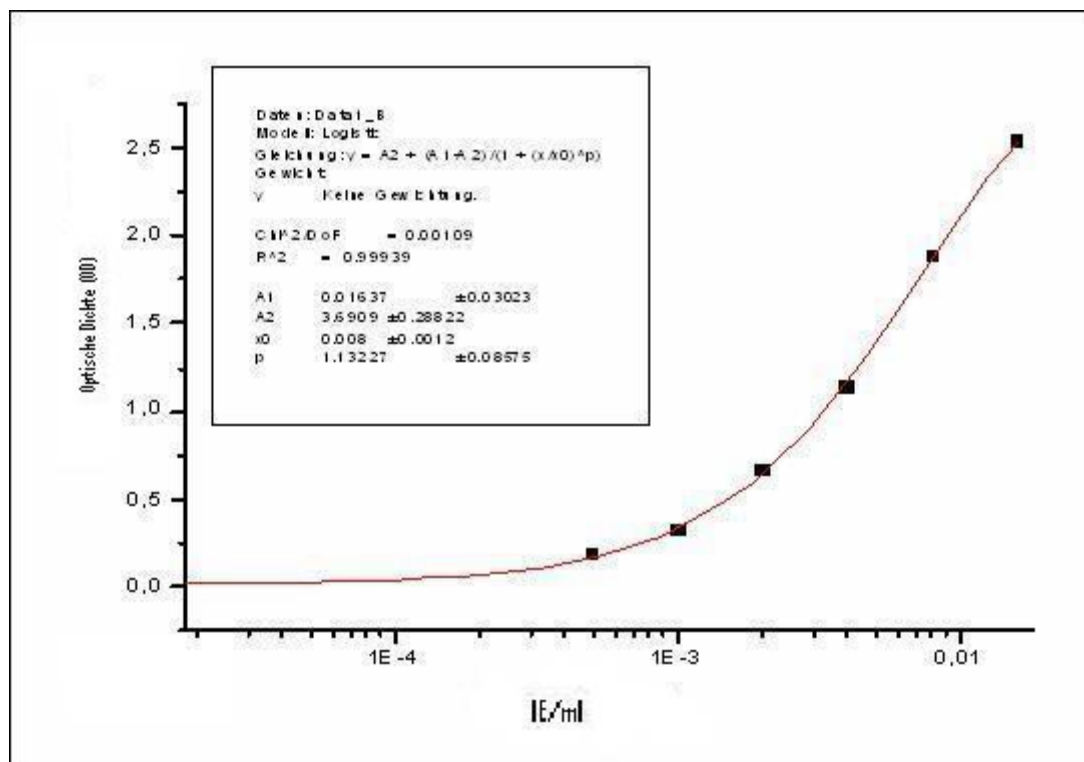


Abb. 5: Eichkurve indirekter ELISA

Auf der x-Achse sind die Konzentrationen der Verdünnungsstufen des Tetanusantitoxinstandards in IE/ml aufgetragen. Der y-Achse sind die zugehörigen Extinktionen zu entnehmen.

Für die Eichung des ELISA beträgt die quadratische Abweichung der Datenpunkte von der Funktion 0,00109. Diese Abweichung kann vernachlässigt werden.

Um auch für Proben unbekannter Konzentrationen eine Aussage treffen zu können, erfolgte eine Umstellung der oben genannten Gleichung nach X (Konzentration, IE/ml).

$$X = X_0 * ((A_1 - y) / (y - A_2))^{(1/P)}$$

Diese Umkehrfunktion ermöglicht es, anhand der gemessenen optischen Dichte einer Probe ihre Antikörperkonzentration an Tetanusantikörpern zu berechnen. Somit wird eine quantitative Titeraussage möglich.

Zusätzlich wurden für die gemessenen Extinktionen der verwendeten Eichkonzentrationen mit Hilfe der Umkehrfunktion die entsprechenden Konzentrationen berechnet.

Die berechneten Konzentrationen stimmten sehr gut mit den eingesetzten Konzentrationen überein. Es ergab sich eine minimale Abweichung in der vierten Nachkommastelle.

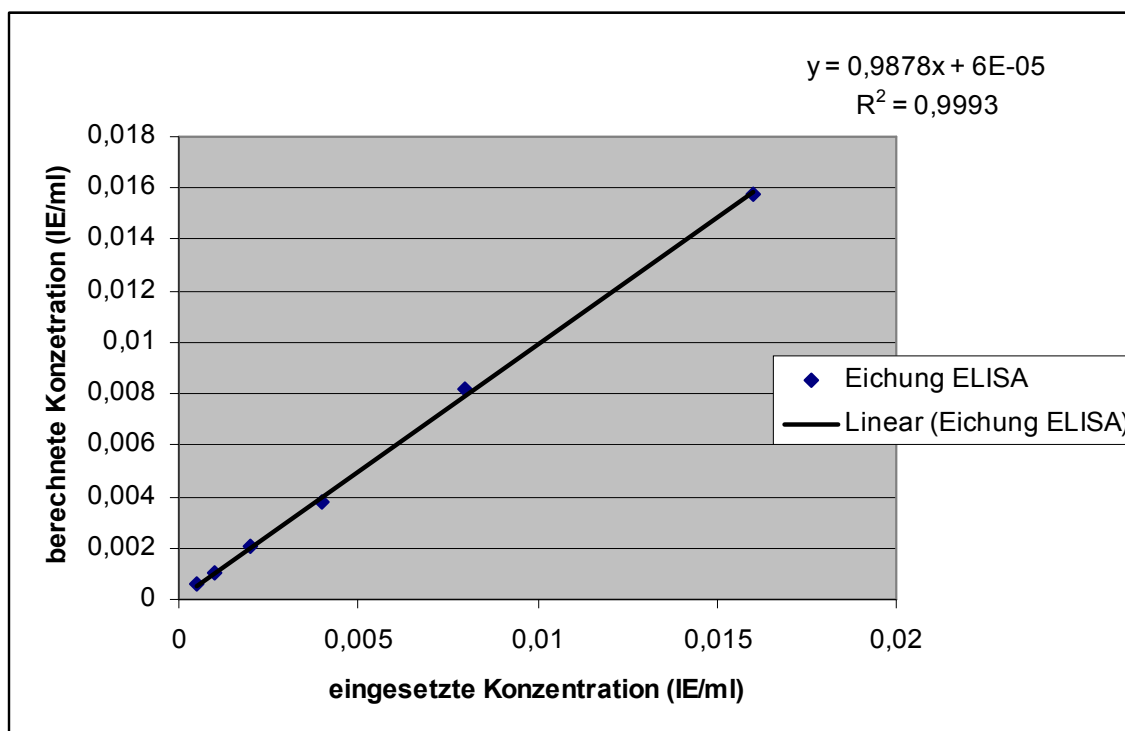


Abb.6: Gegenüberstellung von eingesetzter Konzentration und berechneter Konzentration aus der Eichung des ELISA

In der Graphik wurden die eingesetzte Konzentration und die berechnete Konzentration gegenübergestellt. Die Regressionsgerade spiegelt die Übereinstimmung gut wieder.

Auswertung der Testseren

Mit dem ELISA wurden alle Mäuseseren, aus dem zuvor bereits durchgeführten SNT, getestet. Zusätzlich wurden 86 Pferdeseren getestet. Diese Seren wurden nach dem Zufallsprinzip aus dem vorhandenen Serenpool des Gestüts Meura entnommen.

Die Testung dieser Seren mit dem ELISA ist als Vorarbeit für die spätere Bewertung des Schnelltests zu sehen.

Die Serumproben wurden dreifach in einer 1:100-Verdünnung bestimmt. Mit Hilfe der Umkehrfunktion konnten aus den gemessenen Extinktionen die Konzentrationen in IE/ml abgeleitet werden.

Die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgt unter Kapitel 4.3.

4.1.2. Prototyp „Schnelltest“

Eichung

Die Eichung des Prototyps „Schnelltest“ erfolgte ebenfalls mit dem Tetanusantitoxinstandard (NIBSC). Das Referenzserum wurde in zwölf Verdünnungen in Dreifachbestimmung ausstitriert.

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Matlab (wxMaxima).

Die Eichkurve wird, der Eichung des ELISA entsprechend, mit einer sigmoidalen Funktion beschrieben:

$$y = \text{ODunendl.} + ((\text{OD0} - \text{ODunendl.}) / (1 + (X/\text{EC50})^{\text{SF}}))$$

OD0 = 0,0325267	(unterer Grenzwert)
ODunendl. = 1,49158466	(oberer Grenzwert)
EC50 = 0,09325264	(Wendepunkt)
SF = 1,37987371	(Steigung im Wendepunkt)
X	(eingesetzte Konzentration, IE/ml)
Y	(gemessene optische Dichte)

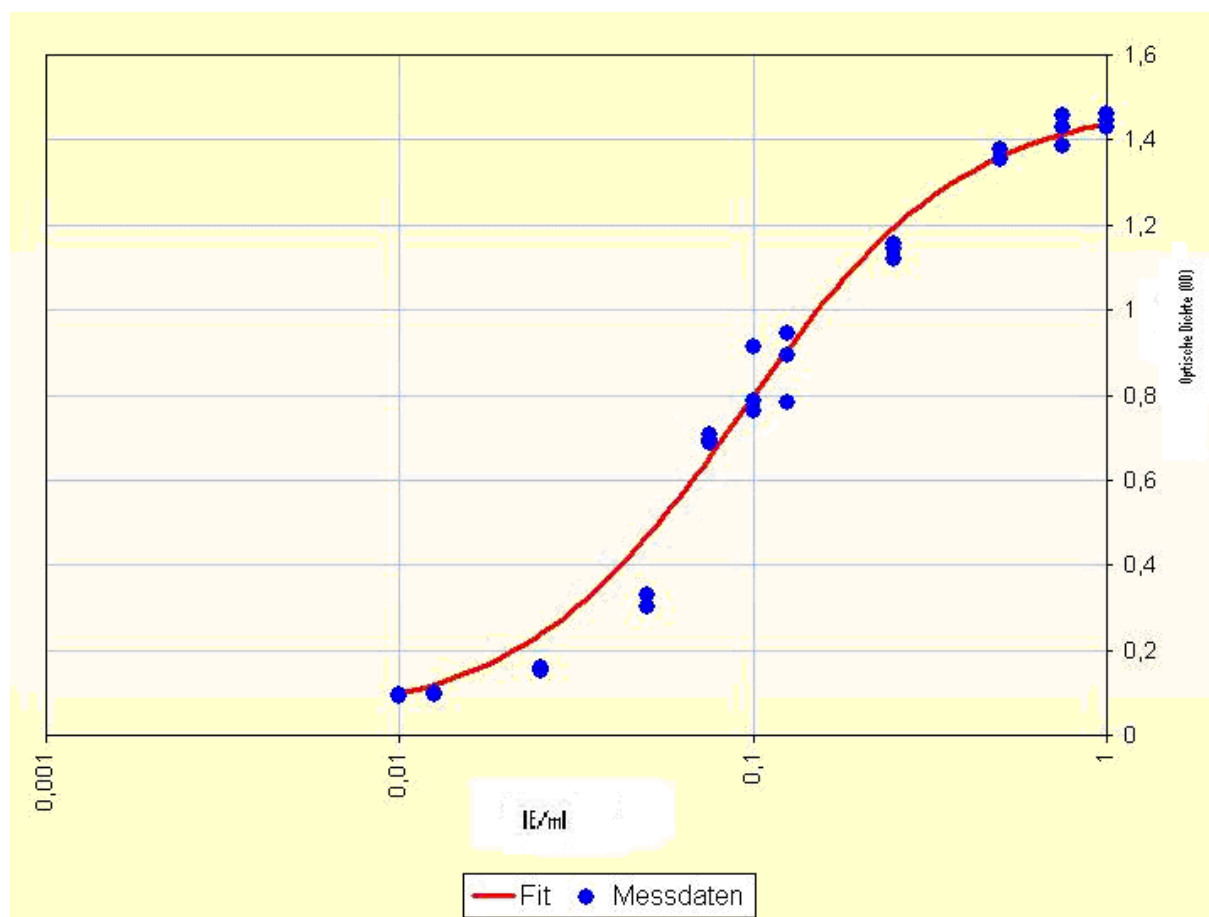


Abb. 7: Eichkurve Prototyp „Schnelltest“

Auf der x-Achse ist die Konzentration des Tetanusantitoxinstandards in IE/ml aufgetragen. Der y-Achse sind die zugehörigen Extinktionen zu entnehmen.

Wie bei dem ELISA wurde auch die Eichfunktion des Prototyps „Schnelltest“ nach X umgestellt. Mit dieser Umkehrfunktion ist es möglich, der gemessenen optischen Dichte unbekannter Proben einen quantitativen Antitetanustiter in IE/ml zuzuordnen.

$$X = EC50 * ((OD0 - y) / (y - OD_{unendl.}))^{(1/SF)}$$

Soll die absolute IgG-Konzentration in mg angegeben werden, muss die berechnete Konzentration IE/ml mit 0,39044 multipliziert werden (1 IE/ml = 0,39044 mg IgG).

Zu beachten ist bei dem Einsatz der Umkehrfunktion zur Berechnung von Konzentrationen gemessener optischer Dichten von unbekanntem Probenkonzentrationen, dass mit ihr nur Konzentrationen bestimmt werden können, die in den Grenzen der auch zur Kalibration genutzten Konzentrationen liegen. Alle Werte darüber, beziehungsweise darunter, können nur

mit „gegen unendlich oder > 1 IE/ml“ beziehungsweise „gegen null oder $< 0,005$ IE/ml“ angegeben werden.

Beim Einsatz des Prototyps „Schnelltest“ für Serumuntersuchungen anderer Spezies darf nie außer Acht gelassen werden, dass die Eichung mit Antitoxinserum vom Pferd durchgeführt worden ist. Eventuell ist eine neue Eichung für den Einsatz bei anderen Spezies nötig.

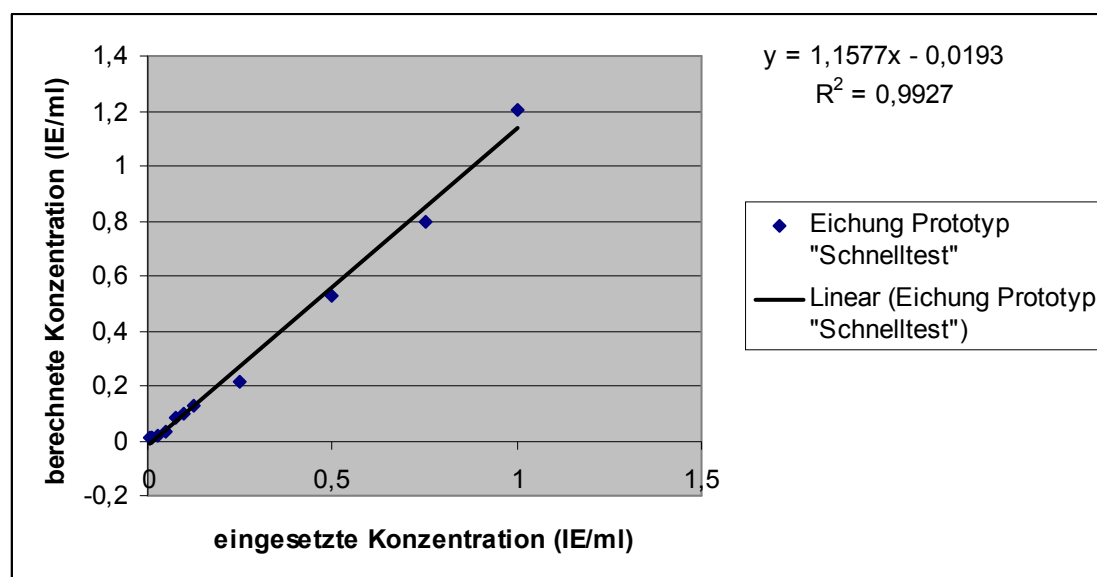


Abb. 8: Gegenüberstellung von eingesetzter Konzentration und berechneter Konzentration aus der Eichung des Prototyps „Schnelltest“

Auch die bei der Eichung des Prototyps „Schnelltest“ gemessenen optischen Dichten des Eichserums wurden mit der Umkehrfunktion in Konzentrationsangaben umgerechnet.

Im Bereich 0,1 IE/ml kann eine sehr geringe Abweichung der berechneten Werte zu den eingesetzten Konzentrationen in der dritten Nachkommastelle beobachtet werden. Werte ober- und unterhalb 0,1 IE/ml zeigen eine größere Abweichung. Nur die Werte 0,0125 IE/ml und 0,01 IE/ml weisen eine noch niedrigere Abweichung als 0,1 IE/ml auf.

Insgesamt kann beim Prototyp „Schnelltest“ eine größere Abweichung der berechneten Werte zu den eingesetzten Konzentrationen beobachtet werden als beim ELISA. Die Regressionsgerade spiegelt dies wieder.

Für die Eichung des Prototyps „Schnelltest“ beträgt die quadratische Abweichung der Datenpunkte von der Kurve nach der Methode der kleinsten Quadrate 0,0034. Hierbei handelt es sich um eine annehmbare Abweichung.

Intraassay

Mit der Durchführung des Intraassay wird die Messwertstreuung innerhalb eines Versuchsansatzes überprüft.

Dazu wurden dieselben Proben unter denselben Bedingungen in Parallelen an einem Tag getestet. Für alle Probenbestimmungen wurden dieselben Lösungen und derselbe Puffer verwendet. Die gesamte Probenbestimmung wurde von einer Person vorgenommen.

Um einen möglichst weit gefächerten Bereich abzudecken, wurden vier Probenkonzentrationen des Tetanusantitoxinstandards (NIBSC) (Blindwert, low, medium, high) gewählt. Von den Proben wurde eine Elffachbestimmung durchgeführt. Es wurden also insgesamt 44 Proben bestimmt.

Für die quadratische Abweichung ergab sich ein Wert von 0,00136. Hierfür sind alle 44 Einzelwerte berücksichtigt worden.

Die Funktion der durch die Einzelmesswerte gelegten Idealkurve entspricht der Funktion der Eichung.

Die Werte der Funktionsparameter weichen dabei von den Werten der Funktionsparameter der Eichung ab.

$$y = \text{ODunendl.} + ((\text{OD0} - \text{ODunendl.}) / (1 + (X / \text{EC50})^{\text{SF}}))$$

OD0 = 0,0765 (unterer Grenzwert)

ODunendl. = 1,827 (oberer Grenzwert)

EC50 = 0,170 (Wendepunkt)

SF = 1,114 (Steigung im Wendepunkt)

X (eingesetzte Konzentration, IE/ml)

Y (gemessene optische Dichte)

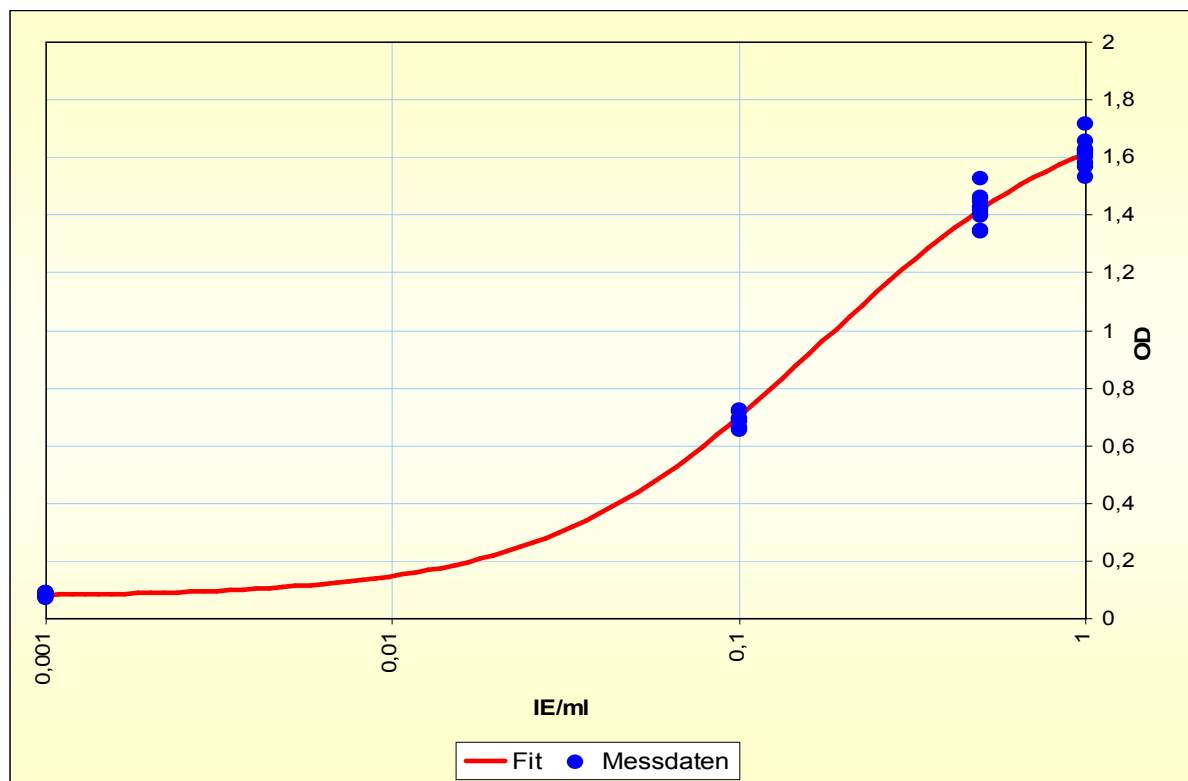


Abb. 9: Kurvendarstellung Intraassay

Der Cut off für den ELISA wird in der Literatur mit 0,1 IE/ml angegeben. Das heißt, es wird empfohlen, Tiere mit Antikörpertitern unterhalb 0,1 IE/ml zu impfen. Unterhalb dieser Antikörperkonzentration kann eine Schutzwirkung nicht mehr vorausgesetzt werden. Ziel ist es, mit dem Schnelltest ähnliche Werte zu erreichen.

