

Indirekte Komplementbindung mit Mäuseseren nach Schutzimpfung mit monovalenter Maul- und Klauenseuche-Vaccine

Von

E. TRAUB und G. BECHMANN

Mit einer Abbildung

(Eingegangen am 8. Oktober 1968)

Mit Hilfe der indirekten Komplementbindung (IKB) ist es möglich, spezifische Antikörper im Serum von Rindern nachzuweisen, die eine natürliche oder künstliche Infektion mit dem Virus der Maul- und Klauenseuche (MKS) überstanden haben oder mit Totvaccine Schutzgeimpft worden sind (2, 3). Bezüglich der älteren Literatur wird auf eine frühere Arbeit (2) verwiesen.

An dieser Reaktion sind wahrscheinlich neutralisierende Antikörper beteiligt. Die IKB steht dem Neutralisationstest in Zellkulturen an Typspezifität nur wenig nach. Sie ist mit gewissen Einschränkungen zur Prüfung des Immunisierungserfolges (2) und zur Ermittlung empfänglicher Tiere geeignet (3). Auch ist sie technisch einfacher und liefert Ergebnisse viel rascher als der Neutralisationstest.

Rund 8 % der in Persien untersuchten „normalen“ Rinderseren enthielten unspezifische Hemmstoffe („Inhibitoren“), welche die IKB empfindlich störten. Vermutlich handelt es sich um „heterophile“ Antikörper, die wohl mit MKS-Antigen reagieren, den Tieren aber keinen Schutz vor einer MKS-Infektion verleihen (3). In solchen Fällen sind schlußreife Ergebnisse mit der IKB nicht zu erzielen.

Neuerdings haben wir im Hinblick auf eine eventuelle Prüfung von MKS-Vaccine an der Maus IKB-Versuche mit Mäuseseren angestellt. Die vorliegende Arbeit beschreibt die Methodik und gibt erste Ergebnisse von Antikörpermessungen bei Mäusen wieder. Eine weitere Mitteilung (1) wird sich mit einem Vergleich der Resultate der IKB und des Mutter-Babymaus-Testes befassen.

Material und Methoden

MKS-Vaccinen und Schutzimpfung

Verwendet wurden monovalente, nach dem Frenkel-Verfahren hergestellte Totimpfstoffe (Handelsvaccinen) des französischen MKS-Instituts

(IFFA) in Lyon, die bei Mäusen nicht zur Bildung unspezifischer Antikörper gegen die in der IKB benutzten BHK-Antigene (2) führten. Als Verdünnungsmittel diente VM 3 ohne Laktalbuminhydrolysat. Die unverdünnten oder in Zweierpotenzen verdünnten Vaccinen wurden in der Regel in Dosen von 1 ml subkutan in die Kniefalten (0,5 ml auf jeder Körperseite) verimpft. Die Impfung mit unverdünnter Vaccine oder niedrigen Vaccineverdünnungen rief bei der Mehrzahl der Tiere kleinere Abszesse an den Impfstellen hervor, die jedoch das Allgemeinbefinden der Mäuse und das Wachstum bei Jungtieren nicht störten.

Mäuse

Diese stammten aus einer institutseigenen Kolonie des nicht ingezüchteten N.M.R.I.-Stammes. Benutzt wurden in der Hauptsache (s. Tab. u. Text) erwachsene Weibchen ♀). Die Tiere wurden in Plastik Käfigen gehalten und mit Mäuse-Biskuits der Firma Latz, Euskirchen, gefüttert. Daneben wurde lediglich Wasser aus Trinkflaschen verabreicht. Sämtliche Versuchsmäuse waren gesund und lebenskräftig. Interkurrente Todesfälle waren nicht zu verzeichnen.

Mäusesera

Mäuseblut wurde durch Herzpunktion in tiefer Äthernarkose gewonnen. Nach dem Zentrifugieren der Einzelblutproben war das Serum meist mehr oder weniger stark hämoglobinhaltig. Erwachsene ♀ lieferten 0,5 bis 0,7 ml Serum, säugende Muttertiere oft bis zur doppelten Menge. Die Serumproben wurden 30 Minuten bei 58° C erhitzt und durch Tieffrieren bei - 25° C konserviert.