Daher wurde zur Berechnung des Cut off für den Prototyp „Schnelltest“ die gemessene Extinktion der Proben mit der Konzentration 0,1 IE/ml herangezogen.

Der Cut off berechnet sich aus dem Mittelwert der 11 gemessenen Extinktionen der Probenkonzentration 0,1 IE/ml plus ihrer dreifachen Standardabweichung (GROSSE-HERRENTHEY, 2004). Er drückt die Unterscheidungsgrenze zwischen ausreichendem Impfschutz und Impfwürdigkeit aus.

$$\text{Cut off} = \text{MW} + 3 * \text{STABW} \rightarrow 0,686 + 3 * 0,025 = 0,761 \text{ OD}$$

Für den Cut off ergibt sich somit:

Seren mit einer Extinktion $> 0,761$ OD sind als sicher positiv einzustufen.

Ergebnisse

Der Schwellenwert berechnet sich aus dem Mittelwert der 11 gemessenen Extinktionen für die Probenkonzentration 0,1 IE/ml plus ihre einfache Standardabweichung (GROSSE-HERRENTHEY, 2004):

$$\text{Schwellenwert} = \text{MW} + \text{STABW} \rightarrow 0,686 + 0,025 = 0,711 \text{ OD}$$

Somit sind Proben mit einer Extinktion zwischen 0,711 OD und 0,736 OD als fraglich einzustufen, d.h. falsch positiv oder falsch negativ.

Proben > 0,736 OD sind als sicher positiv zu bewerten. Proben < 0,711 OD sind als sicher negativ zu beurteilen.

Bezogen auf die Konzentrationsangaben IE/ml bedeutet dies:

$$\text{Cut off} = 0,0801 \text{ IE/ml} + 3 * 0,004 = 0,0921 \text{ IE/ml}$$

$$\text{Schwellenwert} = 0,0801 \text{ IE/ml} + 0,004 = 0,0841 \text{ IE/ml}$$

Das heißt, Proben mit einer Konzentration zwischen 0,0921 IE/ml und 0,0841 IE/ml sind als fraglich zu bewerten.

Proben > 0,0921 IE/ml sind als sicher positiv anzusehen und verfügen über einen ausreichenden Impfschutz. Dagegen sind Proben < 0,0841 IE/ml als sicher negativ einzustufen und verfügen über keinen ausreichenden Impfschutz.

Für alle im Intraassay eingesetzten Probenkonzentrationen ist die jeweilige Standardabweichung mit Microsoft Office Excel 2003 berechnet wurden. Sie gibt wieder, inwieweit die jeweiligen Werte der Grundgesamtheit um den Durchschnitt streuen.

$$S := \sqrt{S^2} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} \quad (\text{WEISSTEIN, 2011})$$

n = Stichprobenumfang

x_i = Merkmalsausprägung am i-ten Element der Stichprobe

\bar{x} = der empirische Mittelwert, also das arithmetische Mittel der Stichprobe

Zusätzlich ist der Variationskoeffizient (VK) für die einzelnen Konzentrationen berechnet worden. Er bringt den Grad der Messwertstreuung einer Probenkonzentration innerhalb eines Versuchsansatzes zum Ausdruck.

Der Variationskoeffizient berechnet sich nach folgender Formel (Microsoft Office Excel):

$$VK = STABW / x * 100 (\%)$$

Tab. 2: Messwerte Intraassay

Probe	MW (OD)	STABW	VK (%)
High: 1IE/ml	1,613	0,046	2,877
Medium: 0,5IE/ml	1,422	0,05	3,490
Low: 0,1IE/ml	0,686	0,025	3,637
Blindwert: 0IE/ml	0,082	0,006	7,654

Die berechneten Variationskoeffizienten der Proben zeigen eine Messwertstreuung unter 5%. Mit sinkender Probenkonzentration ist eine zunehmende Messwertstreuung zu beobachten. Der Blindwert überschreitet sogar die 5%-Grenze.

Interassay

Im Interassay wird die Reproduzierbarkeit der Probenmessungen des Prototyps „Schnelltest“ überprüft.

Dabei wurden über einen längeren Zeitraum unter unterschiedlichen Bedingungen (unterschiedliche Raumtemperatur, Luftfeuchte und unterschiedliches Personal) wiederholt gleiche Probenkonzentrationen hergestellt und gemessen.

Wie schon im Intraassay wurden auch im Interassay unterschiedliche Probenverdünnungen des Tetanusantitoxinstandards genutzt. Der Versuch erstreckte sich über 5 Wochen, wobei die Tage für die Probestestungen willkürlich gewählt wurden. Insgesamt wurden an 14 Tagen Proben gemessen.

Die einzelnen Probenkonzentrationen wurden jeweils in Doppelbestimmung gemessen.

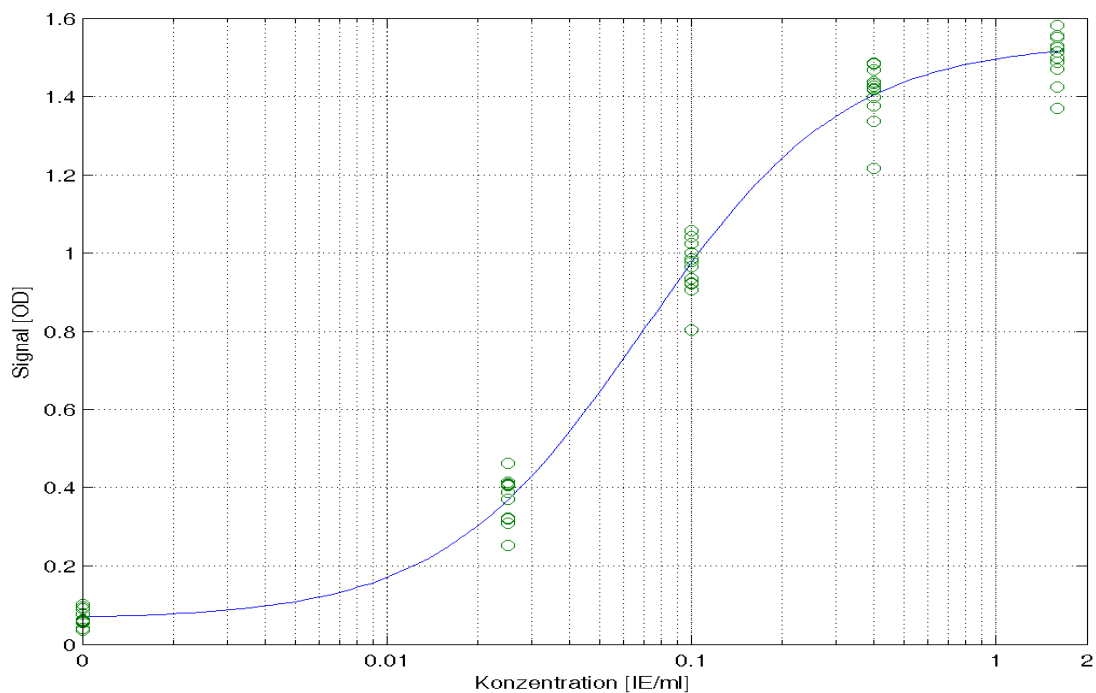


Abb. 10: Kurvendarstellung Interassay

Die Berechnung der Standardabweichungen und der Variationskoeffizienten erfolgte entsprechend dem Intraassay.

Tab. 3: Messwerte Interassay

Probe	MW (OD)	STABW	VK(%)
1,6 IE/ml	1,51	0,06	3,82
0,4 IE/ml	1,41	0,07	4,88
0,1 IE/ml	0,97	0,07	6,90
0,025 IE/ml	0,37	0,06	15,38
0 IE/ml	0,07	0,02	31,22

Der für alle Probenkonzentrationen berechnete Variationskoeffizient überschreitet eine Streuung von 20% nicht. Auffällig ist, dass der Variationskoeffizient unterhalb des vorher berechneten Cut off stark zunimmt und die einzelnen Messwerte hier untereinander stärker variieren. Dies entspricht auch den Ergebnissen des Intraassay.

Spezifität / Selektivität

Die Spezifität charakterisiert die Fähigkeit des Prototyps „Schnelltest“, den gesuchten Analyten (Tetanusantitoxin) eindeutig zu erfassen.

Es mussten eventuelle Kreuzreaktivitäten des Prototyps „Schnelltest“ mit anderen im Blut befindlichen Antikörpern abgeklärt werden, um falsch positive Aussagen zu vermeiden. Im Speziellen musste eine Kreuzreaktivität des Tetanustoxoids mit eventuell in den Serumproben vorhandenen Botulinumtoxin-Antikörpern ausgeschlossen werden. Dies war nötig, da das Tetanustoxin in großen Bereichen homolog zum Botulinumneurotoxin ist.

Die Kreuzreaktivität wurde über den ELISA, Variante V, getestet. Als Proben wurde Botulinum-Antikörper-positive Kaninchenserum und der Tetanusantitoxinstandard als Positivkontrolle verwendet.

Im Verlauf konnte keine Kreuzreaktivität nachgewiesen werden:

Tab. 4: Messwerte Kreuzreaktivität

Probe	MW (OD)
Bot.-pos. Kaninchen, 1:100	0,014
Bot.-pos. Kaninchen, 1:10	0,013
Positivkontrolle 0,016 IE/ml	3,008
Blindwert / Null	0,024

Bei der Positivkontrolle konnte eine eindeutige Extinktion gemessen werden. Die Extinktionen der Botulinumserum waren wesentlich niedriger als die der Positivkontrolle und des Blindwertes. Aufgrund des niedrigen Signals kann angenommen werden, dass das Tetanustoxin keine Botulinumantikörper nachweist.

Über einen weiteren ELISA wurde ausgeschlossen, dass der Tetanusantitoxinstandard mit den Botulinumtoxinen A, B, C, E, F kreuz reagiert.

Sensitivität

Im Fall des Prototyps „Schnelltest“ drückt die Sensitivität den Prozentsatz derjenigen Proben aus, die vom Test als richtig positiv, also mit einem Titer oberhalb des Cut off, erkannt werden.

Ausgedrückt wird dies durch die Formel (LORENZ, 1996):

$$RP / (RP + FN) * 100$$

RP = richtig positive Probenzahl

FN = falsch negative Probenzahl

Da der Impfstatus der beprobten Pferde bekannt war, konnte der Abgleich zwischen realen Daten und im Schnelltest gemessenen Werten vorgenommen werden.

Dazu mussten die Daten in drei Gruppen eingeordnet werden:

- 1) sicher negativ = < 0,0841 IE/ml
- 2) fraglich = 0,0841 – 0,0921 IE/ml
- 3) sicher positiv = > 0,0921 IE/ml

Ausgewertet wurden 92 Serumverlaufspuren von 37 Stuten aus dem Zeitraum von August 2004 bis November 2004. Diese Stuten waren regelmäßig geimpft worden und als richtig positiv zu erwarten (geimpft 3/2004 und 5.4.2005).

Bei der Auswertung dieser Seren mit dem Prototyp „Schnelltest“ waren von 92 Proben 88 Proben sicher positiv. 4 Proben wurden als sicher negativ gemessen. Fraglich war keine Probe.

Somit wurden 95,65% der Proben vom Prototyp „Schnelltest“ als richtig positiv erkannt.

Nur 4,35% wurden als falsch negativ bewertet. Der Test hatte sie als sicher negativ deklariert.

4.2. Ergebnisse der Serentestung mit dem Prototyp „Schnelltest“

Alle Serumproben wurden in Dreifachbestimmung gemessen. Aus ihnen wurde dann der Mittelwert gebildet, der für die weitere Auswertung genutzt wurde.

1. Gruppe

Die Gruppe umfasste 37 tragende Altstuten. Die Stuten unterlagen einem regelmäßigen jährlichen Impfrhythmus. Die letzte Impfung war am 5.4.2004. Die Probennahme umfasste die Periode von August bis November 2004.

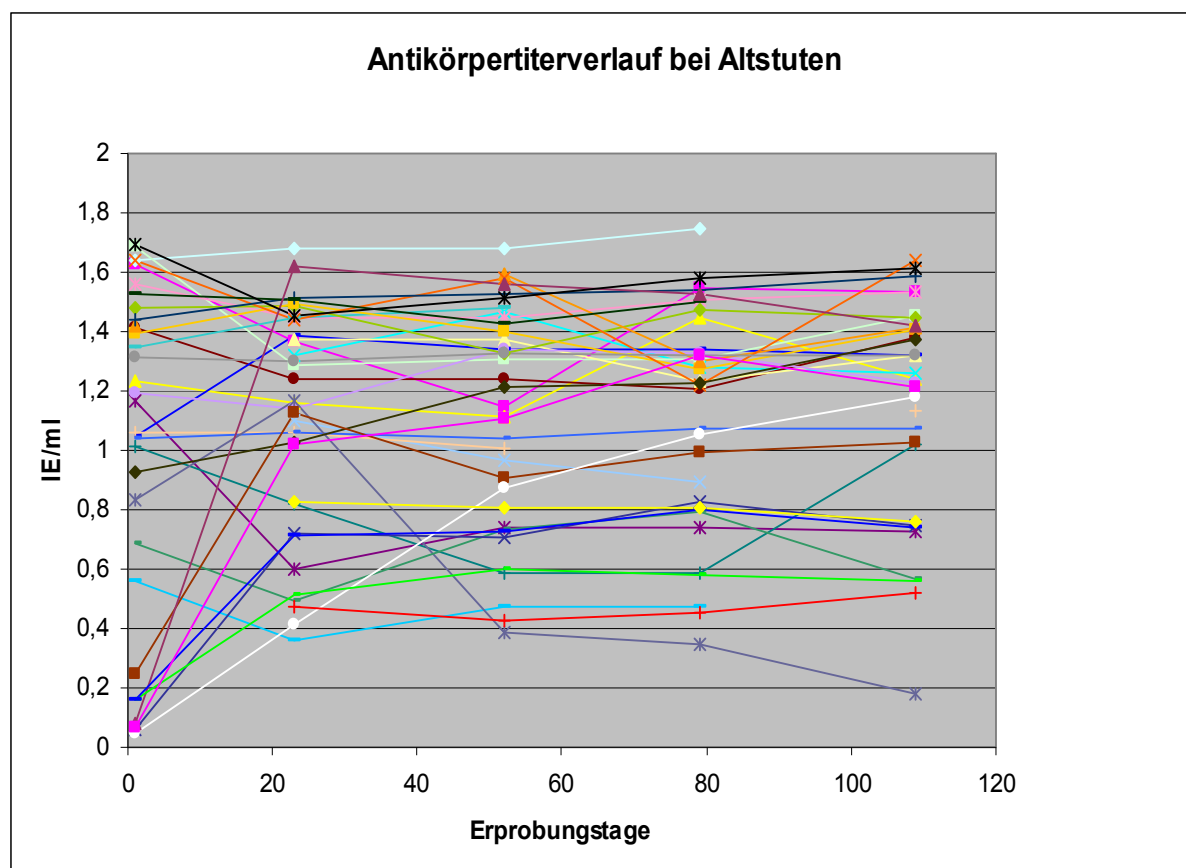


Abb. 11: Einzeltiterverläufe der Altstuten

Ergebnisse

In dem Diagramm sind die Titerverläufe der Einzeltiere dargestellt.

Der y-Achse sind die Titerkonzentrationen in IE/ml, der x-Achse der Probenzeitraum zu entnehmen.

Durch die Zusammenfassung aller Einzeltiterverläufe wurde die hohe Schwankungsbreite der Antikörpertiter innerhalb der geimpften Stutenherde deutlich. Die Titer reichten von 0,4 IE/ml-1,8 IE/ml.

Bei einigen Stuten waren geringgradige Schwankungen im Titerverlauf zu beobachten. Ihre Messkurven glichen einer leichten Wellenbahn, die sich innerhalb einer minimalen Toleranz zu bewegen schien. Insgesamt waren in der Stutenherde keine augenscheinlichen Titerveränderungen zu beobachten.

Bei 7 Stuten wurde zum ersten Erprobungstermin nur ein Titer im unteren Bereich um 0,3 IE/ml gemessen. Zum zweiten Erprobungstermin 3 Wochen später wiesen alle 7 Stuten eine ähnliche Titerhöhe wie die restlichen Stuten auf.

Auch der weitere Titerverlauf entsprach dem der restlichen Stutenherde.

2. Gruppe

In dieser Gruppe wurden 10 hochtragende Stuten die letzten Wochen *a.p.* bis 100 Tage *p.p.* beprobt. Der Erprobungszeitraum umfasste die Zeit von Januar bis Mai 2005. Die Stuten sind regelmäßig geimpft worden. Die letzte Impfung erfolgte am 5.4.2005, gekennzeichnet durch den Pfeil im Diagramm.

Die Fohlen dieser Stuten bildeten die Gruppe 3.

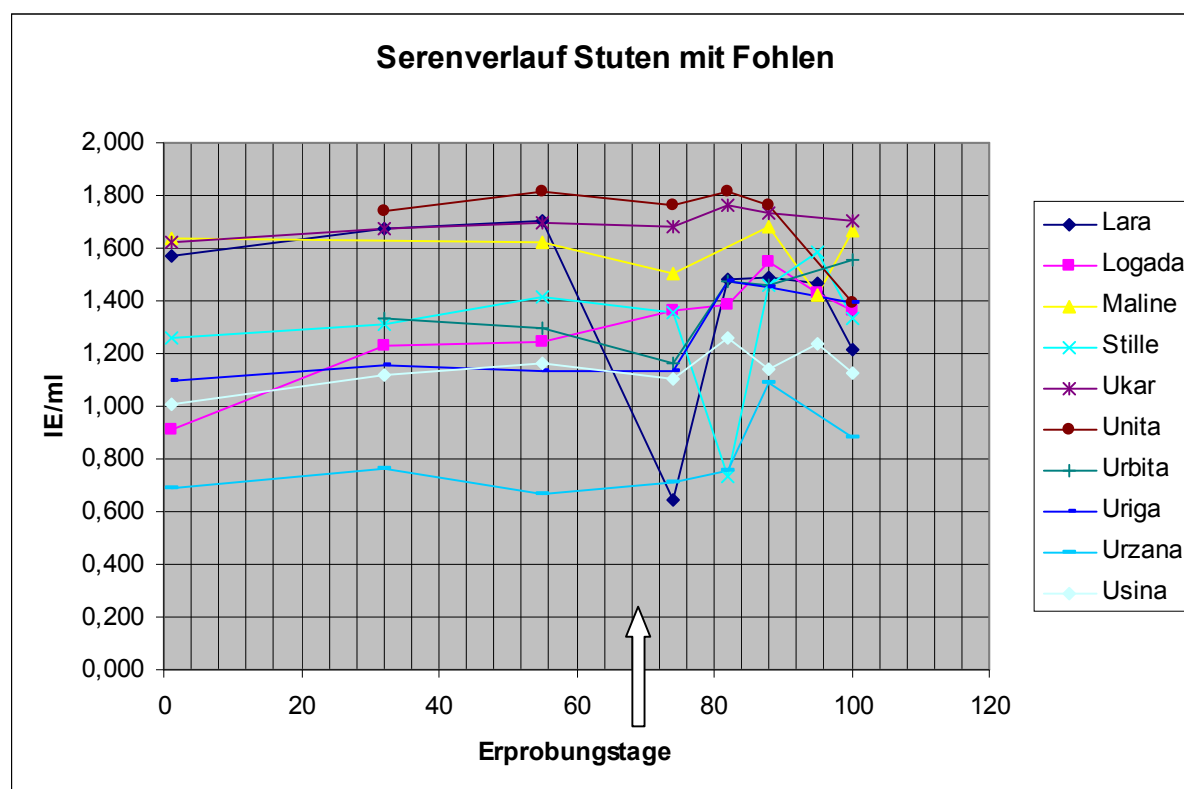


Abb. 12: Einzeltiterverläufe der Stuten mit Fohlen

Bis zum Impftermin konnten ähnliche Titerverläufe wie bei der Gruppe 1 beobachtet werden. Die Einzeltiter reichten von 0,7 IE/ml-1,8 IE/ml. Alle Einzeltiter behielten bis zur Impfung ihr Niveau bei.

14 Tage nach der Impfung konnte bei jeder Stute ein individueller Titeranstieg beobachtet werden. Allerdings handelte es sich bei den Titeranstiegen nur um Werte zwischen 0,2-0,8 IE/ml.

Die Tiere mit einem vor der Impfung niedrigeren Ausgangstiter (Urzana, Urbita, Uriga) bildeten eine stärkere Antikörperantwort auf die Impfung aus als die Tiere mit einem vor der Impfung höheren Ausgangstiter (Unita, Ukar).

Ca. 30 Tage nach der Impfung fielen die Titer wieder ab und bewegten sich in Richtung ihrer Ausgangswerte vor der Impfung.

Zwei Stuten (Lara, Stille) zeigten 3 bzw. 9 Tage nach der Impfung einen kurzen Titerabfall. Im weiteren Verlauf stiegen aber auch ihre Titer an. Sie waren vergleichbar mit den anderen Titern.

Die Werte des letzten Erprobungstages zeigten eine abfallende Tendenz.

3. Gruppe

Die Gruppe 3 setzte sich aus 6 Saugfohlen von Stuten der Gruppe 2 zusammen. Sie wurden über ein halbes Jahr lang erprobt, begonnen direkt nach der Geburt im Februar 2005 bis September 2005.

Dabei wurden drei Fohlen am 155. Erprobungstag grundimmunisiert. Am 188. Tag erfolgte die Boosterung.

(Die Impfungen sind durch Pfeile im Diagramm gekennzeichnet).

Die Fohlen waren hier ungefähr 4,5 Monaten alt. Die anderen 3 Fohlen wurden nicht geimpft. Die Mutterstuten wurden nur im Frühjahr 2004 geboostert. Es erfolgte keine zusätzliche Boosterung während der Trächtigkeit.

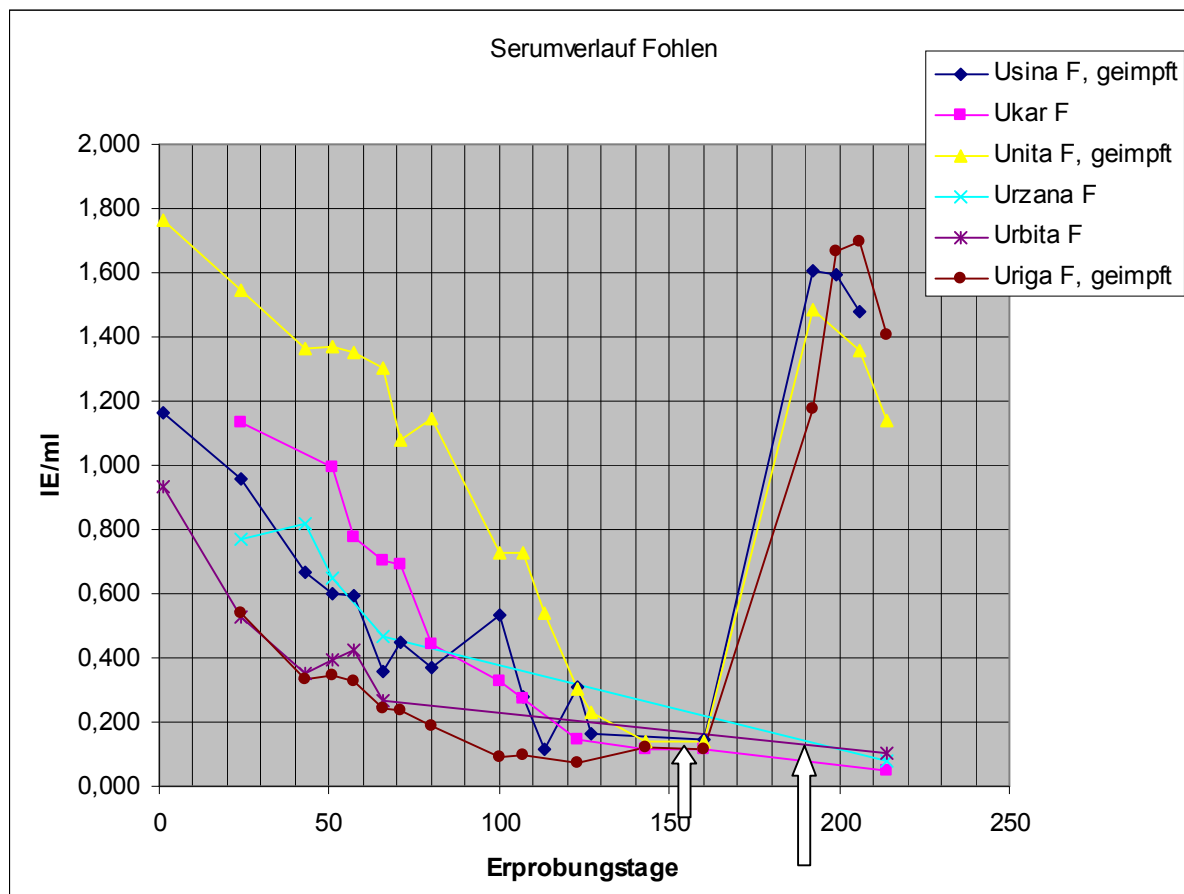


Abb. 13: Einzeltiterverläufe Fohlen

Anschließend sind die Einzeltiertiterverläufe (IE/ml) über den Erprobungszeitraum dargestellt worden. Anhand der Einzeltiervläufe wurde deutlich, wie hoch die Schwankungsbreite auch innerhalb der Fohlengruppe war.

Beim Vergleich der Anfangstiter der Fohlen mit den Titern der Mutterstuten fiel auf, dass diese ungefähr gleich waren. Die Anfangstiter der Fohlen reichten von 1,762 IE/ml-0,934 IE/ml. Zu diesem Zeitpunkt waren die Fohlen etwa eine Woche alt. Um den 80. Lebenstag hatte sich der Antikörpertiter bei allen Fohlen ungefähr halbiert.

Bei einem untersuchten Fohlen (Uriga F) unterschritt der Anti-Tetanus-Gehalt die Cut off-Grenze von 0,0921 IE/ml und sogar den Schwellenwert von 0,0841 IE/ml. Zu beobachten war dies im Zeitraum zwischen dem 100. Beprobungstag bis zum Tag der Grundimmunisierung (155. Tag). Für diesen Zeitraum war das Fohlen seronegativ.

Die anderen Fohlen lagen in diesem Zeitraum noch über dem Cut off-Wert.

Ergebnisse

Bei den 3 geimpften Fohlen konnte ein Titeranstieg schon 10-14 Tage nach der ersten Impfung beobachtet werden. Nach der Boosterung wurden Titer zwischen 1,5 und 1,7 IE/ml erreicht.

Bei den nicht geimpften Fohlen sank der Antikörpergehalt stetig. Bei der letzten Beprobung am 214. Tag unterschritten Urzana F und Ukar F die Cut off-Grenze und den Schwellenwert, sie waren somit seronegativ. Urbita F lag mit 0,106 IE/ml noch geringgradig darüber. Zu diesem Zeitpunkt waren die Fohlen ungefähr 7 Monate alt.

Das folgende Diagramm erfasst das arithmetische Mittel aus den Serumtitern der 3 geimpften Fohlen bezogen auf die Erprobungstage über den Zeitraum der Erstimpfung. Um die Betrachtung des Titerverlaufs während der Grundimmunisierung übersichtlicher zu gestalten, wurden die vergleichbaren Einzeltiterverläufe der Fohlen zusammengefasst.

(Die Impfungen sind durch Pfeile im Diagramm gekennzeichnet).

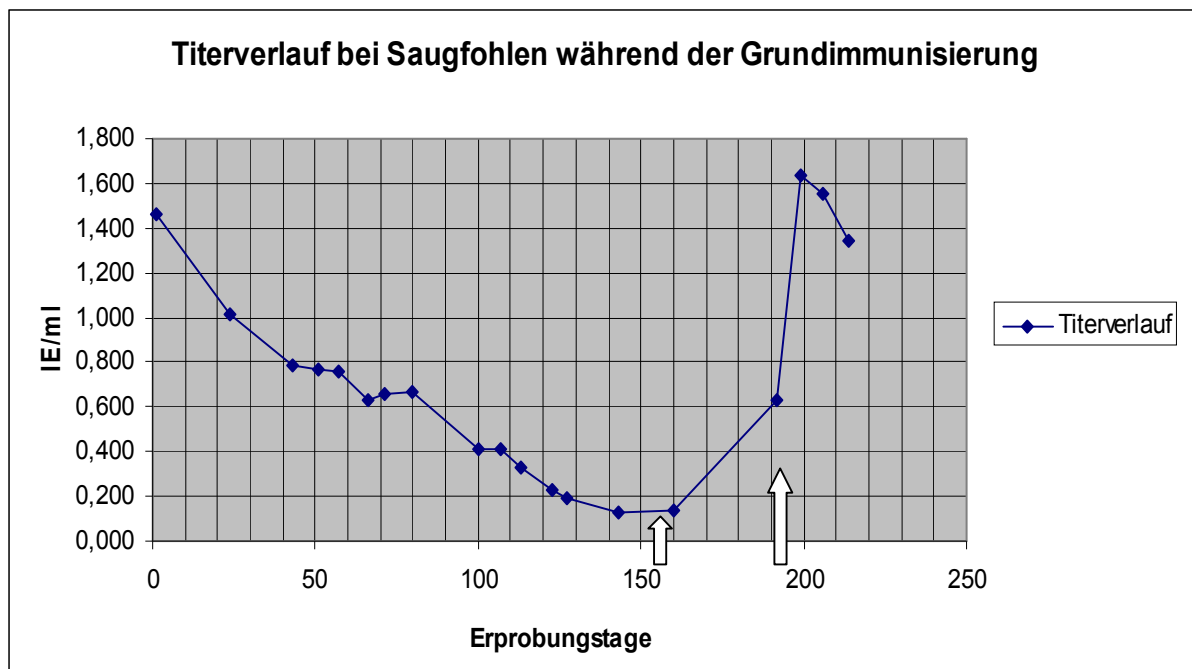


Abb. 14: Durchschnittlicher Titerverlauf beim Saugfohlen während der Grundimmunisierung

10-14 Tage nach der Grundimmunisierung war ein Titeranstieg zu messen. 5 Tage nach der Boosterung war nochmals eine Zunahme der Titerverlaufskurve zu beobachten. Nach der Grundimmunisierung konnte ein höherer Antikörpertiter gemessen werden als bei den

regelmäßig geimpften Altstuten. Der Titer war von ungefähr 0,15 IE/ml vor der ersten Impfung auf 1,6 IE/ml nach der Boosterung angestiegen.

2 Wochen nach der Boosterung konnte erneut ein Titerabfall ähnlich dem der Altstuten beobachtet werden.

4. Gruppe

Zu dieser Gruppe zählten 9 Jährlingsstuten, geboren im Winter/Frühjahr 2004/2005. Im Impfgeme des Gestüts Meura wurden die Jungtiere erst als Jährlinge gegen Tetanus grundimmunisiert. Der Erprobungszeitraum erstreckte sich von Februar bis September 2005. Der Zeitraum umfasste den Titerverlauf vor der Grundimmunisierung und seine Entwicklung im Verlauf der Grundimmunisierung. Die erste Impfung erfolgte am 30.3.2005, die Boosterung wurde am 29.4.2005 vorgenommen.

(Die Impfungen sind durch Pfeile im Diagramm gekennzeichnet).

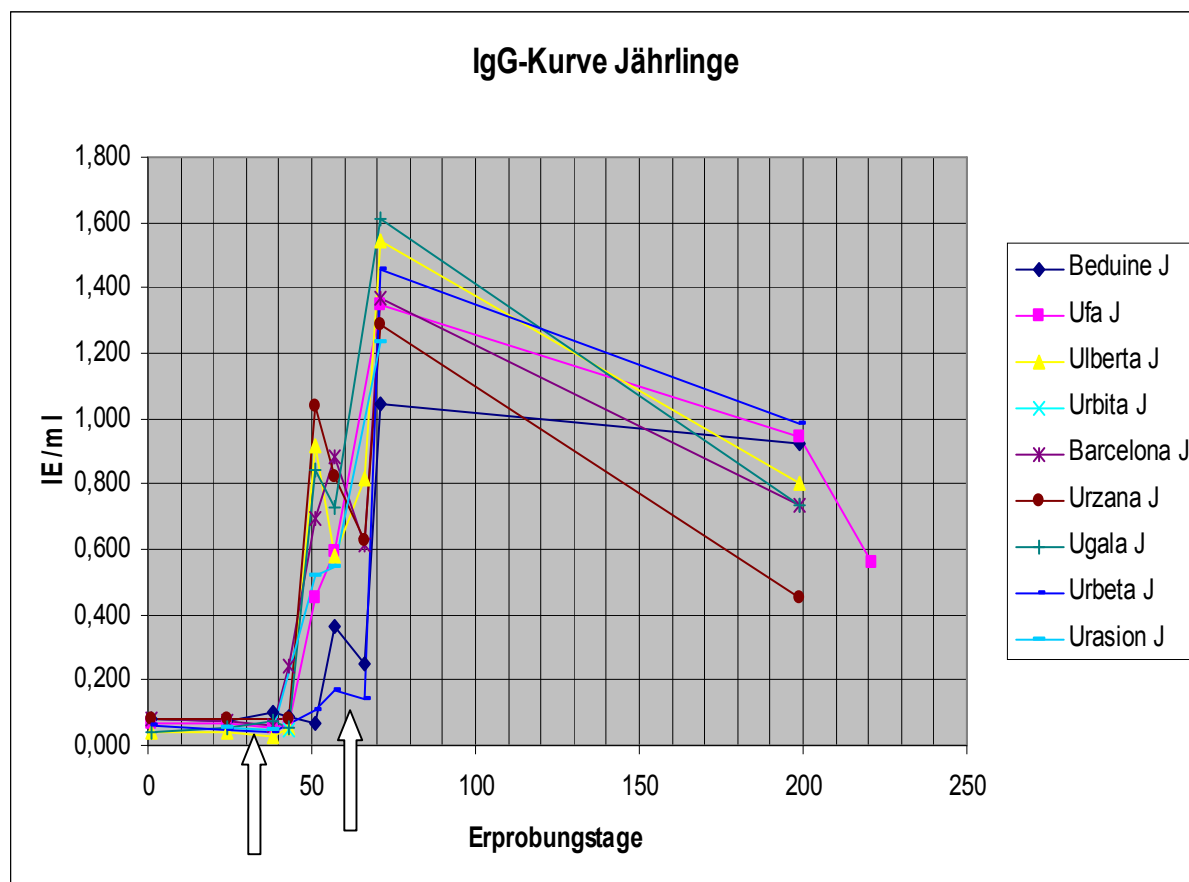


Abb. 15: Antikörpertiterverlauf bei Jährlingen während der Grundimmunisierung

Ergebnisse

Es wurden die Einzeltiterverläufe über den Erprobungszeitraum dargestellt.

Am ersten Erprobungstag lagen die Antikörpertiter aller 9 Jährlinge unterhalb des Cut off von 0,0921 IE/ml. Zusätzlich lagen auch alle Titer unterhalb des Schwellenwertes von 0,0841 IE/ml. Somit waren alle Jährlinge zu diesem Zeitpunkt als eindeutig seronegativ einzustufen. Sie hatten keinerlei Schutz vor einer Tetanuserkrankung.

Die Grundimmunisierung erfolgte am 36. Erprobungstag. Nach 14 Tagen (am 50. Tag) war ein maximaler Titeranstieg bei allen Tieren zu beobachten. Dabei wurden Titer zwischen 0,2 und 1 IE/ml erreicht. Das durchschnittliche Titermaximum lag bei 0,58 IE/ml. Bei allen Tieren war um den Zeitpunkt der Boosterung, 4 Wochen nach der Erstimpfung, ein Titereinbruch zu beobachten. Zwar sank der Titer nicht auf den Ausgangswert ab, aber er verminderte sich ungefähr um 0,2-0,3 IE/ml.

5 Tage nach der Boosterung war bei allen Tieren ein Titermaximum erreicht. Es wurden Werte zwischen 1,3 und 1,6 IE/ml gemessen.

Auch bei den Jährlingen konnte im weiteren Verlauf der Probennahme ein Abfall der Titer beobachtet werden.

Die Schwankungsbreite der Titer innerhalb dieser Gruppe war geringer, als es bei Gruppe 1 und 2 zu beobachten war.

5. Gruppe

In dieser Gruppe wurden an Tetanus erkrankte Tiere untersucht. Bei ihnen handelte es sich um Patienten der Tierärztlichen Klinik der fzmb GmbH in Bad Langensalza, Thüringen.

Von den erkrankten Pferden Schindler-Jung und Pairo waren nur Einzelblutproben vorhanden. Weitere Angaben zu diesen Tieren fehlten.

Bei der Stute Tara handelte es sich um eine klinisch gesunde Stute, deren 4 Monate altes Fohlen als erkrankt in die obige Tierärztliche Klinik eingewiesen wurde. Die Stute Tara war nicht regelmäßig gegen Tetanus geimpft worden.

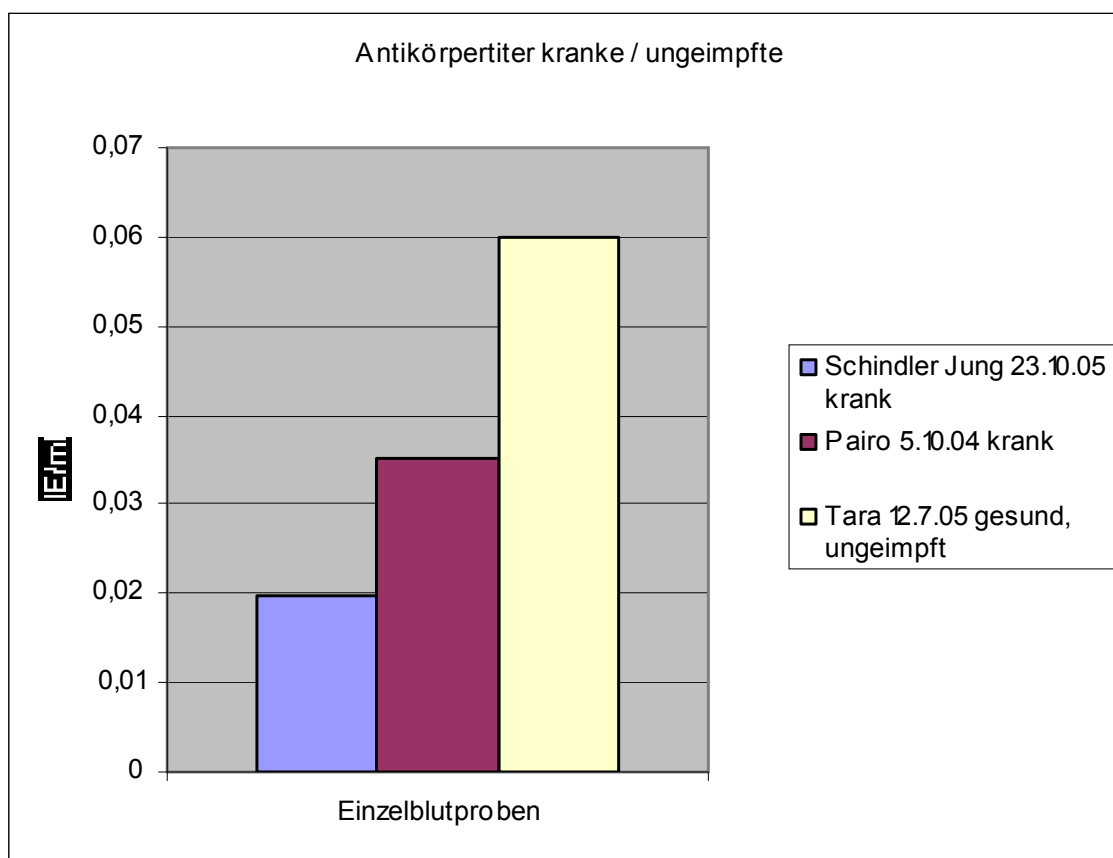


Abb. 16: Titer von erkrankten Pferden

Bei allen 3 Tieren lag der Tetanus-Antikörpertiter weit unter dem Cut off von 0,0921 IE/ml und unterhalb des Schwellenwertes.

Sie waren alle als seronegativ einzustufen.

Fohlen der Stute Tara

Das an Tetanus erkrankte Fohlen der nicht regelmäßig geimpften Stute Tara war zum Zeitpunkt der Erkrankung 4 Monate alt gewesen. Bis dahin war es weder gegen Tetanus geimpft noch mit Antitoxinserum behandelt worden.

Das Fohlen wurde mit der für Tetanus typischen Klinik eingewiesen: steifer Gang, Nickhautvorfall, seitlich abgestellter Schweif und Hyperthermie. Bei der eingehenden klinischen Untersuchung konnte keine Primärläsion festgestellt werden. Die Diagnose Tetanus wurde aufgrund der eindeutigen klinischen Zeichen gestellt und im Verlauf der Untersuchungen auch durch den ELISA bestätigt.

Neben der symptomatischen Therapie wurden dem Fohlen hoch dosiert Penicillin und Tetanusantitoxinserum intravenös und intramuskulär injiziert. Zusätzlich wurde eine Simultanimpfung vorgenommen.

Zu Beginn der Behandlung war das Fohlen mit einem Titer von 0,035 IE/ml als seronegativ einzustufen. Zur Kontrolle des Antitoxintiters wurde dem Fohlen während des Klinikaufenthaltes wiederholt Blut entnommen und untersucht. Im Verlauf der Therapie konnte ein Titeranstieg beobachtet werden. 7 Tage nach Einlieferung in die Klinik wurde ein Titer von 0,26 IE/ml gemessen. Mit dem Anstieg des Antikörpertiters verbesserte sich die Klinik ebenfalls. Am 10. Tag hatte das Fohlen einen Antikörpertiter von 0,46 IE/ml.

Nach 2 Wochen konnte das Fohlen ohne die klinischen Zeichen eines Tetanus und mit einem ausreichend hohen Antiköperspiegel entlassen werden.

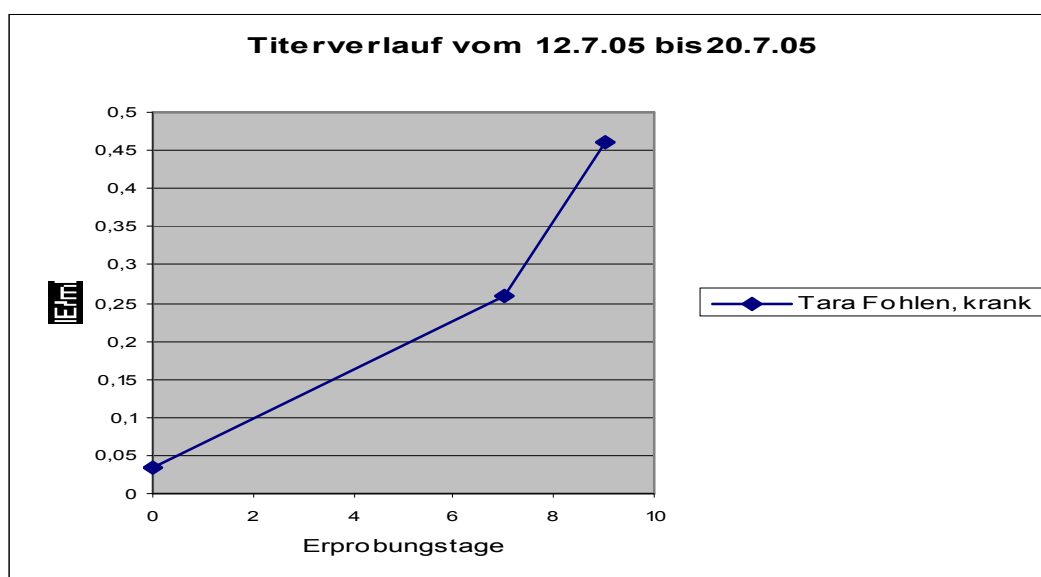


Abb. 17: Antikörperverlauf des Fohlens a. d. Tara unter der Serumtherapie

Prinz

Der adulte Wallach Prinz wurde ebenfalls mit den Symptomen eines Tetanus in der Tierärztlichen Klinik der fzmb GmbH vorgestellt. Prinz hatte zu diesem Zeitpunkt keinen Tetanusimpfenschutz.