Typspezifische Meerschweinchensera

Die Serumpender wurden mit den Virusstämmen O₁ (Kaufbeuren), A₅ (Westerwald) und C (Riems) immunisiert. Einen Monat nach plantarer, fast stets generalisierender Erstinfektion mit Virus der 1.—3. Meerschweinchen (Mee.)-Passage wurden die Tiere mit einem Virusgemisch von der 1.—3. Passage hyperimmunisiert. Sie erhielten 1 ml eines 10 %igen Aphthendeckenextraktes subkutan in jede Planta. Eine Woche später wurden sie durch Herzpunktion entblutet. Sämtliche Einzelsera erwiesen sich als typenrein. Sera gleichen oder ähnlichen Titers wurden gemischt.

Antigene

Da es hier nicht gelang, nach der früher beschriebenen Methode (2) ebenso wirksame BHK-Antigene wie in Persien (4) herzustellen, wurde die Kulturflüssigkeit von infizierten BHK-21-Kulturen in Roux-Kolben durch Vakuumverdampfung auf etwa $\frac{1}{8}$ des ursprünglichen Volumens eingengt. Benutzt wurde ein Rotationsverdampfer (Rotavapor „R“) der Firma Büchi, Glasapparatefabrik, Flawil, Schweiz. Zuvor wurde die Kulturflüssigkeit 30 Minuten bei 60° C unter magnetischem Rühren erhitzt, um die Infektiosität der Antigene zu beseitigen. Die eingengte Kulturflüssigkeit dialysierten wir unter magnetischen Rühren 48 Stunden bei + 2° C gegen physiologische NaCl-Lösung. Diese wurde nach 24 Stunden gewechselt. Bei der Dialyse trat eine Vermehrung des Volumens um etwa 20 % ein. Die Dialysate enthielten nur noch Spuren von Phenolrot. Sie wurden in Röhrchen abgefüllt und bei - 25° C tiefgefroren. Dieses Verfahren führte bei allen 3 Virustypen (O, A u. C) zum Ziel. Es war mit einem 25 bis 50 %igen Antigenverlust verbunden.

Titrierung typspezifischer Meeseren im direkten KB-Test

Zwecks Ermittlung der Gebrauchsdosis der komplementbindenden Meeseren, die 30 Minuten bei 56° C erhitzt wurden, titrierten wir diese im Schachbrett-Test gegen konzentrierte BHK-Antigene (im folgenden kurz als Antigene bezeichnet) der entsprechenden Typen.

Die Komplementbindung (KB) wurde mit geringen Abänderungen (6) nach der Methode von TRAUB und MÖHLMANN (5) ausgeführt. Als Beispiel ist das Ergebnis einer solchen Titration in Tabelle 1 wiedergegeben. Bei der C'-Auswertung in Gegenwart von unverdünnten Antigen und Mee. Normalserum 1 : 10 hatte 2 %iges C' noch vollständige Hämolyse erzeugt; benutzt wurde 3 %iges C' (= 1.5 Einheiten).

Tabelle 1

Ermittlung der Gebrauchsdosis von komplementbindenden Meerschweinchenserum im Schachbrett-Test

Virustyp	Serumverdünnung	Antigenverdünnung					Gebrauchsverdünnung des Serums
		u.	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	
O	1 : 10	100	100*	100	94	75	1 : 20
	1 : 20	100	100	100	100	75	
	1 : 40	75	100	100	94	25	
	1 : 80	0	6	75	62	6	
	1 : 160	0	0	0	0	0	
A	1 : 10	100	100	100	75	0	1 : 20
	1 : 20	100	100	100	37	0	
	1 : 40	62	100	100	12	0	
	1 : 80	12	37	37	0	0	
	1 : 160	6	6	6	0	0	
C	1 : 10	100	100	100	94	6	1 : 20
	1 : 20	100	100	100	87	6	
	1 : 40	94	100	100	12	0	
	1 : 80	12	87	87	6	0	
	1 : 160	0	0	6	0	0	

* Prozentsatz der ungelösten Hammelblutkörperchen.

Aus Tabelle 1 ist ersichtlich, daß Sera der drei verschiedenen Typen nahezu identische Ergebnisse lieferten. Sie ergaben in der Verdünnung 1 : 40 keine vollständige KB mit unverdünntem Antigen, wohl aber mit den Antigenverdünnungen 1 : 2 und 1 : 4 (Reaktionsoptimum), während die Serumverdünnungen 1 : 20 und 1 : 10 auch mit unverdünntem Antigen voll reagierten. In IKB-Testen wurden diese Sera in der Verdünnung 1 : 20 verwendet.

Bestimmung der Gebrauchsverdünnung des Antigens im IKB-Test

Zu diesem Zweck wurde bekannt positives (Typ 0) bzw. normales Mäuseserum unverdünnt und in Verdünnungen 1 : 2 bis 1 : 64 zu gleichen Teilen (je 0,0625 ml) mit unverdünntem Antigen bzw. Antigenverdünnungen 1 : 2 bis 1 : 8 gemischt. Die benutzten 0.1 ml-Pipetten wurden nach jeder Verdünnung mit gepufferter NaCl-Lösung sorgfältig ausgewaschen. Für jedes Serum wurde eine frische Pipette verwendet. Die Versuchsanordnung ist aus der Tabelle 2 zu ersehen. Die Antigenkontrollen (AK) 1 und 2 stellen Duplikate der entsprechenden Röhren in Spalten 2—4 der Tabelle dar. Die AK 1, in denen im darauffolgenden KB-Test das Mee.serum durch gepufferte Kochsalzlösung ersetzt wird, wurden für den Fall eingeschaltet, daß die Gemische von Antigen und Mäuseserum antikomplementäre Wirkung zeigen würden. Eine solche wird besonders bei Gemischen mit Mäuse-Immunsrum nicht sel-

ten beobachtet. Die AK 2, in denen im KB-Test das Mee.serum und das C' durch NaCl-Lösung ersetzt werden, sind wichtig für den Farbvergleich mit den Röhrchen der Spalten 3—6 bei der Ablesung der Ergebnisse nach Sedimentierung der Zellen. Dies trifft besonders für Tests von stark hämolytischen Mäuseseren zu. Die Gemische von Mäuseserum und Antigen wurden vor der Prüfung im KB-Test 60 Minuten bei 37° C im Wasserbad erwärmt.

Im KB-Test sollte festgestellt werden, wieviel Antigen vom Mäuse-Immunserum neutralisiert worden ist. Das Verfahren war dasselbe wie im anschließend zu beschreibenden Hauptversuch.

Tabelle 2
Ermittlung der Gebrauchsverdünnung des Antigens (Virustyp 0)
im Schachbrett-Test mit Mäuseseren

Mäuse-Serum	Serum-verdünnung	Mit Mee. serum Typ 0 u. Komplement				Ohne Mee. serum, mit Komplement (A. K. 1)				Ohne Mee. serum und ohne Komplement (A. K. 2) u.
		Antigenverdünnung u. 1 : 2 1 : 4 1 : 8				u. 1 : 2 1 : 4 1 : 8				
immun Typ 0	u.	75*	0	0	0	0	0	0	0	100
	1 : 2	94	0	0	0	0	0	0		100
	1 : 4	100	0	0	0	0	0			100
	1 : 8	100	0	0	0	0				100
	1 : 16	100	75	0	0					100
	1 : 32	100	94	0	0					100
	1 : 64	100	100	25	0					
normal	u.	100	100	50	0	0	0	0	0	100
	1 : 2	100	100	50	0	0	0	0		100
	1 : 4	100	100	50	0	0	0			100
	1 : 8	100	100	75	0	0				100
	1 : 16	100	100	75	0					100
	1 : 32	100	100	62	0					100
	1 : 64	100	100	62	0					

* Prozentsatz der ungelösten Hammelblutkörperchen („Hemmwert“).

Wie die Tabelle 2 zeigt, neutralisierte das Mäuse-Immunserum unverdünnt und auch in den Verdünnungen 1 : 2 bis 1 : 8 die Antigenverdünnung 1 : 2 vollständig, während unverdünntes Antigen nur vom unverdünnten Serum und der Serumverdünnung 1 : 2 schwach angegriffen wurde. Auf Grund dieses Ergebnisses benutzten wir das 0-Antigen im Hauptversuch in einer Verdünnung von 1 : 2.

Hauptversuch

Dieser bestand aus dem Spezifitätstest und der Serumtitration. Die bei Rinderseren praktizierte Titration des nicht neutralisierten Antigens (2) wurde ausgelassen, da die von Einzelmäusen gewonnenen Serummengen oft nicht ausgereicht hätten. Die Versuchsanordnung ist aus Tabelle 3 ersichtlich, die als Beispiel auch Detailergebnisse eines IKB-Testes mit 9 Mäuse-Immunseren des Typs A wiedergibt. Die Sera stammten von einmal vaccinierten und 32 bis 54 Tage später entbluteten Einzelmäusen. Ausgewählt wurden Sera verschiedener Stärke, darunter auch ein auf die anderen Virustypen stark übergreifendes Serum (i—7) und zwei antikomplementäre Sera (i—8 und i—9). In den beiden letzten Fällen wurden auch bei der Serumtitration AK 1 eingeschaltet (s. Tab. 3).