Auch hier wurde die Diagnose Tetanus anhand der klinischen Zeichen gestellt und durch den ELISA bestätigt.

Der Wallach wurde mit Penicillin und Tetanusantitoxinserum intravenös und intramuskulär behandelt. Simultan wurde er mit Tetanusimpfstoff geimpft.

Von Prinz lagen nur zwei Serumproben vor. Der hier zu beobachtende Titerverlauf war aber dem des erkrankten Fohlens der Stute Tara ähnlich.

Zum Zeitpunkt der Einweisung in die Klinik war Prinz mit einem Titer von 0,0834 IE/ml als seronegativ einzustufen. Schon einen Tag nach Therapiebeginn konnte ein Titeranstieg auf 0,102 IE/ml gemessen werden.

Über seinen weiteren Krankheitsverlauf lagen keine weiteren Daten vor.

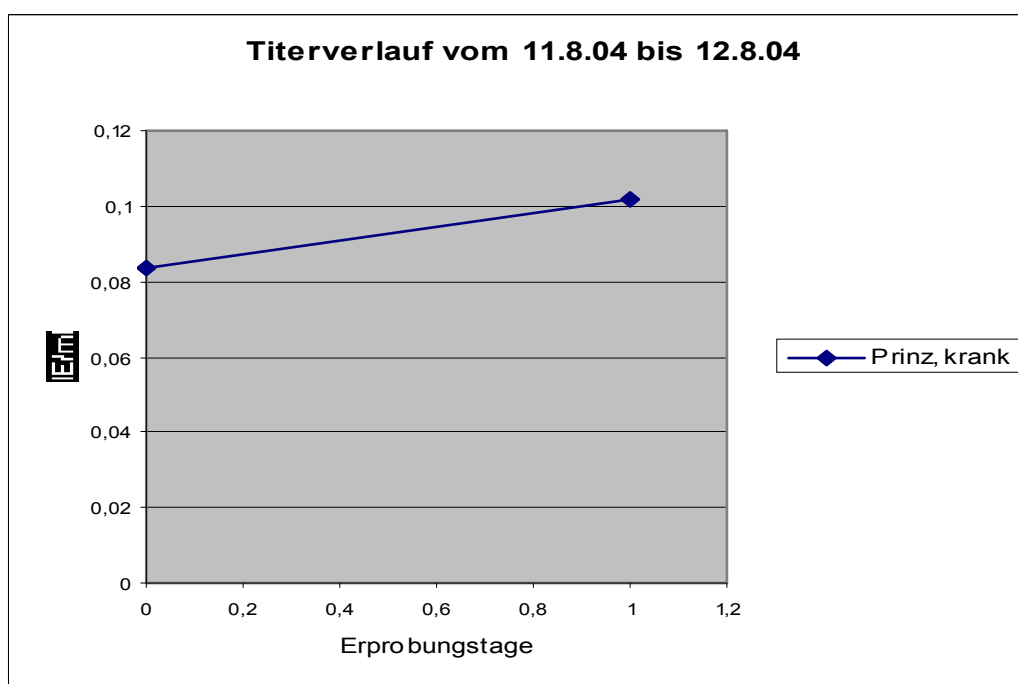


Abb. 18: Antikörperverlauf Prinz unter der Serumtherapie

4.3. Vergleich der Ergebnisse von ELISA und dem Prototyp „Schnelltest“

Für die Bestimmung von Tetanusantikörpertitern gelten der ELISA und der ToBI als immunochemische Methoden, die sich zur Bestimmung des Antikörpertiters als geeignet erwiesen haben (EUROPÄISCHES ARZNEIBUCH, 2008).

In dieser Arbeit wurde der indirekte ELISA als Vergleichstest zu dem entwickelten Prototyp „Schnelltest“ gewählt.

Der Cut off für den indirekten ELISA wird in der Literatur mit 0,1 IE/ml und für den SNT mit 0,01 IE/ml angegeben.

Im ELISA und parallel im Schnelltest wurden alle Mäuseseren des bereits durchgeführten SNT getestet.

Zusätzlich wurden 86 Pferdeseren getestet. Diese Seren wurden nach dem Zufallsprinzip aus dem vorhandenen Serenpool des Gestüts Meura ausgewählt. Alle Seren wurden in beiden Testverfahren in einer Dreifachbestimmung bestimmt. Ihr arithmetisches Mittel wurde für die Auswertung genutzt.

Um einen Zusammenhang zwischen den ELISA- und den Prototypergebnissen herstellen zu können, wurden die Titerergebnisse der Serumproben in Diagrammform gegenübergestellt (LORENZ, 1996). Dabei wurden für die Mäuseseren und die Pferdeseren jeweils getrennte Diagramme erstellt. Der ELISA und der Prototyp „Schnelltest“ sind durch das Biotinmarkierte Tetanustoxoid als Sekundärantigen speziesunabhängig und somit universell einsetzbar. Doch die Eichung beider Tests ist nur mit dem Antitoxinstandardserum vom Pferd durchgeführt worden. So ist anzunehmen, dass es bei der Testung der Mäuseseren zu geringgradigen Abweichungen von den eigentlichen Antikörpertitern kommt. Da aber in ELISA und im Prototyp eventuell mit einer konstanten Abweichung zu rechnen ist, kann dieser Fehler vernachlässigt werden.

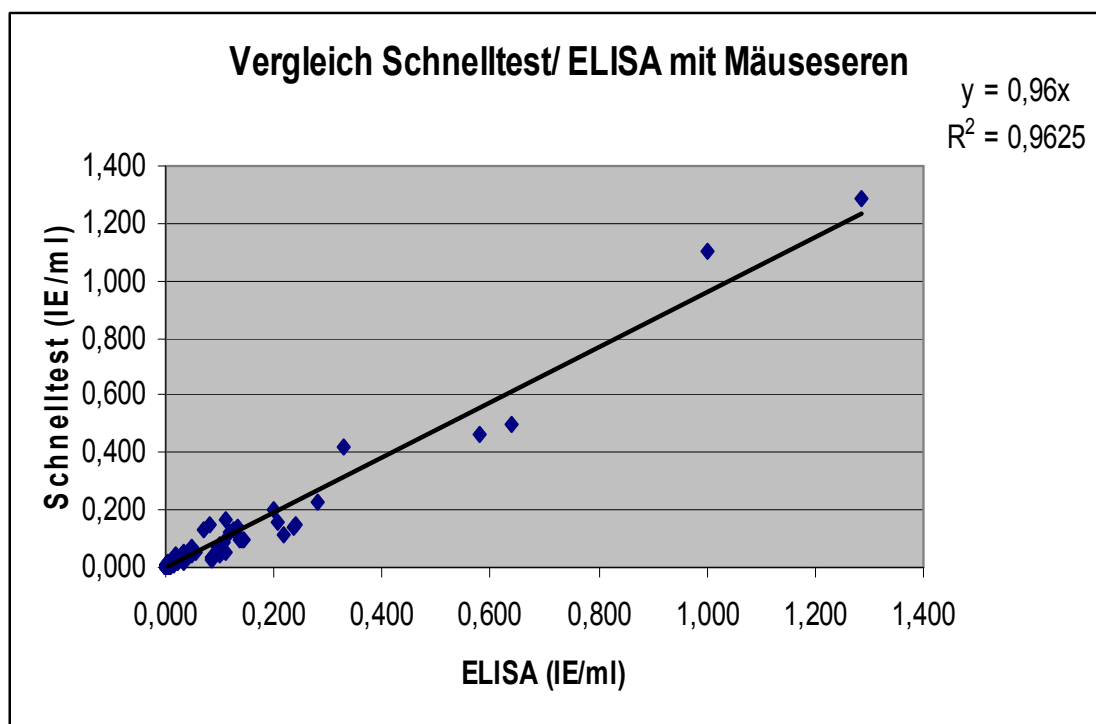


Abb. 19: Vergleich von Prototyp „Schnelltest“ und ELISA anhand gemessener Mäuseseren

Auf der x-Achse wurden die Ergebnisse der Messungen der Mäuseseren im ELISA aufgetragen, auf der y-Achse die der Messungen mit dem Prototyp „Schnelltest“.

Das Bestimmtheitsmaß R^2 stellt das Quadrat des Pearsonschen Korrelationskoeffizienten dar. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson gibt die Stärke des Zusammenhangs zwischen zwei Variablen wieder. In diesem Fall waren es der ELISA und der Prototyp. R^2 wurde bei dieser Gegenüberstellung mit 0,9625 angegeben.

Die graphische Darstellung der Gegenüberstellung von ELISA und Prototyp wurde als Regressionsgerade mit der linearen Funktion $y = 0,96x$ angegeben. Sie stellte diejenige Regressionsgerade dar, der alle Datenpunkte am nächsten lagen.

Im Wertebereich unterhalb 0,2 IE/ml lagen die Punkte näher an der Funktionsgeraden. Im höheren Wertebereich nahm die Abweichung der Datenpunkte von der Funktionsgeraden zu.

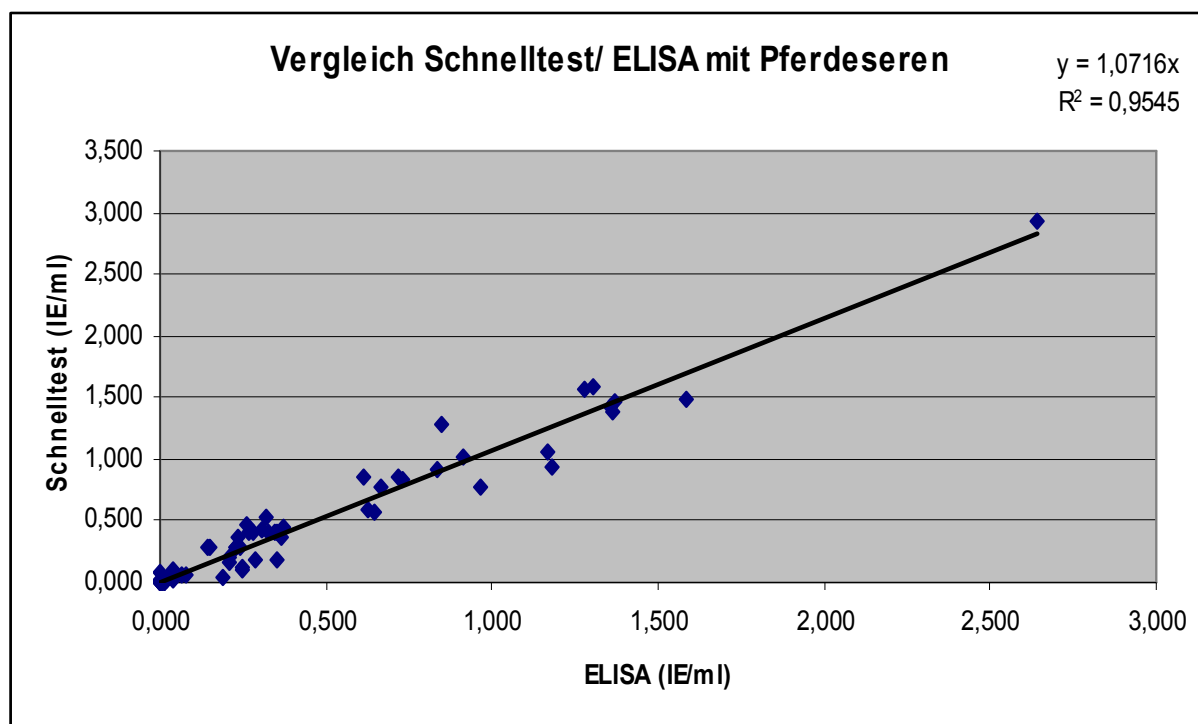


Abb. 20: Vergleich von Prototyp „Schnelltest“ und ELISA anhand gemessener Pferdeseren

Die graphische Darstellung des Vergleichs von ELISA und Prototyp anhand von Pferdeseren entspricht der obigen Darstellung der Mäuseseren. R^2 wurde in dieser Gegenüberstellung mit 0,9545 angegeben. Die Regressionsgerade wurde mit der Funktion $y = 1,0716x$ beschrieben. Auch bei den Pferdeseren war zu beobachten, dass die Übereinstimmung beider Testsysteme bei Seren mit einem Titer unterhalb 0,5 IE/ml größer ist als bei Seren mit höherem Titer. Bei den Pferdeseren konnte für alle Datenpunkte eine höhere Abweichung von der Funktionsgeraden beobachtet werden.

5. Diskussion

5.1. Bewertung des entwickelten Prototyps „Schnelltests“

Ziel der Arbeit war es, einen Prototyp „Schnelltest“ zu etablieren. Dieser sollte es ermöglichen, innerhalb kürzester Zeit bei Equiden den spezifischen Antikörpergehalt gegen das Tetanustoxin zu detektieren. Dabei sollte eine quantitative Einschätzung der Antikörpermenge möglich sein. Vom Testergebnis ausgehend, sollte eine Impfpfempfehlung gegeben werden können.

Eine weitere Zielstellung war die Durchführbarkeit des Tests vor Ort unter Feldbedingungen. Neben diesen Forderungen sollte der Prototyp „Schnelltest“ Werte für Sensitivität, Spezifität und den Cut off vergleichbar mit denen des ELISA aufzeigen.

Dem ELISA wurde von der WHO eine gute Korrelation zum *in vivo*-Assay, dem SNT, eingeräumt. Dabei wird der Cut off für den SNT als Goldstandard mit 0,01 IE/ml angegeben. Diesem Wert entsprechen 0,1 IE/ml im ELISA.

Der Cut off-Wert des SNT darf nicht als protektiver Titer vorausgesetzt werden. Werte über 0,01 IE/ml im ELISA bieten noch keinen Schutz. Beim ELISA wird ein Schutz erst mit einem Titer über 0,1 IE/ml garantiert (AYBAY et al., 2003).

Der Cut off des Prototyps „Schnelltest“ lag mit 0,0921 IE/ml geringgradig unterhalb des ELISA-Wertes. Für den Schwellenwert wurden 0,0841 IE/ml berechnet. Alle Pferde, bei denen Werte unterhalb des Cut off gemessen werden, gelten als impfwürdig.

Antikörpertiter zwischen dem Cut off und dem Schwellenwert (0,0921-0,0841 IE/ml) werden als fraglich beurteilt. Eine Impfung sollte bei Unterschreiten des Cut off immer durchgeführt werden. Die Impfpfempfehlung anhand des Prototyps „Schnelltest“ gilt somit für alle Pferde mit einem gemessenen Titer kleiner 0,0921 IE/ml.

Der Prototyp „Schnelltest“ hat sicher die seronegativen und somit impfbedürftigen Tiere erkannt, obgleich sein Grenzwert etwas niedriger angesetzt ist als der des ELISA.

Ein in der Humanmedizin eingesetzter Streifenschnelltest zeigt eine Erkennungsgrenze bereits bei 0,1 IE/ml. Bis zu dieser Konzentration kann er eine positive Aussage treffen. Dabei handelt es sich aber um einen rein qualitativen Test. Eine relevante Titeraussage kann nicht getroffen werden.

Die Genauigkeit des Prototyps „Schnelltest“ ist mit der Eichung festgelegt worden. Hierfür wurde die Methode der kleinsten Quadrate gewählt. Die quadratische Abweichung der Datenpunkte von der Kurve beträgt 0,0034.

Sowohl für den ELISA als auch für den Prototyp „Schnelltest“ sind aus den bei der Eichung entstandenen Regressionsfunktionen der dazugehörigen Eichkurven Umkehrfunktionen gebildet worden. Mit Hilfe dieser Umkehrfunktionen war es möglich, die mit dem Schnelltest oder ELISA gemessenen optischen Dichten in eine Konzentrationsangabe (IE/ml) umzurechnen. Erst dadurch wurde eine Titerangabe für ein gemessenes Serum möglich. Um einen weiteren Anhaltspunkt für die Genauigkeit des Schnelltests zu erhalten, wurden die für die jeweiligen Eichkonzentrationen gemessenen optischen Dichten mit der Umkehrfunktion in eine Konzentrationsangabe umgerechnet. Bei dem Vergleich eingesetzter Probenkonzentration mit gemessener und daraus berechneter Probenkonzentration ergab sich bei dem Prototyp „Schnelltest“ eine Abweichung der Angaben in der dritten Nachkommastelle. Beim ELISA konnte erst eine Abweichung in der vierten Nachkommastelle beobachtet werden.

Die Messgenauigkeit des Prototyp „Schnelltest“ im Vergleich zum ELISA ist als geringfügig niedriger zu bewerten. Unter Beachtung eines Cut off von 0,0921 IE/ml kann diese Feststellung jedoch vernachlässigt werden. Generell erhalten alle Tiere mit einem Antikörpertiter unterhalb des Cut off eine Impfpflichtung.

Unter Einbeziehung aller Abweichungen sollte eine Impfpflichtung bereits bei einem Titer von 0,1 IE/ml gegeben werden.

Die von der OIE (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH, 2009) vorgeschlagenen Richtwerte für veterinärmedizinische *in vitro*-Diagnostik sind bei der Validierung des Schnelltests eingehalten worden. Von der OIE wird für den Intraassay ein Variationskoeffizient von < 5% gefordert, für den Interassay einen Variationskoeffizienten von < 20%.

Auffällig war, dass sowohl bei dem Intraassay als auch bei dem Interassay die Variationskoeffizienten der einzelnen Probenkonzentrationen mit sinkender Probenkonzentration zugenommen haben. Der Variationskoeffizient des Blindwerts aus dem Intraassay lag mit 7,654% sogar oberhalb der geforderten 5%. Die Standardabweichungen der einzelnen Probenkonzentrationen haben sich entsprechend verhalten.

Der Variationskoeffizient des Blindwerts aus dem Interassay lag mit 31,22% weit über den geforderten 20%. Im Interassay konnte eine deutliche Variationskoeffizientenzunahme von

einer zur nächsten Probenkonzentration beobachtet werden. Die Abnahme der Messgenauigkeit bei der Messung niedrigtitriger Proben wurde auch bei einem für die Humanmedizin entwickelten ELISA (INSTITUT VIRION / SERION GMBH) beobachtet. Für diesen ELISA wurde zusätzlich eine Abnahme der Messgenauigkeit bei Proben mit hohen Antikörpertitern beschrieben. Dieser ELISA erreichte für das Intraassay nur Variationskoeffizienten zwischen 7-10%. Auch im Interassay erreichte er nur Variationskoeffizienten zwischen 7-12%.

Die Messungenauigkeiten des Prototyps „Schnelltest“ beim Interassay erklären sich aus der Notwendigkeit neuer Medienansätze für jeden Probendurchlauf. Insgesamt ist aber sowohl beim Intra- als auch beim Interassay zu beobachten gewesen, dass mit sinkender Probenkonzentration die Präzision des Prototyps abgenommen hat.

Dieser Vorgang kann mehrere Ursachen haben:

Zum einen kann es durch die weniger gefärbte Messfritte bei geringen Probenkonzentrationen zu einem Überwiegen von Störfaktoren gekommen sein, die bei einer stärkeren Färbung unterdrückt worden sind. So könnte der Polyethylenfilter mit seinem Porenanteil von 50% in ungefärbtem Zustand eine stärkere Streuung bei der Messung der optischen Dichte hervorgerufen haben. Das Gleiche könnte auch durch die Kunststoffssäule hervorgerufen worden sein. Allerdings wurde vor der Messung der gefärbten Fritte das Messgerät mit der ungefärbten Fritte kalibriert, um dieses Risiko zu minimieren. Damit sind gerätetechnische Störfaktoren als Ursache ausgeschlossen worden.

Zum anderen kann ein Präzisionsverlust im Bereich niedriger Probenkonzentrationen mit dem Messbereich des Gerätes im Zusammenhang gestanden haben. Dabei hat die Messgenauigkeit mit sinkender Probenkonzentration abgenommen.

Für Serumbestimmungen unterhalb des Cut off sollte daher auf andere Testverfahren ausgewichen werden, wie beispielsweise den ToBI oder auch den ELISA.

Für diese beiden *in vitro*-Tests sind jedoch bei der Bestimmung von niedrigtitrigen Seren ebenfalls Einschränkungen zu beobachten (SCHEIBEL, 1955).

Zum korrekten Nachweis niedrigtitriger Proben muss weiterhin der SNT benutzt werden.

Schon SIMONSEN et al. (1986) haben darauf hingewiesen, dass ein indirekter ELISA für die Quantifizierung Tetanustoxoid-neutralisierender Antikörper in Humanseren aufgrund der Überbewertung von Seren mit niedrigen Antitoxin-Titern nur begrenzt einsetzbar ist.

Die Notwendigkeit der Bestimmung von Werten unterhalb des Cut off muss hinterfragt werden. Alle Werte, die unterhalb des Cut off liegen, gelten als seronegativ und impfwürdig. Nötig kann eine Titerbestimmung unterhalb des Cut off bei der Impfstoffchargenprüfung werden. Mittlerweile wurden Ausweichmethoden entwickelt, die den Verzicht auf Tierversuche ermöglichen sollen (SILBERBACH, 2005).

Mit den Ergebnissen des Interassay kann eine Aussage zur Robustheit des Prototyps „Schnelltest“ gemacht werden. Trotz unterschiedlicher Laborbedingungen (Raumtemperatur, Luftfeuchtigkeit, unterschiedliches Laborpersonal) konnten die geforderten Normwerte eingehalten werden. Das heißt, Umgebungsveränderungen haben keinen so ausschlaggebenden Einfluss auf den Prototyp „Schnelltest“, dass er nicht mehr auswertbar wäre.

Der Prototyp „Schnelltest“ scheint für den Feldeinsatz generell geeignet.

Wie beim ELISA kann auch beim Prototyp „Schnelltest“ nicht ausgeschlossen werden, dass es durch die Detektion von frühen Antikörpern (IgM) bei frisch geimpften Tieren zu falsch positiven Aussagen kommt. Die frühen Antikörper werden im SNT noch nicht als neutralisierende Antikörper nachgewiesen. Die *in vitro*-Diagnostik hingegen erkennt diese Antikörper als neutralisierende (AYBAY, 2003).

Die aussagekräftige Titerbeurteilung eines frisch immunisierten Tieres kann frühestens 2-3 Wochen nach der Immunisierung erfolgen. Zu diesem Zeitpunkt ist anzunehmen, dass die frühen IgM schon wieder abgebaut sind und die Bildung der IgG das Maximum erreicht hat. Weiterhin konnten bei erkrankten Tieren, die mit Antitoxinserum behandelt wurden, direkt nach Behandlungsbeginn schon Antikörpertiter gemessen werden. Dabei handelte es sich um die applizierten Antikörper, in dem Fall IgG, und nicht um körpereigene.

Um die Spezifität des Schnelltests zu überprüfen und eventuelle Kreuzreaktivitäten, vor allem mit Antikörpern gegen Botulinumtoxin, ausschließen zu können, wurden positive Botulinum-Seren im ELISA getestet. Hier konnte eine Kreuzreaktivität ausgeschlossen werden. Aus technischen Gründen (geringerer Serenmaterialeinsatz) ist dieser Nachweis im ELISA geführt worden. Da hier keine Reaktion der Botulinum-Antikörper mit den Testkomponenten stattgefunden hat, wird für den Prototyp „Schnelltest“ das gleiche Ergebnis angenommen.

Der Prototyp „Schnelltest“ weist somit selektiv nur Antikörper gegen Tetanus nach. Eine falsch positive Aussage durch eventuelle Kreuzreaktivitäten kann ausgeschlossen werden.

Die Sensitivität des Schnelltests lag mit 95,65% höher als die anderer Schnelltestverfahren im Humanbereich zum Nachweis von Tetanus-Antikörpern. Die hier häufig eingesetzten Streifentests erreichen nur eine Sensitivität von 85,8% (KOLLARITSCH, 2007).

Der Prozentsatz der falsch negativ erkannten Proben lag bei 4,35%. Anteile an falsch negativen Ergebnissen bis zu 5% können toleriert werden (LESNIK, 1994).

Weiterhin wurde das Ziel erreicht, einen *quantitativen* Test zu entwickeln, der sich nicht nur mit einer Ja-/Nein-Aussage zufrieden gibt. Anhand des Grades der Zunahme der Verfärbung der Fritte kann eine Titeraussage getroffen werden. (Weiteres unter Kapitel 5.2).

Ein weiterer wichtiger Aspekt war die Entwicklung des Schnelltests als speziesunabhängiges Verfahren. Das für die Bindung der probenspezifischen Tetanusantikörper verantwortliche Sekundärantigen ist nicht, wie häufig verwendet, tierartspezifisch. Gewöhnlich wird beim Nachweis von Antikörpern in Pferdeserum häufig auf Fängerantikörper wie den *Biotin conjugated goat anti Horse IgG* oder ähnliche zurückgegriffen. Diese Antikörper binden nur an Antikörper des Pferdes. Durch den Einsatz des Biotin-markierten Tetanustoxoids als Sekundärantigen wurden alle gegen Tetanus gebildeten Antikörper gebunden. Dabei spielte die Tierart keine Rolle. Allerdings müsste wahrscheinlich eine neue Eichung mit dem jeweils tierartspezifischen Eichserum vorgenommen werden. Die Eichung des Prototyps „Schnelltest“ ist nur mit Antitoxinserum vom Pferd durchgeführt worden.

Während der Laborarbeiten wurde auch ein Serum eines Deutsch Drahthaar Jagdhundes untersucht. Er zeigte eindeutige klinische Symptome eines Tetanus: steifer Gang, starr aufgestellte Ohren, Risus sardonicus. Bei der Anamnese berichtete der Besitzer von einer Verletzung, die aber schon 4 Wochen zurücklag.

Bei der Testung verfärbte sich die Messfritte tiefrot. Es wurden damit eindeutig Antikörper gegen Tetanus nachgewiesen.

Da Hunde nicht gegen Tetanus geimpft werden und die Verletzung schon längere Zeit zurücklag, ist davon auszugehen, dass sich das Immunsystem schon so weit mit der Infektion auseinandergesetzt hatte, dass es späte Antikörper bilden konnte.

In der Gegenüberstellung von ELISA und Prototyp „Schnelltest“ wurden die Mäuseseren und die Pferdeseren getrennt untersucht.

Wie oben beschrieben, erfolgte die Eichung mit Antitoxinserum vom Pferd. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei der Auswertung der Mäuseseren im ELISA und im Schnelltest ein konstanter Fehler entstanden ist. Ein Vergleich beider Testverfahren ist dennoch auch mit den Mäuseseren möglich gewesen.

Um einen direkten Vergleich zwischen ELISA und Prototyp „Schnelltest“ anstellen zu können, wurden die gemessenen Serumergebnisse aus beiden Tests gegeneinander in einem Diagramm aufgetragen. Die Werte aus dem Schnelltest wurden auf der y-Achse und die Werte aus dem ELISA auf der x-Achse aufgetragen. Für die Auftragung der Mäuseseren ergab sich für R^2 ein Wert von 0,9625. Bei den Pferdeseren konnte R^2 mit 0,9545 angegeben werden.

Unterschiede in der Aufarbeitung der Blutproben im Labor können Ursache dieser Abweichung gewesen sein. Zum Beispiel können zelluläre Rückstände in einigen Testseren zu größeren Abweichungen der Ergebnisse von ELISA und Prototyp geführt haben. Allgemein war jedoch eine weitgehende Übereinstimmung zwischen dem ELISA und dem Prototyp „Schnelltest“ festzustellen.

Bei höhertitrigen Proben nahm die Differenz der Messergebnisse von ELISA und Prototyp zu. Bei den Mäuseseren war eine zunehmende Differenz zwischen ELISA und Prototyp ab der Probenkonzentration $> 0,2$ IE/ml zu erkennen. Bei den Pferdeseren konnte dieses Phänomen bei Proben $> 0,5$ IE/ml beobachtet werden. Dieses Phänomen sollte in weiterführenden Arbeiten noch genauer untersucht werden. Eventuell handelt es sich hierbei um unterschiedliche Bindungseigenschaften der Testkomponenten und auch der Polyethylenfritten beziehungsweise ELISA-Platte für frühe Antikörper (IgM).

In weiterführenden Untersuchungen sollte überprüft werden, ob sich die Korrelation beider Testverfahren bei wiederholter Immunisierung verbessert. Bekannt ist, dass bei wiederholter Immunisierung Antikörper mit einer höheren Affinität induziert werden (KLEIN, 1991). Das heißt, die Antikörper gewinnen an Bindungsstärke.

Dieser Vorgang konnte durch die zunehmende Differenz zwischen den beiden Testverfahren bei zunehmender Probenkonzentration beobachtet werden. Bei höheren Titern, also einer höheren Antikörperkonzentration in der Probe, ist das unterschiedlich ausgeprägte Bindungsverhalten beider Testverfahren zum Tragen gekommen.

In der Dissertation von MÜLVERSTEDT (2006) wurde auf den gleichen Serenpool zurückgegriffen und ein ELISA entwickelt. Auffallend war, dass sowohl für den entwickelten ELISA als auch für den Prototyp „Schnelltest“ durchweg niedrigere Antikörpertiter für die Seren gemessen wurden als in der vorliegenden Arbeit.

Eine Ursache dafür kann das Alter der Serumproben gewesen sein, da eine Lagerungszeit von 4 bis 5 Jahren zu einem Abbau der Antikörper führt. Auch mehrmaliges Auftauen und wieder Einfrieren können zusätzliche Ursachen gewesen sein.

Als Folge des niedriger berechneten Cut off hat MÜLVERSTEDT (2006) eine abweichende Impfempfehlung vor allem für die Erstimpfung von Fohlen angegeben. So hat MÜLVERSTEDT (2006) empfohlen, mit der Grundimmunisierung schon im 3.-4. Lebensmonat zu beginnen, soweit es sich um Fohlen aus Stuten handelt, die während der Trächtigkeit nicht noch einmal zusätzlich geimpft worden sind. Aus der aktuellen Arbeit hat sich für oben genannte Fohlen eine Impfempfehlung ab dem 5.-6. Lebensmonat ergeben (s. Kapitel 5.3.).

Insgesamt entsprechen die Ergebnisse der Serentestung mit dem Prototyp „Schnelltest“ weitestgehend den offiziell bekannten Empfehlungen zum Impfregime von Pferden gegen Tetanus. Der in dieser Arbeit entwickelte Prototyp „Schnelltest“ wird für die Titerbestimmung von Antikörpern gegen Tetanus beim Equiden als geeignet beurteilt. Mit Hilfe des Prototyps „Schnelltest“ kann eine quantitative Aussage zum Impfstatus des Tieres getroffen und somit eine Impfempfehlung gegeben werden.

5.2. Beurteilung der Handhabung im Feld

Das geforderte Zeitlimit von einer Stunde für die Durchführung der Untersuchung wurde vom Prototyp „Schnelltest“ eingehalten. Für die Untersuchung sind maximal 25 Minuten nötig.

Ein gewisser Zeitrahmen musste noch für die Standzeit der frischen Vollblutprobe und ihre anschließende korrekte Zentrifugation zur Serumgewinnung eingeplant werden.

Derzeit ist der Prototyp „Schnelltest“ nur mit Serum durchführbar. Seitens der Industrie wäre der direkte Einsatz von Vollblut wegen der Testverkürzung erwünscht. Zum einen kann jedoch der Zellgehalt des Vollblutes die Laufeigenschaften der Probenflüssigkeit durch die Poren des Polyethylenfilters behindern. Zum anderen müssen Fehlinterpretationen des Messgeräts durch die Eigenfärbung des Vollblutes ausgeschlossen werden. Eine weitere

Störung ist das Entstehen einer Hämolyse, die sich bei Pferdeblut stärker auswirkt als bei Mäuseblut (GRABNER, persönl. Mitteilung, 2009).

Für den Lateral-flow-Test Prevent ID ® Tetanus, Preventis GmbH werden unterschiedliche Nachweisgrenzen für Serum und Vollblut angegeben: Laut Hersteller weist der Test jede Konzentration an Tetanusantikörpern $\geq 0,1$ IE/ml im Serum und $\geq 0,2$ IE/ml im Vollblut nach (PREVENTIS GMBH). Das lässt vermuten, dass die Daten des für die Serumbestimmung geeichten Prototyps „Schnelltest“ nicht direkt auf den Einsatz bei Vollblut zu übertragen sind. Eine neue Eichung und Cut off-Bestimmung beim Einsatz von Vollblut sollten erfolgen.

Eine quantitative Aussage durch Titerbestimmung ist nur mit Hilfe eines Messgerätes möglich. Es misst die optische Dichte, also den gebildeten Farbkomplex der Fritte. Die Umrechnung der gemessenen optischen Dichte in eine Titerangabe ist nur computergestützt möglich. Die derzeitige Größe des Messgeräts und seine äußere Form sind für den Feldgebrauch akzeptabel. Auch die Handhabung des Messgeräts kann für den Feldgebrauch als geeignet beurteilt werden. Da es sich bei dem beschriebenen Test um einen Prototyp handelt, ist eine Optimierung und Weiterentwicklung zu erwarten.

Eine Weiterentwicklung des Messgerätes wäre eine direkte Anzeige des Antikörpergehalts und eine Impfpfehlung.

Durch Koppelung der Testkomponenten im Reagenzglas mit anschließender Gefriertrocknung soll ein Pellet entstehen. Nach Auftragen der flüssigen Patientenprobe soll sich das Pellet lösen und mit der Probe reagieren. Der Zeitaufwand des Assays könnte so auf einen Schritt reduziert werden, was dem Feldgebrauch vom praktischen Aufwand und vom Zeitaufwand her entgegenkäme. Darüber hinaus würden sich sämtliche Aufbewahrungsbehältnisse für die einzelnen Testkomponenten erübrigen. Das wäre eine große Platzersparnis und würde die Lagerung zusätzlich vereinfachen.

Die einzelnen Testkomponenten müssen derzeit bei $+4^{\circ}\text{C}$ gelagert werden. Im günstigen Fall könnte der weiterentwickelte Prototyp „Schnelltest“ bei Raumtemperatur gelagert werden. Dies würde auch den Transport ins Feld erleichtern.

Eine weitere Überlegung ist, durch die Hintereinanderschaltung mehrerer Messfritten ein Immunothermometer zu entwickeln, bei dem die Anzahl der gefärbten Fritten proportional mit der Antikörperkonzentration zunimmt. Dies würde das direkte Ablesen eines Titers an der Testsäule ermöglichen und den Einsatz des Messgerätes erübrigen.

Zusätzlich könnte überlegt werden, mehrere Fritten hintereinanderzuschalten, die unterschiedliche Antikörper nachweisen, also ein Test zur Kontrolle der Impftiter gegen

mehrere Krankheiten. Allerdings müsste hier wahrscheinlich auf einen unspezifischeren Sekundärantikörper ausgewichen werden (*Biotin conjugated goat anti Horse IgG* oder ähnliche). Hier müsste dann vor allem die Frage der Kreuzreaktivität neu bearbeitet werden.

Da es sich um einen Prototyp des Schnelltests handelt, kann noch keine Kosteneinschätzung getroffen werden.

5.3. Bewertung der Felduntersuchungen

Im folgenden Teil sollen die Messergebnisse an sich ausgewertet werden:

1. Gruppe: regelmäßig geimpfte Altstuten

Die regelmäßig geimpften Stuten zeigten einen annähernd gleichbleibenden Titerverlauf über den gesamten Erprobungszeitraum. Bei den Einzeltitertiterverläufen konnten geringgradige Titterschwankungen beobachtet werden. Allerdings galt es hier, Messfehler zu berücksichtigen. Darüber hinaus konnte auch schon im Interassay eine Streuung bei der Messung gleicher Probenkonzentrationen an verschiedenen Tagen beobachtet werden. So konnte davon ausgegangen werden, dass die teilweise wellenförmigen Titerverläufe vom Prototyp „Schnelltest“ selbst hervorgerufen wurden.

Bei 7 Stuten wurde zum ersten Erprobungstermin nur ein Titer im unteren Bereich um 0,3 IE/ml gemessen. Zum zweiten Erprobungstermin, 3 Wochen später, wiesen alle 7 Stuten ähnlich hohe Titer wie die restlichen Stuten auf. Eventuell handelte es sich bei diesen Stuten um Maidenstuten, die nun ihre erste Boosterung ein Jahr nach der Grundimmunisierung erhalten haben. Wahrscheinlich ist ihr Boosterungstermin genau in den Zeitraum zwischen den beiden Probennahmen gefallen. Dazu lagen keine Aufzeichnungen vor, so dass dieser Erklärungsversuch eine Vermutung ist.

Obwohl bei allen Stuten der gleiche Impfstoff und auch die gleiche Impstoffdosierung verwendet wurden, kamen starke individuelle Titterschwankungen innerhalb der Messgruppe zustande. Anhand der injizierten Impstoffdosis konnte keine zu erwartende Titeraussage getroffen werden.

Die individuelle Antikörperantwort ist von mehreren Faktoren abhängig:

Eine entscheidende Rolle spielt die Immunitätslage des geimpften Pferdes. Nur klinisch gesunde Tiere sind in der Lage, einen entsprechenden Antikörpertiter auszubilden. Kommt es infolge mangelnder Impfmunität zur klinischen Ausprägung der Infektion, gegen die geimpft wurde, spricht man von einem Impfdurchbruch. So kann nach der Impfung gegen Influenza oder gegen das Equine Herpesvirus Husten beobachtet werden. Wird ein erkranktes Pferd im subklinischen Stadium gegen Tetanus geimpft, besteht die Gefahr, dass es keinen ausreichenden Impfschutz aufbaut und trotz Impfung an Tetanus erkrankt (THEIN, 2007).

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist der Ausgangstiter vor der Impfung. Nach den Probenentnahmen war zu beobachten, dass die Stuten, die einen niedrigen Ausgangstiter ($<0,3$ IE/ml) hatten, mit einem wesentlich höheren Titeranstieg auf die Impfung reagierten als Stuten mit einem höheren Ausgangstiter.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Pferde trotz gleichen Impfregimes unterschiedlich hohe Antikörpertiter ausgebildet haben. Daher sollte man die Anwendungsanweisung (Impfintervalle, Menge) des Herstellers befolgen, um nicht durch größer gewählte Impfintervalle bei Tieren mit einem niedrigeren Ausgangsantikörpertiter den Cut off zu unterschreiten. So konnte bei Einzeltieruntersuchungen nach fünf Jahren noch ein ausreichend hoher Titer gemessen werden (DANNER, 2002). Auch Impfintervalle von bis zu 12 Jahren werden in der Literatur (THEIN, 2007) als ausreichend bewertet. Allerdings sind hierzu keine ausreichenden Titeruntersuchungen im Feld bekannt.

Bei regelmäßig geimpften Tieren ist davon auszugehen, dass sie einen ausreichend hohen, gleichmäßigen Antikörpertiter aufweisen. In der Humanmedizin wurde beobachtet, dass vor allem ältere Menschen gefährdet sind, an Tetanus zu erkranken. Häufig werden die Auffrischungsimpfungen vergessen. Der schützende Antikörperspiegel nimmt im Alter zusätzlich ab. Erschwerend zu diesen Umständen treten häufig altersbedingte Krankheiten wie Durchblutungsstörungen oder Diabetes auf, die das Immunsystem zusätzlich schwächen (BOCK-HENSLEY, 2003).

Metabolische Alterskrankheiten wie z.B. das Cushing-Syndrom werden beim Pferd nicht selten beobachtet. Dies gilt es beim Impfregime mit zu berücksichtigen.

Auch ältere Pferde sollten deshalb regelmäßig entsprechend der Empfehlungen geimpft werden.

2. Gruppe: regelmäßig geimpfte, tragende Altstuten

Bei dieser Gruppe war ebenfalls ein gleichmäßiger Titerverlauf aller Stuten zu beobachten. Genauso wie in der Gruppe 1 konnte auch hier eine individuelle Schwankungsbreite der mittleren Einzeltitertiter untereinander beobachtet werden. Die Einzeltiter reichten von 0,7-1,8 IE/ml.

Ungefähr zwei Wochen nach der Impfung konnte die maximale Antikörperantwort gemessen werden. Zwei Wochen nach der Impfung war davon auszugehen, dass es sich bei den gemessenen Antikörpern um schützende IgG handelt.

Nach vier Wochen war jedoch wieder ein Titerabfall auf den Ausgangswert zu beobachten. Die Titer behielten das Maximum nicht bei, sondern pendelten sich auf einen niedrigeren Wert ein. Zu erklären ist dies mit der Halbwertszeit der IgG von 20-30 Tagen. Neben ihnen werden IgG-Memory-Zellen für einen dauerhaften Schutz produziert.

Auffällig war, dass zwei Stuten einige Tage nach der Impfung einen Titereinbruch hatten. Zwei Wochen nach der Impfung erreichten sie aber mit den anderen Stuten vergleichbare Werte.

Auszuschließen war, dass dieser Titereinbruch in Zusammenhang mit der Geburt stand, da der Abfolhetermin bei beiden Tieren schon weiter zurücklag.

Eventuell hatten diese beiden Tiere eine verzögerte Affinitätsreifung der B-Lymphozyten. Dabei findet die körpereigene Selektion der B-Lymphozyten, die Antikörper mit höherer Affinität bilden, langsamer statt (DANNER et BRUNNER, 2002). Stattdessen waren zuerst die primären IgM-Antikörper eingesprungen. Diese haben eine Halbwertszeit von etwa fünf Tagen. Die IgG kamen bei diesen beiden Tieren erst verspätet zum Zug. Die vorhandenen IgG wurden zur Neutralisation des Tetanustoxoids genutzt, so dass es zu einem Titereinbruch nach der Impfung kam. Ein weiterer Grund für dieses Phänomen könnte eine verminderte Immunitätslage dieser beiden Stuten gewesen sein. Daten lagen hierzu nicht vor. Es kann sich aber ebenso auch um einen Messfehler gehandelt haben.

3. Gruppe: Fohlen der Stuten Gruppe 2

Von den 6 Fohlen wurden 3 Tiere am 155. Tag der Untersuchung geimpft und am 188. Tag geboostert. Die Tiere waren zu diesem Zeitpunkt ungefähr 4,5 Monate alt. Die anderen 3 Tiere wurden nicht geimpft.

Die Mutterstuten wurden während der Trächtigkeit nicht mehr zusätzlich geimpft.

Etwa eine Woche nach der Geburt hatten alle Fohlen ähnliche Antikörpertiter wie die Mutterstuten, so dass davon auszugehen war, dass sie genügend Antikörper über das Kolostrum aufgenommen hatten.

Die Schwankungsbreite der Einzeltiertiter innerhalb der Mutterstutengruppe war auch bei den Fohlen zu beobachten.

Um den 80. Lebenstag waren die Titer bei allen Fohlen um etwa die Hälfte gesunken. Ursache dafür waren die begrenzte Halbwertszeit der Antikörper und die konstante Plasmavolumenzunahme bei wachsenden Fohlen, was zu einer Abnahme der Antikörperkonzentration geführt hat.

So sank bei einem Fohlen (Uriga F) schon am 100. Lebenstag (etwa 3. Lebensmonat) der Antikörpertiter unter den Cut off. Das Fohlen war als seronegativ und nicht geschützt einzustufen. Der Anfangstiter von Uriga F war im Vergleich zur Mutterstute schon niedriger (Fohlen: 0,539 IE/ml; Stute: 1,158 IE/ml). Möglicherweise hat dieses Fohlen nicht genügend Kolostrum aufgenommen. Klinisch auffällig ist das Fohlen nicht geworden.