C' wurde in Gegenwart eines Gemisches von A-Antigen und Mäuse-Normalserum (dieses Gemisch wurde zuvor 60 Min. bei 37° C erwärmt) und Mee.-Normalserum 1 : 20 titriert. Im vorliegenden Fall erzeugte 3 %iges C'

Tabelle 3

Hauptversuch

		Spezifitätstest				
Neutralisation:	1	2	3	4	5	
	0,0625 unverdünntes Mäuseserum + 0,0625 Antigen					
	0	A	C	AK 1 A	AK 2 A	
60 Min. bei 37°C						
K. B. Test:	Mee - Serum 1 : 20 (je 0,125)					
	0	A	C	-	-	
	C' (1,5 Einheiten)					
	0,125	0,125	0,125	0,125		
30 Min. bei 37°C						
Serum - Spender	Hämolyt. System					
	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	
	30 Min. bei 37°C					
i* - 1	100*	0	87	0	100	
i - 2	100	0	100	0	100	
i - 3	100	0	100	0	100	
i - 4	100	37	100	0	100	
i - 5	100	50	100	0	100	
i - 6	100	75	100	0	100	
i - 7	12	0	12	0	100	
i - 8	100	6	50	50	100	
					AK 1:	
i - 9	100	37	75	87	100	
					AK 1:	
n*	100	100	100	0	100	
NaCl**	100	100	100	0	100	

* i = immune Maus; n = normale Maus.

** NaCl = veronalgepufferte Kochsalzlösung statt Mäuseserum.

+ die Zahlen in den Spalten 2—11 geben die geschätzten Prozentsätze der ungelösten Hammelerythrozyten (Hemmwerte) in den betreffenden Röhrchen an.

eben noch vollständige Hämolyse; benutzt wurde 4,5 %iges C' (= 1,5 Einheiten).

Die endgültige Ablesung der Ergebnisse des Hauptversuches erfolgte jeweils am nächsten Morgen, nachdem die Röhrchen über Nacht im Kühlschrank gestanden und die Zellen sich abgesetzt hatten. Da Mäusesera, wie erwähnt, häufig stark hämoglobinhaltig sind, wäre es zur Erhöhung der Ablesegenauigkeit ratsam, AK 2 auch bei der Serumtitration einzuschalten. Hierauf mußte jedoch wegen der geringen Serummengen verzichtet werden.

Bei der Ablesung der Ergebnisse wurden die Prozentsätze der ungelösten Erythrocyten („Hemmwerte“ [HW]) in den einzelnen Röhrchen visuell abgeschätzt. Die Reaktionen wurden mit - bis 4 + bewertet, wobei - einem Hemmwert von 0 % (= vollständige Hämolyse) und 4 + einem solchen von 100 % (= keine Hämolyse) entspricht. Zwischenstufen waren: 1/4 + (6 %); 1/2 + (12 %); 1 + (25 %); 1 1/2 + (37 %); 2 + (50 %); 2 1/2 + (62 %); 3 + (75 %); 3 1/2 + (87 %); 3 3/4 + (94 %).

Die Bestimmung der 50 %-Serumtiter, d. h. derjenigen Mäuseserum-Verdünnungen, die theoretisch einen Hemmwert von 50 % ergeben hätten, erfolgte mit Hilfe eines Koordinatensystems auf gewöhnlichen Millimeterpapier, in dem auf der Ordinate die Serumverdünnungsstufen und auf der Ab-