Bei den nicht geimpften Fohlen wurden am 214. Tag, also mit knapp 7 Lebensmonaten, nur noch Titer unterhalb beziehungsweise in der Nähe des Cut off gemessen. Die maternalen Antikörper waren zu diesem Zeitpunkt so weit abgebaut, dass ihre Schutzfunktion nicht mehr gegeben war. Das Fohlen beginnt zwar am Ende des ersten Lebensmonats eine aktive Immunabwehr aufzubauen, diese ist allerdings frühestens nach 6-8 Monaten vollständig erreicht (GRABNER, 2008).

Um den 6.-7. Lebensmonat haben noch nicht geimpfte Fohlen keine ausreichende Immunität mehr gegen Tetanus und können erkranken.

Für den optimalen Impftermin gilt es zu beachten, dass bei den geimpften Fohlen erst 10-14 Tage nach der Erstimpfung ein Titeranstieg zu beobachten war. Nach der Boosterung stieg der Titer schon nach 5 Tagen an. Der Titeranstieg nach der ersten Impfung war wesentlich niedriger als das Titermaximum nach der Boosterung.

Ein belastbarer Schutz sollte daher erst nach der Boosterung vorausgesetzt werden. Erfolgt die Boosterung 4 Wochen nach der Erstimpfung, kann also etwa 5 Wochen nach der Erstimpfung eine belastbare Immunität angenommen werden. Bei Fohlen, deren Mütter während der Trächtigkeit nicht zusätzlich geimpft worden sind, sollte im 5. bis spätestens 6. Lebensmonat mit der Grundimmunisierung gegen Tetanus begonnen werden.

Anderen Untersuchungen zufolge ist das Pferd schon 10 Tage nach der ersten Impfung mit Tetanusadsorbatimpfstoff gegen eine natürliche Tetanusintoxikation immun. Begründet wird dies mit einer natürlichen Sensibilisierung schon vor der Impfung durch Aufnahme von Clostridiumsporen über das Futter. Dadurch reagiert das Pferd schon auf die Erstimpfung mit einer besseren Antitoxinproduktion als beispielsweise der Mensch. Eine Sensibilisierung über die Nahrung findet beim Menschen nicht statt (LÖHRER et RADVILA, 1970).

Allerdings kann die Menge der vom Pferd aufgenommenen Clostridiumsporen nicht überprüft werden. Um die Aufnahme nachzuweisen, wäre eine Antikörpertiterbestimmung denkbar. Diese *orale* Immunisierung darf aber nicht vorausgesetzt werden. Das Vorkommen von Clostridiumsporen ist vom Verseuchungsgrad des Bodens und der Art der Futterproduktion abhängig.

Probleme können bei solchen Fohlen wie Uriga F auftreten, die klinisch unauffällig waren, aber durch mangelnde Kolostrumaufnahme schon eher den Cut off unterschritten haben. Es ist daher zu empfehlen, die Tetanusantikörpertiter der Fohlen ab dem 3. Lebensmonat regelmäßig zu überprüfen. So können individuelle Impftermine bestimmt werden, und das Risiko einer Tetanusinfektion kann ausgeschlossen werden.

Für den Beginn der Grundimmunisierung gegen Tetanus gibt es unterschiedlichste Altersempfehlungen:

Der Großteil der Impfstoff-vertreibenden Firmen empfiehlt, mit der Grundimmunisierung in einem Alter von 5-6 Monaten zu beginnen. Nur bei einem erhöhten Infektionsdruck beziehungsweise bei ungeimpften Müttern wird empfohlen, die Impfung in den 3. oder 4. Lebensmonat vorzuziehen.

Die Befürchtung der Impfstoffhersteller ist, dass durch zu frühes Impfen die maternalen Antikörper den Impfstoff neutralisieren und eine Immunitätsbildung verhindern könnten.

THEIN (2007) empfiehlt generell, gesunde Fohlen aus geimpften Stuten nicht vor dem abgeschlossenen 8. Lebensmonat zu impfen.

Solche Fohlen wie Uriga F wären dann aber noch länger ungeschützt.

Für THEINS Empfehlung spricht, dass auf dem Gestüt Meura, obwohl die Grundimmunisierung erst mit dem ersten Lebensjahr vorgenommen wird, verhältnismäßig wenige Tetanusfälle auftreten. Allerdings wurden keine Untersuchungen zum Vorkommen von Sporen von *Clostridium tetani* in diesem Gebiet vorgenommen. Eventuell ist die Bodenverseuchung nicht so stark, so dass das Infektionsrisiko hier grundsätzlich niedriger ist. Andere Autoren empfehlen wiederum, mit der Erstimpfung schon im 3.-4. Lebensmonat zu beginnen (SCHMALL, 1997).

Für Fohlen, deren Mütter noch einmal gegen Ende der Trächtigkeit geboostert wurden, liegen keine Daten vor. Zu erwarten ist aber, dass bei ihnen länger ein schützender Antikörpertiter messbar ist. Denn ein erhöhter Impftiter bei der Mutterstute wird über das Kolostrum an das Fohlen weitergegeben.

Für tragende Stuten wird eine zusätzliche Impfung 4-6 Wochen vor dem Abfohlen empfohlen (DANNER et BRUNNER, 2002). Die Ergebnisse aus der 2. Gruppe haben gezeigt, dass 2 Wochen nach der Boosterung ein maximaler Impftiter erreicht ist, der nach 4 Wochen wieder absinkt. In Titerbestimmungen müsste überprüft werden, ob Fohlen aus zusätzlich geimpften Mutterstuten mehr maternale Antikörper erhalten als Fohlen von nicht zusätzlich geimpften Mutterstuten.

Trifft dies zu, ist zu überlegen, die Stuten erst 2-3 Wochen vor dem Abfohltermin zu boostern. Dann würde der Abfohltermin mit dem maximalen Impftiter zusammenfallen. Das Neugeborene würde so die maximale Menge an maternalen Antikörpern über das Kolostrum erhalten.

Diese biologischen Abläufe sollten in weiteren Impfungsstudien untersucht werden.

4. Gruppe: Jährlinge vor/nach der Grundimmunisierung

Alle erst im Jährlingsalter geimpften Stuten waren vor der Impfung als seronegativ einzustufen. Sie besaßen zum Erprobungszeitpunkt keinen ausreichenden Antikörperschutz gegen eine Tetanusinfektion.

Schlussfolgernd aus den Ergebnissen der Gruppe 3 war anzunehmen, dass auch bei diesen Tieren die Titer ab dem 7. Lebensmonat unter den Cut off fielen. Somit waren die Tiere vermutlich maximal 5 Monate ohne ausreichenden Schutz.

Zu erklären wäre die niedrige Erkrankungsrate trotz Unterschreiten des Cut off in Meura mit dem Sensibilisierungsprozess (LÖHRER et RADVILA, 1970):

So besteht die Annahme, dass es durch den oralen Kontakt mit Clostridiumsporen zu einer Sensibilisierung des Immunsystems und dem Aufbau einer zellulären Immunität gekommen ist. Zusätzlich kann auch über Mikroläsionen in der Darmschleimhaut eine Sensibilisierung mit natürlicherweise im Kot vorkommenden Clostridien stattgefunden haben. Dieser Erstkontakt mit dem Antigen hat, wie bei der Erstimpfung, über das Priming den Aufbau einer zellulären Immunität induziert. Diese reicht laut THEIN (2007) aus, um das Tier trotz Werten unterhalb des Cut off vor einer Infektion zu schützen.

Allerdings stellt sich hier wiederum die Frage, wie man das Vorkommen von Clostridiumsporen nachweist. Darüber hinaus ist es nicht möglich, einer Dosis Clostridiensporen einen Wert zuzuordnen, der über pathogen oder immunitätssteigernd entscheidet.

Aus Tierschutzgründen ist es zu empfehlen, sich den Cut off-Grenzen entsprechend zu verhalten und zu reagieren.

Zwei Wochen nach der Erstimpfung zeigten alle Stuten einen maximalen Titeranstieg. 5 Tage nach der Boosterung stiegen bei allen Tieren die Titer noch einmal fast um das Doppelte des Titers bei der Erstimpfung an.

Dies entsprach ungefähr den Titerverläufen der grundimmunisierten Saugfohlen.

8 Tage nach der Erstimpfung konnte ein geringgradiger Titereinbruch gemessen werden. Wahrscheinlich ist dieser Titereinbruch zustande gekommen, weil der Prototyp „Schnelltest“ nicht zwischen IgM und IgG differenzieren konnte.

Da die Halbwertszeit der IgM wesentlich kürzer ist, sank der Titer einige Tage nach der Impfung geringgradig ab. Auch die Halbwertszeit der IgG ist limitiert, so dass der Titer sich im weiteren Verlauf auf einem niedrigeren Niveau als auf dem Impfmaximum eingependelt hat.

Die WHO empfiehlt zur Erreichung von dauerhaft hohen Titern, die Boosterung mit dem maximalen Titeranstieg der Erstimpfung zusammenfallen zu lassen. Das wäre hier schon nach ca. 2 Wochen der Fall gewesen.

Auch in den anderen Gruppen konnte ein maximaler Titeranstieg nach 2 Wochen beobachtet werden. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse sollte untersucht werden, ob mit einer früheren Boosterung ein höherer Impftiter erreicht werden kann.

Laut Impfeempfehlungen der Hersteller soll die zweite Grundimmunisierung 4-6 Wochen nach der ersten Impfung erfolgen.

THEIN (2007) hingegen empfiehlt, die Zweitimpfung sogar erst 6-12 Wochen nach der Erstimpfung vorzunehmen. Er begründet dies mit dem bei Mensch und Pferd langsam vonstatten gehenden Sensibilisierungsprozess nach der Erstimpfung. Nach seinen Erfahrungen reagiert der Organismus schneller und mit höheren Antikörpertitern, wenn diese Zeit eingehalten wird.

Die Aussagen von WILSON (2001), dass seronegative Jährlinge nach der Erstimpfung einen höheren Titeranstieg als erstgeimpfte, 6 Monate alte Fohlen zeigen, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Beide Gruppen entwickelten ähnlich hohe Impftiter, sowohl nach der Erstimpfung als nach der Zweitimpfung. Auch das Erreichen der maximalen Impftiter nach den Impfungen stimmte bei beiden Gruppen (Fohlen/Jährlinge) zeitlich überein.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen von WILSON et al. (2001) erreichten die Jährlinge nach der zweiten Impfung eine weitere Titerzunahme. Bestätigt werden konnte also nur, dass maximale Impftiter von den Jährlingen und den Fohlen in gleichem zeitlichem Abstand zur Impfung erreicht wurden.

5. Gruppe: an Tetanus erkrankte Pferde

Bei allen klinisch an Tetanus erkrankten Pferden war ein Titer unterhalb des festgelegten Cut off von 0,0921 IE/ml zu messen. Dieses Ergebnis hat den in der Laborvalidierung festgelegten Cut off zusätzlich im Feld bestätigt. Alle Werte, die vom Schnelltest als seronegativ beurteilt wurden, manifestierten dies durch die klinische Erkrankung an Wundstarrkrampf.

Die Mutterstute Tara war seronegativ, erkrankte jedoch nicht an Tetanus. Ihr Fohlen erkrankte, da es von der seronegativen Mutter keine Antikörper über das Kolostrum aufgenommen hatte.

Häufig reicht schon eine ungenügende Nabelhygiene als Auslöser einer Tetanusinfektion. Eine einmalige Desinfektion mit Jod bietet keinen sicheren Schutz. Clostridiumsporen können in den Kreislauf gelangen, ohne dass Fohlen seronegativer Mütter Verletzungen aufweisen müssen.

Das Fohlen a.d. Tara war mit 4 Monaten für die Tetanusinfektion über den Nabel sicherlich schon zu alt gewesen. Eine Primärläsion als Eintragsort konnte nicht identifiziert werden. Dieses Beispiel zeigt, wie pathogen sich Clostridiumsporen bei fehlendem Antikörpertiter auswirken können.

Die Therapie der an Tetanus erkrankten Tiere Fohlen a.d. Tara und Prinz schloss bei beiden die Antitoxingabe sowohl intravenös als auch intramuskulär ein. Danach war bei beiden ein direkter Titeranstieg zu beobachten.

Die Ergebnisse aus Gruppe 2, 3 und 4 haben gezeigt, dass frühestens 14 Tage nach der Erstimpfung mit einem Titeranstieg zu rechnen war. Die bei beiden innerhalb weniger Tage beobachteten Titerzunahmen, konnten nicht aus der Produktion eigener Antikörper durch die Simultanimpfung entstanden sein. Die gemessenen Titerzunahmen müssen aus der Serumtherapie resultiert haben. Beim Fohlen a.d. Tara wurde ein Anstieg von 0,035 IE/ml auf 0,46 IE/ml gemessen. Da die genaue Dosierung des Antitoxinserums nicht bekannt war, konnte die direkte Titerzunahme unter einer bestimmten Antitoxindosis nicht beobachtet werden. Bei diesem Fall lag ein individuelles Ereignis vor, eine allgemeine Aussage ist weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Zusätzlich wird die Verteilung der Serumantikörper durch die Applikationsform beeinflusst. Bei der intramuskulären Applikation muss das Antitoxinserum erst von der Injektionsstelle aus in das nächstgelegene Blutgefäß hindiffundieren, um dann mit dem Blutstrom weitertransportiert zu werden (FORTH et al., 1983). Die Verteilung der Serumantikörper bei der intramuskulären Applikationsform dauert beispielsweise länger als bei der intravenösen Applikation. Durch das Anwenden beider Applikationsformen kann aber ein ausreichender Konzentrationspiegel über einen längeren Zeitraum garantiert werden.

Serumantikörper können freies Tetanustoxin im Blut neutralisieren. Umstritten ist jedoch, ob durch die subarachnoidale Gabe von Serum auch Toxin, welches bereits an die motorische Endplatte gekoppelt ist, noch neutralisiert werden kann (BARTELS, 1992)

Bei dem Fohlen a.d. Tara konnte nach zweiwöchiger mehrmaliger Serumtherapie eine deutliche klinische Besserung beobachtet werden.

Auch bei dem adulten Wallach Prinz war ein Titeranstieg nach Serumtherapie zu beobachten. In diesem Fall lagen keine weiteren Daten zum klinischen Werdegang vor.

In den Fällen einer akuten Tetanuserkrankung empfehlen die Impfstoffhersteller eine Simultanimpfung. Die aktive Antikörperbildung kann unter Serumtherapie geringer ausfallen als bei normal immunisierten Pferden ohne zusätzliche Serumtherapie. Deshalb raten Impfstoffhersteller zu einer dreimaligen Impfstoffgabe im Abstand von 4 Wochen und 12 Monaten, um einem Spättetanus vorzubeugen (FA. INTERVET).

Ausschlaggebend für den Ausgang bei einer Tetanusinfektion scheinen in erster Linie das frühzeitige Erkennen der Erkrankung und das schnelle Einleiten von therapeutischen Maßnahmen zu sein. Außerdem muss die Gabe ausreichend hoher Antitoxindosen gewährleistet sein. Idealerweise lässt sich das über Messungen der Serumkonzentrationen kontrollieren. Entscheidend ist natürlich auch, wie viele Tetanussporen in den Blutkreislauf gelangen konnten und wie viel Toxin sie schon produziert haben.

Trotz klinischer Bemühungen werden die Überlebenschancen von an Tetanus erkrankten Pferden mit ca. 30 % angegeben. Daher ist es wichtig, dass die Pferdehalter über die Notwendigkeit der Impfung durch den betreuenden Tierarzt aufgeklärt werden. Angesichts der Tatsache, dass es gegen die Tetanusintoxikation eine wirksame Schutzimpfung gibt, ist es unverständlich, dass es immer wieder zu klinischen Tetanusfällen mit tödlichem Ausgang kommt.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Prototyp eines quantitativen Schnelltests für Tetanus beim Pferd entwickelt. Dieser ermöglicht eine Titeraussage innerhalb einer Stunde nach Serumgewinnung.

Die von der OIE (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH, 2009) vorgeschlagenen Richtwerte für veterinärmedizinische *in vitro*-Diagnostik sind bei der Validierung des Prototyps „Schnelltest“ eingehalten worden. Die Ergebnisse des Prototyps „Schnelltest“ entsprechen denen des Doppel-Antigen-ELISA.

Der Cut off wurde für den Prototyp „Schnelltest“ mit 0,0921 IE/ml bestimmt. Seine Sensitivität erreichte 95,65%. Es konnte keine Kreuzreaktivität nachgewiesen werden. Das entspricht einer Spezifität von 100%.

Der Prototyp „Schnelltest“ weist Einschränkungen beim Nachweis von niedrigtitrigen Proben unterhalb des Cut off auf. Außerdem sollte er nur für Bestimmungen von Proben genutzt werden, bei denen die Impfung mindestens 2 Wochen zurückliegt. Da keine Differenzierung zwischen IgM und IgG möglich ist, können falsch positive Aussagen entstehen. So binden IgM-Antikörper zwar an das Tetanustoxin, sind aber nicht in der Lage, es zu neutralisieren (OURTH et MAC DONALD, 1977).

Für den optimalen Feldgebrauch wäre eine Umstellung auf Vollblut als Probenmedium zu empfehlen. Die Weiterentwicklung des Messgerätes mit einer direkten Anzeige des Antikörpergehalts und einer direkten Impfpfehlung würde die Auswertung von Proben im Feld beschleunigen.

Die Felduntersuchungen lieferten folgende Ergebnisse:

- Pferde einer Gruppe bilden trotz gleichen Impfregimes unterschiedlich hohe Antikörpertiter aus. Um einen sicheren Impfschutz zu erzielen, sollten daher die Anwendungsanweisung (Impfintervalle, Menge) des Herstellers befolgt werden.
- Bei Fohlen, deren Mütter nicht zusätzlich *ante partum* geimpft wurden, sollte ab dem 3. Lebensmonat eine Titerbestimmung der Tetanus-IgG vorgenommen werden, wenn keine ausreichende Kolostrumaufnahme garantiert werden kann.

Zusammenfassung

- Bei Fohlen, deren Mütter nicht zusätzlich *ante partum* geimpft wurden, sollte im 5., spätestens 6. Lebensmonat mit der Grundimmunisierung begonnen werden. Durch eine individuelle Titerbestimmung der Tetanus-IgG kann der Impftermin variieren.
- Mit einem Titermaximum ist bei der Erstimpfung nach 14 Tagen zu rechnen. Nach der Zweitimpfung ist ein maximaler Titeranstieg schon nach 5 Tagen erreicht.
- Bei regelmäßig geimpften Tieren ist der Höhepunkt des Antikörpertiters 2 Wochen nach der Impfung erreicht.
- Bei an Tetanus erkrankten Patienten bewirkt eine passive Immunisierung einen Titeranstieg. Die klinische Beeinflussung ist aber wahrscheinlich abhängig von der Menge an freiem und gebundenem Tetanustoxin. Es empfiehlt sich eine Titerbestimmung, um den Behandlungserfolg zu kontrollieren.

7. Summary

(The development of a prototype of a “rapid test” for detection of equine antibodies against tetanus)

In the following dissertation, the prototype of a “rapid test” for detection of equine antibodies against tetanus is developed. This test makes it possible to detect antibodies against tetanus in equine serum within one hour. Moreover the prototype allows making a statement about the antibody titer.

The standard values of the OIE (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH, 2009) to validate *in vitro*-diagnostical tests for veterinary medicine were followed. The rapid test achieves results comparable to the ELISA.

The cut off of the rapid test averaged 0,0921 IU/ml. The sensitivity reached 95,65%. There could not be detected any cross reactions, which equals a specificity of 100%.

There are limitations to analyzing serum samples with an antibody titer below the cut off. The prototype of a “rapid test” also should only be used to analyze serum samples of horses vaccinated more than two weeks ago. This is important, because it is not possible to differentiate between IgM and IgG. Thus, the prototype could give a false positive result.

IgM can attach to the tetanustoxin, but there does not proceed any neutralization reaction of the toxin (OURTH et MAC DONALD, 1977).

The handling of the prototype of a “rapid test” would be easier, if whole blood could be used. A display panel in front of the analyzer showing the antibody titer would also expedite the process.

The results of the in field tests are the following:

- All horses of a group were vaccinated according to the same pattern. They showed however different antibody titers. For this reason, the directions of the producer of the vaccine should be followed strictly in order to ensure the immunization protection.
- Foals whose mothers were not vaccinated against tetanus during the pregnancy should be tested for their antibody titer against tetanus at the age of three months, if there could not be assured an adequate ingestion of colostrum.

Summary

- Foals should be vaccinated at the age of five or six months, if their mothers were not vaccinated additionally during the pregnancy. It is possible to variate the beginning of the vaccination, if the antibody titer is beyond the cut off. Therefore, the tetanus antibody titer of foals has to be detected.
- The maximum antibody titer can be detected 14 days after the first vaccination. After the second vaccination, the maximum antibody titer is already reached after five days.
- After the periodical booster vaccination the maximum antibody titer can be detected after 14 days.
- There could be detected an increase of the antibody titer in horses which came down with tetanus and were medicated with a serotherapy. The success of the serotherapy depends on the bulk of free tetanus toxin and linked tetanus toxin. The antibody titer needs to be detected to control the success of serotherapy.

8. Literaturverzeichnis

- Aybay, C., R. Karakus, A.G. Gündogdu (2003): Development of a Diagnostic and Screening ELISA System for measuring Tetanus Antitoxoid levels. *Turk J Med Sci* 33, 289-294.
- Baker, J.L., D.J. Waters, A. de Lahunta (1986): Tetanus in two cats. *Journal of the American Anima Hospital Association*, 24: 159-64.
- Baljer, G. et al. (1982): Untersuchungen zur intranasalen Schutzimpfung gegen Tetanus beim Pferd. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 95, 208-13.
- Bartels, F., H. Bigalke (1992): Restoration of Exocytosis Occurs after Inactivation of Intracellular Tetanus Toxin. *Infection and Immunity, American Society for Microbiology* 0019-9567/92/010302-06\$02.00/0, 302-307.
- Behr, A. et al. (2010): Immunologie der Impfung. *Der Praktische Tierarzt* 91 (Suppl. 2), 4-11.
- Blasi, J., E. Chapman, S. Yamasaki, S. Binz, T. Niemann, R. Jahn (1993): Botulinum neurotoxin C1 blocks neurotransmitter release by means of cleaving HPC-1/syntaxin. *The EMBO Journal*, No. 12, 4821.
- BMELV (Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz) (2009): Leitlinien zur Beurteilung von Pferdehaltungen unter Tierschutzgesichtspunkten.
- Brandis H., W. Köhler, H.J. Eggers, G. Pulverer (1994): *Clostridium tetani* – Tetanus. In: *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie*. Gustav Fischer Verlag, Jena, 7. Auflage, 535-538.
- Bock-Hensley, O. (2003): Impfschutz ältere Menschen nicht vergessen! Tetanus-Fallbericht aus dem Rhein-Neckar-Kreis. *Impfdialog* 4/2003, 175-176.

- Böhnel, H., U. Wernry, F. Gessler (2003): Two cases of Equine Grass Sickness with Evidence for Soil-borne Origin involving Botulinum Neurotoxin. *Journal of Veterinary Medicine*, Vol. 50, Issue 4, 178-82.
- Böhnel, H., F. Gessler (2010): Diagnostische Möglichkeiten des Nachweises von Botulismus beim Pferd. *Leipziger Blaue Hefte*, Band 1, 5. Leipziger Tierärztekongress, 219-222.
- Borrow, R., P. Balmer, M. Roper (2006): 1. Tetanus, 1.1. Tetanus toxin. World Health Organisation: *The Immunological Basis for Immunization Series; Modul 3; Update 2006*, 1.
- Castel, P. (2009): *The European Pharmacopoeia and humane endpoints.*
Kap.: Human endpoints in animal experiments for biomedical research. *European Pharmacopoeia*, European Department for the Quality of Medicines, Council of Europe, Straßburg, 15-19.
- Coco, S., G. Raposo, S. Martinez, J.J. Fontaine, S. Takamori, A. Zahraoui, R. Jahn, M. Matteoli, D. Louvard, T. Galli (1999): Subcellular Localization of Tetanus Neurotoxin-Insensitive Vesicle-Associated Membrane Protein (VAMP)/VAMP7 in Neuronal Cells: Evidence for a Novel Membrane Compartment. *The Journal of Neuroscience* 19 (22), 9803-9812.
- Cook, T.M., R.T. Protheroe, J.M. Handel (2001): Tetanus: a review of the literature. *British Journal of Anaesthesia*, Vol. 87, No. 3, 477-487.
- Cornille, F., L. Martin, C. Lenoir, D. Cussac, B.P. Roques, M.C. Fournie-Zaluski (1995): Cooperative exosite-dependent cleavage of synaptobrevin by tetanus toxin light chain. *J.Biol.Chem.*, 272, 3459-3464.
- Danner, K., R. Brunner (2002): *Schutzimpfungen beim Pferd*, 4.9. Tetanus.
In: Selbitz, H.J., M. Moos (Hrsg.): *Tierärztliche Impfpraxis*. Enke Verlag, Stuttgart, 2. Auflage, 136-139.

De Barros Miranda-Filho, D., R. Arraes de Alencar Ximenes, A. Alci Barone, V. Luiz Vaz, A. Gomes Vieira, V. Maria Concalves Albuquerque (2004): Randomised controlled trial of tetanus treatment with antitetanus immunoglobulin by the intrathecal or intramuscular route. *BMJ* 2004.

Deutsches Grünes Kreuz (2010): Tetanus. *Impfen und Infektionskrankheiten*

DIN 58967-30 (2000): 3.1.1 und 3.1.2. *DIN Taschenbuch 222 - Medizinische Mikrobiologie und Immunologie - Diagnostische Verfahren*, Beuth-Verlag, Berlin, 3. Auflage, 83-92.

DIN EN ISO/IEC 17025: 2005-08 (2005): *Allgemeine Anforderung an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien*.

Dolly, O.J. et al. (1995): Zusammensetzung und Methode zur Verlängerung der Wirkung des Clostridiumneurotoxins.

Edmonds, J.D., D.W. Horohov, M.R. Chapman, M.R. Pourciau, K. Antoku, K. Snedden, T.R. Klei (2001): Altered immune response to a heterologous protein in ponies with heavy gastrointestinal parasite burdens. *Equ. Vet. J.*, 33, 7, 658-663.

Eich, K.O., U. Schmidt (2004): *Handbuch der Schweinekrankheiten*. Verlagsunion Münster, 3. Auflage.

EU-Direktive 86/609: *Protection of animals used for experimental and other scientific purposes*.

Europäisches Arzneibuch (2008): 2.7.8 Bestimmung der Wirksamkeit von Tetanus-Adsorbat-Impfstoff, Methode B. *Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, und Govi-Verlag-Pharmazeutischer Verlag GmbH, Eschborn*, 6. Ausgabe, Grundwerk 2008, Band 1.

Fa. Axis-Shield, Heidelberg.

Fa. Fort Dodge Veterinär GmbH (2010): Duvaxyn IE-T plus, Impfschema.

Fa. Intervet Deutschland GmbH(2010): Grundimmunisierung Pferd.
Equilis Tetanus-Vaccine(Impfstoffherstellerangaben).

Fa. MedLance Pharma GmbH, Wien.

Fa. Merial GmbH (2010): ProteqFlu-Te, Dosierung.

Fa. WdT eG (2010): Tetanusserum, Allgemeine Angaben.

Fa. WdT eG (2010): Equima Te, Dosierung.

FN (Deutsche Reiterliche Vereinigung) (2008): Regelwerk für den Deutschen Tuniersport.
Leistungsprüfungsordnung (LPO).

Forth, W., D. Henschler, W. Rummel (1983): Aufnahme von Pharmaka nach
parenteraler Zufuhr. In: Forth, W., D. Henschler, W. Rummel (Hrsg.):
Pharmakologie und Toxikologie. Wissenschaftsverlag Bibliographisches
Institut, Mannheim, Wien, Zürich, 4. Auflage, 31-35.

Funk, W., V. Dammann, G. Donnervert (1992): Qualitätssicherung in der Analytischen
Chemie. VCH, Weinheim.

Gasteiner, J. (2009): Erkrankungen durch Clostridien bei Ziegen.
4. Fachtagung für Ziegenhaltung 2009.

Grabner, A. (2008): Aktuelle Infektionsprophylaxe beim Pferd. Bpt-Kongress, Hannover
2008, 70-74..

Grabner, A. (2009): Persönl. Mitteilung.

- Gross, S., S.W. Janssen, B. de Vries, E. Terao, A. Daas, K.H. Buchheit (2009): Collaborative study for the validation of alternative in vitro potency assays for human tetanus immunoglobulin. *Pharmeur Bio Sci Notes*. 2009 (1), 11-25.
- Grosse-Herrenthey, A. (2004): Untersuchungen zu den Einflussfaktoren einer effizienten Bekämpfungsstrategie für Rinderbotulismus in Brasilien; Diss. med. vet., Universität Leipzig.
- Guglick, M.A., C.G. Mac Allister, R.W. Ely, W.C. Edwards (1995): Hepatic disease associated with administration of tetanus antitoxin in eight horses. *J Am Vet Med Assoc*. 206 (11), 1737-1740.
- Guyennet, E., J. Guyomard, E. Barnay, F. Jegoux, J. Charlin (2009): Cephalic Tetanus from Penetrating Orbital Wound. *Case Reports in Medicine*.
- Haukanes, Kvam (1993): Applikation of magnetic beads in bioassays. *Biotechnology* 11(1), 60-63.
- Heldens, J.G., A.J. Kersten, M.W. Weststrate, R. van den Hoven (2001): Duration of immunity induced by an adjuvanted and inactivated equine influenza, tetanus and equine herpesvirus 1 and 4 combination vaccine. *Vet Q* 23 (4), 210-217.
- Hendriksen, van de Gun, Kreeftenberg (1989): Combined estimation of tetanus and diphtheria antitoxin in human sera by the in vitro toxin-binding inhibition (ToBI) test. *J Biol Stand* 17, 191-200.
- Hong, H.A., N.T. Ke, T.N. Nhon, N.D. Thinh, J.W. van de Gun, J.T. Hendriks, J.G. Kreeftenberg (1996): Validation of the combined toxin-binding inhibition test for determination of neutralizing antibodies against tetanus and diphtheria toxins in a vaccine field study in Viet Nam. *Bull World Health Organ* 74 (3), 275-282.
- Huet, M. (1989): Rapid diagnostic methods. In: Nistico, G., B. Bizzini, B. Bytchenko, R. Triau (Hrsg.): Eighth in conf. tetanus. Pythagora Press, Rom, 457-464.

IfSG - Infektionsschutzgesetz (2000, geändert 2009): Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen.

Immunolab GmbH, Kassel (2007): Tetanus Toxoid IgG ELISA-Enzymimmunoassay auf Mikrotiterbasis zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von humanen IgG-Antikörpern gegen Tetanus Toxoid in Serum und Plasma. Arbeitsanleitung, 1-8.

Institut Virion / Serion GmbH: Serion ELISA classic Tetanus IgG. Produktinformation.

Jakobson, R.H. (1998): Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. Rev Sci Tech; 17(2), 469-526.

James, K. (1990): Immunoserology of Infectious Diseases. Clinical Microbiology Reviews, American Society of Microbiologie 0893-8512/90/020132-21\$02.00/0, 132-152.

Jansen, B.C., P.C. Knoetze (1979): The immune response of horses to tetanus toxoid. Onderstepoort J Vet Res. 46 (4), 211-216.

Jungi, T.W. (1996): Zelluläre und Molekulare Grundlagen der Immunologie. Institut für Veterinär-Virologie, Universität Bern, Version 2.5.

Kettrup, A., P. Krämer (2000): Validierung kommerziell verfügbarer Immunoassays für den Einsatz bei der Erfassung und Bewertung von Altlastflächen. GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Abschlussbericht 2000.

Kirchgeßner, M. (2004): 9.2.1.2 Laktation. In: Kirchgeßner, M. (Hrsg.): Tierernährung. DLG-Verlag, Frankfurt am Main, 11. Auflage, 501-503.

Klein, J. (1991): Immunologie. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1. Auflage.

- König, K., H. Ringe, B.G. Dorner, A. Diers, B. Uhlenberg, D. Müller, V. Varnholt, G. Gaedicke (2007): Atypical tetanus in a completely immunized 14-year-old boy. *Pediatrics* 2007, 120, e1355-e1358.
- Kolbe und Clough (1999): Quantitation of commercial equine tetanus antitoxin by competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999; July, 24(3)3: 313-317.
- Kollaritsch H. (2007): Feststellung des Tetanus-Immunistatus-Innovation durch Schnelltest. *Arzt und Praxis*, Jahrgang 61/927/2007.
- Lesnik, B. (1994): Immunoassay Methods: Development and Implementation Programm at the USEPA Food Agric. *Immunol.* 6, 251-259.
- Liefman, C.E. (1980): Combined active-passive immunisation of horses against tetanus. *Aust. Vet. Journal* 56 (3), 119-122.
- Lindner, K.E. (1971): Veterinärmikrobiologischer Kurs. Fischer Verlag, Jena.
- Löffler, G. (2003): 19.4 Aufbau, Biosynthese und Funktion von Immunglobulinen. In: Löffler, G. (Hrsg.): *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. Springer-Verlag, Berlin, 5. Auflage, 585-592.
- Löhner, J., P. Radvila (1970): Aktive Tetanusprophylaxe beim Pferd und Immunitätsdauer. *Schweizer Arch. Thkd.*, 112, 7, 307-314.
- Lorenz, R.J. (1996): 6. Schließende Statistik: Signifikanztests. In: Lorenz, R.J. (Hrsg.): *Grundbegriffe der Biometrie*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 4. Auflage, 148-200.
- Madigan, M., J. Martinko, (2006): *Biology of Microorganisms*, Pearsons Prentice Hall, 11ed, 309-11, 718-19.

- Matos, D., R. Marcovistz, P.H. Cabello, R.A. Georgini, D. Sakauchi, L.L. da Silva (2002): Immunogenicity Test of Tetanus Component in Adsorbed Vaccines by Toxin. Mem. Inst. Oswaldo Cruz vol. 97 no. 6 Rio de Janeiro, 909-913.
- Matsuda, M., N. Sugimoto, K. Ozutsumi, T. Hirai (1982): Acute botulinum-like intoxication by tetanus neurotoxin in mice. Biochem Biophys Res Commun, 104, 799-805.
- Matsuda, M., G. Maknaga, T. Hirai (1983): Studies on the antibody composition and neutralizing activity of tetanus antitoxin sera from various species of animals in relation to the antigenic substructure of the tetanus toxin molecule. Biken J. 26 (4), 133-143.
- Mc Guire, T.C., T.B. Crawford (1972): Identification and quantitation of equine serum and secretory immunoglobuline A. Inf. Immun 6, 610-615.
- Meyer, M. (2008): Entwicklung von diagnostischen Assays mit Magnetic Beads und frequenzmischungs-basierter Detektion. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften des Fachbereichs Pharmazie der Philipps-Universität Marburg.
- Miethe, P. (2009): HDR-Immunofiltration. fzmb GmbH.
- Miethe, P. (2009): Persönl. Mitteilung.
- Mülverstedt A.J. (2006): Entwicklung und Validierung eines ELISA zur Beurteilung der Tetanusvakzinierung am Beispiel eines Pferdebestandes in Thüringen; Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Agrarwissenschaften der Georg-August-Universität Göttingen.
- Muirhead, T.L., J.T. Mc Clure, et al. (2006): The effect of age on serum antibody titers after rabies and influenza vaccination in healthy horses. J. Vet. Intern. Med. 22(3), 654-661.

- Mumford, J.A., D.M. Jessett, E.A. Rollinson, D. Hannant, M.E. Draper (1994): Duration of protective efficacy of equine influenza immunostimulating complex/tetanus vaccines. *Vet. REC.* 134 (7), 158-162.
- OIE (World organisation for animal health) (2000): Principles of validation of diagnostic assays for infection diseases. In: *Manual standards for diagnostic test and vaccines*. Chapter I.1.3.
- OIE (World organisation for animal health) (2009): Standard Operation Procedure for OIE Validation and Certification of Diagnostic Assays (SOP). Version 2.1 (06/2009).
- Ourth, D., A.B. Mac Donald (1977): Neutralization of tetanus toxin by human and rabbit immunoglobulin classes and subunits. *Immunology* 33, 807-815.
- Pellizzari, R., O. Rossetto, L. Lozzi, S. Giovedi, E. Johnson, C.C. Shone, C. Montecucco (1995): Structural determinants of the specificity for synaptic vesicle-associated membrane protein-7/synaptobrevin of tetanus and botulinum type B and G neurotoxins. *J. Biol.Chem.*, 271, 20353-20358.
- Perryman, L.E., T.C. Mc Guire (1980): Evaluation of immune system failure in horses. *J. AM. Vet. Med. Assoc.*, 176, 1374-1377.
- Persson, B.A., J. Vessman (1998): Is Your Method Specific or Just Selective. *LC-GC International* 11, 30-34.
- Preventis GmbH: Prevent ID ® Tetanus. Bensheim.
- Raab, G. (1983): Comparison of a logistic and mass-action curve for radioimmunoassay data. *Clin Chem* 29 (10), 1757-1761.
- Radvila, P. (1975): Prevention of tetanus in man and animal following injury. *Arch. Exp. Veterinarmed.*, 469-481.

- Redli, P. (2006): Wie groß ist die evolutionäre Distanz zwischen dem von *Clostridium tetani* gebildeten Tetanustoxin und den sieben von *Clostridium botulinum* produzierten Neurotoxinsertypen. Universität Zürich, Fallstudie SS 2006, Bio-126.
- RKI (Robert Koch-Institut) (2004): Tetanus. Ratgeber Infektionskrankheiten-Merkblätter für Ärzte, 6/2004.
- RKI (Robert Koch-Institut) (2009): Empfehlungen der Ständigen Impfkommission (STIKO) am Robert Koch-Institut/Stand: Juli 2009. Epidemiologisches Bulletin, 27. Juli 2009/Nr. 30.
- Roche Lexikon Medizin (1999): Latextests. Urban und Fischer Verlag, München, 4. Auflage.
- Roskopf, U. (2007): Validierung der Wirksamkeitsprüfung für *Clostridium tetani* Impfstoffe ad usum veterinarium durch den direkten Nachweis von Tetanusantitoxin im Zieltier mittels ELISA. Diss. Dr. Biol. Anim., Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Russel, A.W. (1937): Pigeons as possible tetanus carriers. The British Medicinal Journal, Dec. 18, 1220.
- Samuel, C.A., W.R. Allen, D.H. Steven (1976): Studies on the equine placenta. II: Ultrastructure of the placental barriere. J. Reprod. Fertil. 48, 246-257.
- Scheibel I. (1955): The uses and results of active Tetanus immunization. Bull. Org. mond. Santé und Bull. Wld Hlth Org. 13, 381-394.
- Schiavo G. et al. (1992): Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. Nature (London) 359, 32-835.
- Schmall, L.M. (1997): 16. Immunization. In: Robinson, N.E., K.A. Sprayberry (Hrsg.): Current Therapy in Equine Medicine. Saunders Elsevier, 4. Auflage.
- Schofer, J. (1995): Tetanus beim Schwarzwälder Pferd. Tierärztl Umschau 1995, 50, 396-399.

Schusser, G.F. (2007): Persönl. Mitteilung.

Selbitz H.J. (2002): 5.B3.4 Clostridium. In: Mayr A., M. Rolle (Hrsg.): Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Enke Verlag, Stuttgart, 7. Auflage.

Shindman, J. (1994): Horse products for tetanus prophylaxis. Can. Med. Assoc. J. 151 (1), 16.

Silberbach, K. (2005): Entwicklung einer *in vitro*-Methode zur Detektion von residualer Toxizität in Tetanusimpfstoffen. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main.

Simonsen, O., M.W. Bentzon, I. Heron (1986): ELISA for the routine determination of antitoxic immunity to tetanus. J. Biol.Stand. 14, 231-239.

Smith, K.L., L.A. Muir, L.C. Ferguson, H.R. Conrad (1971): Selective transport of IgG 1 into the mammary gland: role of oestrogen and progesterone. J. Dairy Sci., 54, 1886-1894.

Spaun, J., J. Lyng (1970): Replacement of the International Standard for Tetanus Antitoxin and the Use of the Standard in the Flocculation Test. Bull. Org. mond. Santé und Bull. Wld Hlth Org. 42, 523-534.

Sprott K.-R. (2008): Generalized tetanus in a Labrador retriever. Can Vet J 49, 1221-1223.

Stöber, M. (2002): Tetanus. In: Dirksen, G., G. Rosenberger (Hrsg.): Innere Medizin und Krankheiten des Rindes. Blackwell Verlag GmbH, 4. Auflage, 1068-1071.

Straiton, E.C. (1992): Tetanus. In: Straiton, E.C. (Hrsg.): Pferdekrankheiten erkennen + behandeln. BLV Verlagsgesellschaft mbH, München, 9. Auflage, 75-77.

Swaminathan, S., S. Eswaramoorthy (2006): Structural analysis of the catalytic and binding sites of *Clostridium botulinum* neurotoxin B. Nat. Struct. Biol. 7, 693-699.

- Szentkuti L., H.J. Ehrlein (2000): Muskelphysiologie. In: Engelhardt W., G. Breves (Hrsg.): Physiologie der Haustiere. Enke Verlag, Stuttgart, 110-132.
- Thein, P. (2007): Schutzimpfungen beim Pferd. Der Praktische Tierarzt 88 (Suppl. 3), 4-8.
- Thein, P. (2007): Equine Influenza. Der Praktische Tierarzt 88 (Suppl. 3), 9-12.
- Thein, P. (2007): Tetanus (Wundstarrkrampf). Der Praktische Tierarzt 88 (Suppl. 3), 18-19.
- Thein, P. (2009): Tetanus bei Mensch und Pferd. Der Praktische Tierarzt 90 (Suppl. 1), 36-41.
- Tierschutzgesetz (BGB 1.IS.-1207): Fünfter Abschnitt: Tierversuche. Fassung 18.5.2006, letzte Änderung 15.7.2009: §7, 8, 8a, 8b, 9, 9a.
- Tizard, I. (2000): Immunity in the Fetus and Newborn. In: Veterinary Immunology-An Introduction. W.B. Saunders Company, 6. Auflage, 210-221.
- Tonello, F., S. Morante, O. Rossetto, G. Schiavo, C. Montecucco (1995): Tetanus and botulism neurotoxins: a novel group of zinc-endopeptidases. Adv. Exp. Med. Biol., 389, 251-260.
- Turillazzi, E., M. Neri, C. Pomara, I. Riezzo, V. Fineschi (2009): An immunohistochemical study on a tetanus fatal case using toxin fragment C (TTC). Should it be a useful diagnostic tool? Neuropathology, 2009, 29, 68-91.
- Turton, K., J. Chaddock, K. Ravi Acharya (2002): Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility. TRENDS in Biochemical Sciences, Vol. 27 No. 11.
- Vahlenkamp, T. (2011): Infektion und Impfung: Immunologie bei der Katze. Hundkatze Pferd, 01/11.