Tabelle 3

Serumtitration					Titerwerte	
6	7	8	9	10		
0,0625 Antigen A + 0,0625 Mäuseserum - Verdünnung						
1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32		
60 Min. bei 37°C						
Mee. Serum A 1 : 20					50 % Serumtiter	Mittlere Hemmwerte (MHW) u - 1 : 32 %
0,125	0,125	0,125	0,125	0,125		
C' (1,5 Einheiten)						
0,125	0,125	0,125	0,125	0,125		
30 Min. bei 37°C						
Hämolyt. System						
0,25	0,25	0,25	0,25	0,25		
30 Min. bei 37°C						
0	0	0	6	94	1 : 24	17
6	25	62	100	100	1 : 6,5	49
0	75	100	100	100	1 : 3,5	62
75	87	100	100	100	1 : 1,3	83
100	100	100	100	100	1 : 1	92
100	100	100	100	100	>1 : 1	96
0	37	62	100	100	1 : 6	50
6	50	94	100	100	~1 : 5	~39
37	25	6	0	0		
6	6	62	100	100	~1 : 7	~28
50	6	0	0	0		
100	100	100	100	100	>1 : 1	100

szisse die Hemmwertstufen vermerkt waren. In dieses System wurden die Werte für diejenigen beiden Serumverdünnungen eingetragen, zwischen denen der 50 %-Wert liegen mußte. Die beiden markierten Punkte wurden durch eine Gerade verbunden. Ihr Schnittpunkt mit einer Vertikalen über der 50 %-Marke auf der Abszisse ergab den gesuchten Wert (s. Spalte 12 in Tab. 3).

Außerdem wurde aus den für unverdünntes Mäuseserum und die Serumverdünnungen 1 : 2 bis 1 : 32 notierten HW der mittlere Hemmwert (MHW) errechnet (s. Spalte 13). Mit dem MHW läßt sich rechnerisch leichter operieren als mit dem 50 % Serumtiter. Er ist zudem genauer, da er sich auf 6 Ablesungen gründet, und ist umso kleiner, je mehr Antikörper das Serum enthält.

Bei antikomplementären Gemischen von Mäuse-Immunsereum und Antigen wurde der Mittelwert für die AK 1 vom Mittelwert für die Röhren mit Mee.serum subtrahiert. Die Differenzwerte erheben wegen der oft feststellbaren prokomplementären Wirkung von inaktivierten Mee.serum keinen Anspruch auf absolute Genauigkeit.

Versuche und Ergebnisse

Untersuchung von Mäuse-Normalseren auf störende Hemmfaktoren

Zunächst prüften wir eine Reihe von normalen Einzelseren von ♂ und ♀ auf unspezifische „Inhibitoren“ (3). Die große Mehrzahl der Serumpender waren erwachsene Mäuse. 17 Sera (von 11 ♂ und 6 ♀) wurden unverdünnt gegen die Antigene O,A und C in der IKB getestet, 21 Sera (von 8 ♂ und 13 ♀) in der Verdünnung 1 : 2 und 26 Sera von ♀ in der Verdünnung 1 : 4. Außerdem wurden mehrere Serumgemische von normalen Mäusen, die als Kontroll-

seren in IKB-Testen dienen, unverdünnt oder in der Verdünnung 1 : 2 geprüft. „Inhibitoren“ der bei Rindern vorkommenden Art wurden in sämtlichen Testen nicht nachgewiesen.

Jedoch wurde festgestellt, daß Sera von normalen ♂ wesentlich häufiger schwach antikomplementär sind als Seren von normalen ♀. Aus diesem Grunde und wegen des lästigen Beissens der ♂ arbeiteten wir später nur noch mit ♀.

Nachweis von IKB-Antikörpern nach Vaccinierung bzw. Infektion mit Rindervirus

In einem Tastversuch wurden 2 Gruppen von 5—6 Wochen alten ♀ einmal bzw. zweimal in 4wöchigem Zeitabstand mit fallenden Dosen einer monovalenten O-Vaccine geimpft und am 14. Tag nach einmaliger Impfung bzw. 12. Tag nach der zweiten Impfung entblutet. Kleinere Mäusegruppen wurden mit Rindervirus infiziert und 14 bzw. 40 Tage später entblutet. Die Einzelsera wurden in der Verdünnung 1 : 4 durch IKB getestet. Als Kontrollen dienten Einzelsera von 26 normalen ♀.

Die in Tabelle 4 verzeichneten Ergebnisse lassen erkennen, daß die am 14. Tag nach einmaliger Impfung gewonnenen Sera zumeist negativ oder nur schwach positiv reagierten. Besser waren die Resultate nach zweimaliger Impfung. Von einer einzigen Maus abgesehen, ließen auch infizierte Mäuse eine kräftige Antikörperbildung vermissen. Sämtliche positiv reagierenden Sera

Tabelle 4

Hemmwerte von Seren erwachsener ♀ nach ein- oder zweimaliger Impfung mit O-Vaccine bzw. intraperitonealer Infektion mit Rindervirus Typ 0

Mäusegruppe	Art der Immunisierung, Zeit der Serumgewinnung und Zahl der antikomplementären Seren	Vaccineverdünnung	Zahl der Mäuse	HW u. MHW (Serumverdünnung 1 : 4) %
1	Einmalige subkutane Impfung mit unverdünnter Vaccine bzw. steigenden Vaccineverdünnungen (je 1 ml); Serumgewinnung 14 Tage später. Kein Serum antikomplementär	2 ⁰	3	37; 100; 75 Mittel: 71
		2 ⁻¹	3	94; 100; 100 Mittel: 98
		2 ⁻²	3	50; 75; 100 Mittel: 75
		2 ⁻³	3	100; 100; 100 Mittel: 100
		2 ⁻⁴	3	100; 100; 87 Mittel: 96
2	Zweimalige subkutane Impfung mit unverdünnter Vaccine bzw. steigenden Vaccineverdünnungen (je 1 ml) im Zeitabstand von 28 Tagen; Serumgewinnung 12 Tage nach der zweiten Impfung. 6 Sera schwach bis mäßig antikomplementär	2 ⁰	3	0; 12; 12 Mittel: 8
		2 ⁻¹	3	0; 12; 75 Mittel: 29
		2 ⁻²	3	25; 37; 50 Mittel: 37
		2 ⁻³	3	0; 6; 37 Mittel: 14
		2 ⁻⁴	3	25; 25; 37 Mittel: 29
3	Rindervirus intraperitoneal (0,2 ml 10% Aphthendeckenextrakt); Serumgewinnung 14 Tage später. Kein Serum antikomplementär.		5	87; 87; 87; 87; 100 Mittel: 90
4	dto., Serumgewinnung 40 Tage später. 1 Serum sehr schwach antikomplementär		6	12; 62; 87; 87; 100; 100 Mittel: 75
5	Nicht vorbehandelte Kontrollen 1 Serum sehr schwach antikomplementär		26	alle 100

waren typenrein. Die Normalsera reagierten ausnahmslos negativ mit Antigenen aller 3 Virustypen.

Während die am 14. Tag nach einmaliger Impfung gewonnenen Sera ohne Ausnahme nicht antikomplementär wirkten, waren nach zweimaliger Impfung 6 von 15 Serum-Antigen-Gemischen schwach bis mäßig antikomplementär.

Antikörper bei ♀ verschiedenen Alters 2 bzw. 5 Wochen nach einmaliger Impfung mit 0,5 ml unverdünnter O-Vaccine

Nach dem etwas enttäuschenden Ergebnis des soeben geschilderten Versuchs wurde der Einfluß des Alters zur Zeit der Vaccinierung und der Zeitspanne zwischen Impfung und Serumgewinnung experimentell untersucht.

Zur Zeit der Impfung waren die jüngeren Tiere 3—4, die älteren 8—10 Wochen alt. Die Hälfte der Tiere jeder Gruppe wurde am 14. Tag, die andere Hälfte am 35. Tag p. v. entblutet. Die Sera wurden mit O-, A- und C-Antigen in der IKB getestet und unverdünnt sowie in den Verdünnungen 1 : 12 bis 1 : 32 gegen O-Antigen titriert. Das Ergebnis (s. Tab. 5) läßt erkennen, daß die mittleren Antikörpertiter am 35. Tag signifikant höher lagen als am 14. Tag. Die älteren Mäuse bildeten rascher Antikörper als die jungen, doch erreichten die Sera der letzteren schließlich ebenso hohe oder gar etwas höhere Titerwerte. Sie hatten ja auch mehr Vaccine pro Körpergewichtseinheit erhalten als die älteren Tiere.

Tabelle 5

Antikörperbildung bei jungen und erwachsenen Mäusen nach einmaliger Impfung mit O-Vaccine

Serumspender			50 % - Serumtiter		MHW u - 1 : 32 (%)	
Alter (Wochen)	Entblutung (Tage p. v.)	Maus Nr.	Einzelwerte	Mittelwerte	Einzelwerte	Mittelwerte
3 - 4	14	1	1 : 1,5	>1 : 1	77	90
		2	>1 : 1		95	
		3	>1 : 1		97	
		4	1 : 1		86	
		5	>1 : 1		100	
		6	1 : 1		86	
8 - 10	14	7	1 : 1,2	1 : 2,2	83	71
		8	1 : 3		63	
		9	1 : 2		72	
		10	1 : 2		72	
		11	1 : 3		66	
		12	1 : 3		69	
3 - 4	35	13	1 : 1,7	1 : 9,5	78	41
		14	1 : 10		40	
		15	1 : 9		46	
		16	1 : 12		35	
		17	1 : 19		28	
		18	1 : 22		21	
8 - 10	35	19	1 : 14	1 : 6,8	29	47
		20	1 : 8		48	
		21	1 : 4		58	
		22	1 : 2		73	
		23	1 : 22		23	
		24	1 : 5		53	