- van Galen, G., C. Delguste, C. Sandersen, D. Verwilghen, S. Grulke, H. Amory (2008): Tetanus in the equine species: a retrospective study of 31 cases. Tijdschr Diergeneeskd 133 (12), 512-517.
- van Hoeven, K., C. Dale, P. Foster, B. Body (2008): Comparison of Three Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detection of Immunoglobulin G Antibodies to Tetanus Toxoid with Reference Standards and the Impact on Clinical Practice. Clinical and vaccine immunology, American Society of Microbiologie 15 (12), 1751-1754.
- van Maanen, C., G. Bruin, et al. (1992): Interference of maternal antibodies with the immune response of foals after vaccination against equine influenza. Vet. Q. 14(1), 13-17.
- Vörös, K., T. Abonyi, Z. Bakos (1997): Tetanus beim Pferd: Klinische Diagnostik und Therapie. Tierärztl Umschau 1997, 52, 278-281.
- Volk, W.A., B. Bizzini, R.M. Snyder, E. Bernhard, R.R. Wagner (1984): Neutralization of Tetanus Toxin by Distinct Monoclonal Antibodies Binding to Multiple Epitopes on the Toxin Molecule. Infection and Immunity, American Society for Microbiology 0019-9567/84/090604-06\$02.00/0, 604-609.
- Weisstein, E. W. (2011): „Standard Duration Distribution“. Math World-A Wolfram Web Ressource.
- Wendel, A. (2005): Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)-Immunochemischer Nachweis von Antikörpern gegen Tetanustoxin im menschlichen Serum. Universität Konstanz, Versuch 3 Z, 1-9.
- Wheeler, S.J., et al. (1994): Small animal spinal disorders: diagnosis and surgery, St Louis, 1994, Mosby.

WHO (World health organisation) (2007): Calibration of replacement international standard of tetanus toxoid for use in flocculation test. Expert committee on biological standardization, 2007.

Wilson, W.D., J.E. Mihalyi, S. Hussey, D.P. Lunn (2001): Passive transfer of maternal immunoglobulin in isotype antibodies against tetanus and influenza and their effect on the response of foals to vaccination. *Equine Veterinary Journal* 33 (7), 644-650.

Wright, P.F. (1998): International standards for test methods and reference sera for diagnostic tests for antibody detection. *Rev Sci Tech.*; 17(2), 527-549.

www.onmeda.de; Infektionskrankheiten: *Clostridium tetani*.

www.vaccinetraining.com/project.html; Background information, 1-4.

9. Anhang

9.1. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

- Tab. 1 Immunglobulinverhältnis und Immunglobulingehalt im Kolostrum und in der Milch der späteren Laktation beim Pferd
- Tab. 2 Messwerte Intraassay
- Tab. 3 Messwerte Interassay
- Tab. 4 Messwerte Kreuzreaktivität
- Abb. 1 Eichung des Monolayers, d.h. nur mit einer Messfritte in der Säule
- Abb. 2 Schematische Darstellung der Frittenanordnung in der Säule
- Abb.3 Eichung Multilayer in der Anordnung Nk, Mf, Pk (von oben beginnend)
- Abb. 4 Eichung Multilayer in Endausführung (Nk, Pk, Mf)
- Abb. 5 Eichkurve indirekter ELISA
- Abb. 6 Gegenüberstellung von eingesetzter Konzentration und berechneter Konzentration aus der Eichung des ELISA
- Abb. 7 Eichkurve Prototyp „Schnelltest“
- Abb. 8 Gegenüberstellung von eingesetzter Konzentration und berechneter Konzentration aus der Eichung des Prototyps „Schnelltest“
- Abb. 9 Kurvendarstellung Intraassay

- Abb. 10 Kurvendarstellung Interassay
- Abb. 11 Einzeltiterverläufe der Altstuten
- Abb. 12 Einzeltiterverläufe der Stuten mit Fohlen
- Abb. 13 Einzeltiterverläufe der Fohlen
- Abb. 14 Durchschnittlicher Titerverlauf beim Saugfohlen während der Grundimmunisierung
- Abb. 15 Antikörpertiterverlauf bei Jährlingen während der Grundimmunisierung
- Abb. 16 Titer von erkrankten Pferden
- Abb. 17 Antikörperverserlauf des Fohlens a.d. Tara unter der Serumtherapie
- Abb. 18 Antikörperverserlauf Prinz unter der Serumtherapie
- Abb. 19 Vergleich von Prototyp „Schnelltest“ und ELISA anhand gemessener Mäuseseren
- Abb. 20 Vergleich von Prototyp „Schnelltest“ und ELISA anhand gemessener Pferdeseren

9.2. Datentabellen

Datentabelle 1: Eichung des ELISA (Variante V)

Proben IE/ml	Eichung (OD)			
	I	II	III	MW
0,016	2,525	2,501	2,566	2,5307
0,008	1,851	1,935	1,866	1,8840
0,004	1,122	1,128	1,138	1,1293
0,002	0,669	0,674	0,654	0,6657
0,001	0,321	0,329	0,338	0,3293
0,0005	0,196	0,181	0,186	0,1877
0,00000001	0,005	0,0004	0,007	0,0041
0-0	0,008	0,004	-0,008	0,0013

Datentabelle 2: Eichung des Schnelltests

Nk: Negativkontrollfritte

Pk: Positivkontrollfritte

Mf: Messfritte

Probe	Fritten (OD)	I	II	III	MW
1IE/ml	Nk	n0,084	0,079	0,800	
	Pk	1,108	1,118	1,155	
	Mf	1,447	1,462	1,429	1,45
0,75IE/ml	Nk	0,081	0,078	0,790	
	Pk	1,153	1,208	1,148	
	Mf	1,386	1,457	1,430	1,42
0,5IE/ml	Nk	0,076	0,074	0,074	
	Pk	1,154	1,116	1,077	
	Mf	1,376	1,379	1,353	1,37
0,25IE/ml	Nk	0,085	0,074	0,079	
	Pk	1,097	1,091	1,117	
	Mf	1,145	1,157	1,121	1,14
0,125IE/ml	Nk	0,083	0,078	0,082	
	Pk	1,110	1,231	1,167	
	Mf	0,945	0,893	0,913	0,92
0,1IE/ml	Nk	0,088	0,083	0,086	
	Pk	1,136	1,092	1,234	
	Mf	0,787	0,764	0,781	0,78

0,075IE/ml	Nk	0,082	0,073	0,073	
	Pk	1,172	1,510	1,280	
	Mf	0,708	0,688	0,694	0,70
0,05IE/ml	Nk	0,081	0,079	0,082	
	Pk	1,077	1,208	1,080	
	Mf	0,302	0,329	0,301	0,31
0,025IE/ml	Nk	0,085	0,093	0,091	
	Pk	1,131	1,160	1,135	
	Mf	0,158	0,157	0,149	0,15
0,0125IE/ml	Nk	0,111	0,084	0,087	
	Pk	1,156	1,093	1,100	
	Mf	0,097	0,095	0,099	0,10
0,01IE/ml	Nk	0,081	0,083	0,088	
	Pk	1,213	1,123	1,142	
	Mf	0,094	0,090	0,083	0,09
0,005IE/ml	Nk	0,084	0,082	0,085	
	Pk	1,053	1,080	1,136	
	Mf	0,082	0,073	0,076	0,08
0	Nk	0,086	0,079	0,072	
	Pk	1,117	1,103	1,193	
	Mf	0,077	0,078	0,075	0,08
0-0	Nk	0,084	0,099	0,078	
	Pk	1,122	1,036	1,115	
	Mf	0,070	0,077	0,069	0,07

Datentabelle 3: Messwerte Intraassay

Nk: Negativkontrollfritte

Pk: Positivkontrollfritte

Mf: Messfritte

Proben		1IE/ml high	0,5IE/ml medium	0,1IE/ml low	0IE/ml Blindwert
1	Nk	0,089	0,090	0,090	0,260
	Pk	1,311	1,249	1,226	1,239
	Mf	1,619	1,395	0,692	0,082
2	Nk	0,298	0,090	0,109	0,303
	Pk	1,393	1,219	1,167	1,115
	Mf	1,612	1,445	0,657	0,081
3	Nk	0,100	0,092	0,212	0,248
	Pk	1,338	1,230	1,470	1,231
	Mf	1,627	1,426	0,689	0,088
4	Nk	0,134	0,085	0,190	0,261
	Pk	1,210	1,261	1,181	1,207
	Mf	1,603	1,416	0,657	0,091
5	Nk	0,122	0,107	0,127	0,269
	Pk	1,247	1,237	1,333	1,213
	Mf	1,611	1,341	0,693	0,086
6	Nk	0,095	0,088	0,246	0,091
	Pk	1,279	1,397	1,212	1,139
	Mf	1,565	1,459	0,664	0,084
7	Nk	0,106	0,135	0,095	0,144
	Pk	1,308	1,255	1,196	1,283
	Mf	1,582	1,348	0,681	0,076
8	Nk	0,103	0,095	0,012	0,208
	Pk	1,293	1,264	1,382	1,406
	Mf	1,626	1,401	0,721	0,091
9	Nk	0,099	0,090	0,259	0,222
	Pk	1,479	1,355	1,182	1,371
	Mf	1,718	1,525	0,652	0,073
10	Nk	0,192	0,316	0,165	0,249
	Pk	1,222	1,614	1,327	1,180
	Mf	1,529	1,427	0,718	0,081
11	Nk	0,085	0,178	0,177	0,071
	Pk	1,239	1,279	1,311	1,308
	Mf	1,656	1,458	0,720	0,072

Datentabelle 4: Messwerte Interassay

Nk: Negativkontrollfritte

Pk: Positivkontrollfritte

Mf: Messfritte

Fritten (OD)	Datum	1,6IE/ml		0,4IE/ml		0,1IE/ml		0,025IE/ml		0IE/ml	
		I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Nk	24.6.09	0,136	0,250	0,119	0,103	0,105	0,121	0,109	0,168	0,107	0,204
Pk		1,167	1,456	1,237	1,137	1,124	1,112	1,132	1,251	1,198	1,202
Mf		1,426	1,423	1,177	1,255	0,924	0,891	0,366	0,453	0,060	0,059
Nk	3.7.09	0,139	0,094	0,184	0,068	0,102	0,315	0,122	0,323	0,174	0,176
Pk		1,418	1,150	1,356	1,475	1,293	1,422	1,328	1,467	1,369	1,477
Mf		1,386	1,352	1,308	1,365	0,988	1,126	0,47	0,448	0,08	0,077
Nk	6.7.09	0,213	0,284	0,266	0,290	0,205	0,199	0,078	0,094	0,052	0,066
Pk		1,451	1,580	1,268	1,480	1,577	1,361	1,521	1,524	1,483	1,046
Mf		1,433	1,565	1,396	1,398	1,085	0,887	0,35	0,389	0,046	0,069
Nk	7.7.09	0,181	0,202	0,197	0,224	0,194	0,039	0,177	0,131	0,191	0,118
Pk		1,354	1,500	1,408	1,346	1,296	1,283	1,375	1,348	1,321	1,562
Mf		1,497	1,552	1,394	1,448	0,958	0,892	0,41	0,405	0,04	0,077
Nk	8.7.09	0,094	0,104	0,081	0,090	0,770	0,078	0,079	0,256	0,082	0,120
Pk		1,348	1,302	1,309	1,222	1,359	1,237	1,272	1,611	1,366	1,348
Mf		1,554	1,473	1,436	1,418	1,065	1,018	0,43	0,403	0,06	0,065
Nk	9.7.09	0,088	0,096	0,085	0,089	0,082	0,083	0,210	0,088	0,084	0,076
Pk		1,387	1,291	1,289	1,335	1,364	1,372	1,427	1,317	1,346	1,260
Mf		1,527	1,531	1,429	1,509	0,945	0,927	0,303	0,337	0,061	0,057
Nk	10.7.09	0,094	0,077	0,080	0,088	0,072	0,091	0,088	0,091	0,088	0,088
Pk		1,350	1,302	1,410	1,430	1,375	1,401	1,374	1,322	1,428	1,608
Mf		1,524	1,578	1,446	1,420	1,015	1,036	0,348	0,293	0,054	0,057
Nk	14.7.09	0,379	0,248	0,165	0,130	0,229	0,154	0,520	0,105	0,093	0,095
Pk		1,648	1,542	1,328	1,512	1,578	1,435	1,485	1,342	1,338	1,598

Mf		1,512	1,642	1,366	1,374	0,822	0,982	0,386	0,376	0,054	0,061
Nk	15.7.09	0,185	0,404	0,120	0,093	0,371	0,265	0,214	0,178	0,088	0,112
Pk		1,523	1,690	1,429	1,547	1,540	1,608	1,478	1,555	1,428	1,623
Mf		1,574	1,591	1,541	1,428	0,995	0,963	0,304	0,201	0,052	0,060
Nk	16.7.09	0,099	0,072	0,147	0,236	0,174	0,180	0,258	0,248	0,088	0,079
Pk		0,713	0,864	1,194	1,288	1,066	0,483	0,845	0,812	1,428	1,492
Mf		1,455	1,486	1,308	1,446	0,761	0,846	0,331	0,287	0,056	0,064
Nk	17.7.09	0,120	0,140	0,123	0,209	0,159	0,287	0,286	0,380	0,088	0,087
Pk		1,374	1,366	1,532	1,506	1,235	1,475	1,515	1,646	1,428	1,587
Mf		1,522	1,535	1,507	1,328	0,927	0,916	0,414	0,401	0,049	0,071
Nk	20.7.09	0,154	0,144	0,099	0,109	0,169	0,182	0,086	0,158	0,088	0,095
Pk		1,550	1,487	1,232	1,306	1,335	1,411	1,375	1,446	1,428	1,608
Mf		1,539	1,573	1,447	1,428	1,052	0,947	0,389	0,422	0,057	0,062
Nk	22.7.09	0,138	0,142	0,219	0,145	0,069	0,095	0,154	0,121	0,087	0,104
Pk		1,630	1,590	1,388	1,405	1,286	1,318	1,436	1,472	1,428	1,599
Mf		1,498	1,475	1,477	1,489	0,956	0,973	0,374	0,401	0,059	0,052
Nk	30.7.09	0,087	0,093	0,123	0,128	0,094	0,089	0,230	0,118	0,088	0,089
Pk		1,304	1,345	1,402	1,389	1,478	1,462	1,365	1,423	1,428	1,608
Mf		1,488	1,493	1,389	1,415	0,897	0,928	0,391	0,387	0,051	0,057

Datentabelle 5: Antikörpertiterverlauf (IE/ml) der Stuten der Gruppe 1

Datum	10.08.2004	01.09.2004	30.09.2004	27.10.2004	26.11.2004
Tag	1	23	52	79	109
Usina	1,626	1,365	1,147	1,544	1,532
Casablanca	1,234	1,163	1,116	1,450	1,237
Majala	-	1,320	1,465	1,277	1,258
Malvina	1,164	0,601	0,741	0,741	0,724
Saltine	1,412	1,240	1,240	1,207	1,381
Sansoussi	1,016	0,818	0,589	0,589	1,023
Ufa	1,046	1,386	1,340	1,340	1,323
Ulberta	0,560	0,358	0,475	0,475	-
Urbeta	1,641	1,680	1,680	1,750	-
Urjala	1,684	1,286	1,304	1,304	1,455
Urtania I	-	1,376	1,376	1,231	1,323
Urnida II	-	1,101	0,969	0,896	-
Urbana	1,562	1,448	1,447	1,508	1,531
Urmel I	1,197	1,142	1,342	1,326	1,224
Ursel I	1,063	1,058	1,004	-	1,130
Cora	1,043	1,060	1,040	1,073	1,072
Constanze	1,345	1,445	1,481		-
Heidlore	1,478	1,485	1,325	1,470	1,446
Corina	1,390	1,494	1,403	1,270	1,410
Loanetta	1,423	-	1,595	1,299	1,415
Ursel II	1,641	1,438	1,581	1,222	1,643
Sigrun I	0,832	1,167	0,387	0,345	0,183
Lobde	1,316	1,298	1,325	1,320	1,321
Ullika	1,440	1,516	1,527	1,538	1,585
Urmenia	0,686	0,490	0,731	0,792	0,567
Lona	1,530	1,505	1,430	1,499	-
Lorla	0,929	1,030	1,212	1,226	1,373
Umbra	0,250	1,126	0,905	0,993	1,025
Sigrun II	0,081	1,622	1,560	1,524	1,421
Ulvia	0,061	0,723	0,708	0,828	0,750
Uniza	1,693	1,454	1,515	1,580	1,612
Ulmetta	0,049	0,413	0,876	1,057	1,179
Heidrun	-	0,471	0,424	0,450	0,523
Halmera	0,160	0,513	0,599	0,579	0,557
Beste	0,158	0,711	0,730	0,803	0,738
Heinki	-	0,829	0,805	0,805	0,762
Baska	0,067	1,021	1,109	1,322	1,211

Datentabelle 6: Antikörpertiterverlauf (IE/ml) der Stuten mit Fohlen der Gruppe 2

* Boosterung: 05.04.2005

Datum	Tag	Lara	Logada	Maline	Stille	Ukar	Unita	Urbita	Uriga	Urzana	Usina
23.01.2005	1	1,571	0,915	1,640	1,259	1,619	-	-	1,100	0,688	1,007
23.02.2005	32	1,672	1,232	-	1,314	1,678	1,738	1,332	1,158	0,764	1,115
18.03.2005	55	1,704	1,247	1,624	1,416	1,696	1,815	1,293	1,136	0,669	1,160
06.04.2005	74	0,644	1,360	1,506	1,352	1,683	1,765	1,165	1,132	0,712	1,107
14.04.2005	82	1,484	1,389	-	0,732	1,762	1,816	1,477	1,477	0,753	1,260
20.04.2005	88	1,492	1,546	1,685	1,460	1,733	1,760	1,457	1,455	1,090	1,143
29.04.2005	95	1,465	1,427	1,424	1,585	-	-	-	-	-	1,239
04.05.2005	100	1,215	1,366	1,664	1,331	1,702	1,392	1,555	1,393	0,881	1,129

Datentabelle 7: Antikörpertiterverlauf (IE/ml) der Fohlen der Gruppe 3

* Impfung am 155. und 188. Tag

Datum	Tage	Usina F*	Ukar F	Unita F*	Uriga F*	Urzana F	Urbita F
23.02.2005	1	1,161	-	1,762		-	0,934
18.03.2005	24	0,957	1,135	1,547	0,539	0,768	0,529
06.04.2005	43	0,668	-	1,365	0,331	0,818	0,350
14.04.2005	51	0,598	0,995	1,368	0,345	0,649	0,396
20.04.2005	57	0,595	0,778	1,349	0,329	-	0,426
29.04.2005	66	0,356	0,704	1,302	0,242	0,465	0,265
04.05.2005	71	0,448	0,690	1,080	0,236	-	-
13.05.2005	80	0,367	0,442	1,144	0,187	-	-
02.06.2005	100	0,530	0,327	0,726	0,093	-	-
09.06.2005	107	0,280	0,273	0,724	0,095	-	-
13.06.2005	113	0,114	-	0,542	-	-	-
23.06.2005	123	0,309	0,147	0,303	0,072	-	-
27.06.2005	127	0,161	-	0,229	-	-	-
13.07.2005	143	-	0,118	0,141	0,118	-	-
20.07.2005	160	0,161	0,118	0,141	0,118	-	-
31.08.2005	192	0,147	-	1,484	1,173	-	-
07.09.2005	199	1,606	-	-	1,668	-	-
14.09.2005	206	1,596	-	1,356	1,699	-	-
22.09.2005	214	1,481	0,051	1,139	1,409	0,081	0,106

Datentabelle 8: Antikörpertiterverlauf (IE/ml) der Jährlingsstuten der Gruppe 4

* Grundimmunisierung 30.03.2005 und 29.04.2005

Datum	Tage	Beduine J	Ufa J	Ulberta J	Urbita J	Barcelona J	Urzana J	Ugala J	Urbeta J	Urasion J
23.02.2005	1	0,081	0,069	0,041	-	0,078	0,082	0,042	0,063	-
18.03.2005	24	0,075	0,066	0,037	-	0,073	0,082	0,052	0,046	0,053
01.04.2005	38	0,104	0,055	0,026	-	0,062	-	0,074	0,044	0,044
06.04.2005	43	0,086	0,069	0,056	0,044	0,240	0,083	0,055	-	-
14.04.2005	51	0,068	0,452	0,919	-	0,696	1,037	0,845	0,108	0,516
20.04.2005	57	0,363	0,596	0,580	-	0,882	0,824	0,731	0,165	0,545
29.04.2005	66	0,249	-	0,817	-	0,613	0,627	-	0,142	
04.05.2005	71	1,048	1,347	1,546	-	1,370	1,286	1,613	1,458	1,235
07.09.2005	199	0,921	0,943	0,805	-	0,737	0,449	0,734	0,987	-
14.09.2005	206	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29.09.2005	221	-	0,558	-	-	-	-	-	-	-

Weitere Messdaten der einzelnen ELISA-Varianten, des Durchflussverfahrens und der Schnelltestvarianten können bei Bedarf vorgelegt werden.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Realisierung meiner Dissertation unterstützt und begleitet haben.

Allen voran danke ich meinen Eltern und meinem Freund, die mir als treibende Kraft stets den Rücken gestärkt haben und mich immer wieder zu motivieren wussten.

Herrn Prof. Dr. Grabner danke ich für die freundliche Übernahme der Betreuung dieser Arbeit in der Klinik für Pferdekrankheiten, Allgemeine Chirurgie und Radiologie der Freien Universität Berlin.

Mein besonderer Dank gilt meinen ehemaligen Kolleginnen und Kollegen der Abteilung Diagnostik, der Tierklinik und der Abteilung Geräteentwicklung des Forschungszentrums für Medizintechnik und Biotechnologie in Bad Langensalza. Sie standen mir immer mit Rat und Tat zur Seite und haben durch ihre große Einsatzbereitschaft zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Für die großzügige Bereitstellung von Arbeitsplatz und Material möchte ich mich vor allem bei der Abteilung Diagnostik bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Firma Senova GmbH in Jena bedanken, die mich mit ihrem Wissen und durch die Bereitstellung von Materialien und Laborgeräten tatkräftig unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Jens Siebert, durch den der Kontakt zum Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie zustande gekommen ist.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Wolfenbüttel, den 29.3.2011

Mareike Stelzmann