Tabelle 6
Antikörperbildung bei erwachsenen ♀ nach einmaliger Impfung
mit fallenden Dosen A-Vaccine

Vaccine- verdünnung	Maus Nr.	50 %- Serumtiter	MHW u - 1 : 32 %	Vaccine - verdünnung	Maus Nr.	50 %- Serumtiter	MHW u - 1 : 32 %
2 ⁰	1	1 : 1	92	2 ⁻⁵	42	1 : 1	84
	3	1 : 5	56		45	1 : 1	92
	7	1 : 12	33		48	1 : 1.5	81
	8	1 : 24	17		49	>1 : 1	96
2 ⁻¹	9	1 : 5	55	2 ⁻⁶	52	>1 : 1	98
	11	1 : 7	46		54	1 : 0.7	90
	14	1 : 5	55		56	1 : 3	75
	15	1 : 3.5	62		58	1 : 1	86
2 ⁻²	17*	1 : 3	61	2 ⁻⁷	60	>1 : 1	98
	20*	1 : 11	31		61	>1 : 1	94
	21	1 : 7	49		62	>1 : 1	98
	23*	1 : 11	33		67	1 : 1.5	84
2 ⁻³	27*	1 : 6	39	2 ⁻⁸	70	>1 : 1	100
	28*	1 : 8	28		71	>1 : 1	98
	29	1 : 0.7	92		72	1 : 2	89
	32	1 : 1	83		-	NS*	>1 : 1
2 ⁻⁴	34	>1 : 1	98				
	36	1 : 3	68				
	38	>1 : 1	93				
	40	1 : 8	45				

* Normalserum.

+ Mehr oder weniger stark antikomplementäre Serum-Antigengemische.

Beziehung zwischen Vaccinedosis und Antikörpertiter

In einem weiteren Versuch wurden erwachsene ♀ einmal mit unverdünnter A-Vaccine bzw. den Vaccineverdünnungen 1 : 2 bis 1 : 256 (2⁰—2⁻⁸, 4 Tiere je Dosis) geimpft und 25 bis 54 (im Mittel 38) Tage nach der Impfung entblutet. Diese Mäusegruppen waren Teil eines anderen Versuchs, daher sind die Entblutungszeiten nicht gleich.

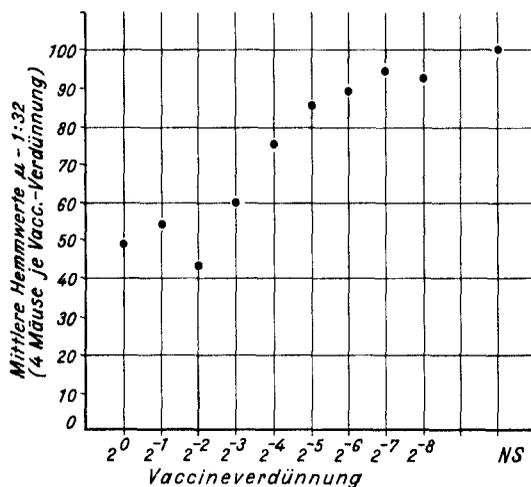


Abb. 1. Dosis-Wirkungs-Kurve (A-Vaccine)

Die mit Einzelseren erzielten IKB-Ergebnisse sind in Tabelle 6 angegeben, die zeigt, daß die Titerwerte bei Mäusen, welche dieselben Vaccinedosen erhalten hatten, stark variierten. Dennoch war es möglich, unter Verwendung der für die verschiedenen Vaccinedosen errechneten MHW eine Dosis-Wirkungs-Kurve (s. Abb. 1) zu konstruieren.

Diskussion

Die Versuche haben gezeigt, daß auch Mäuse nach Impfung mit MKS-Handelsvaccine Antikörper bilden, die sich im IKB-Test nachweisen lassen. Da von Einzelmäusen nur kleine Serummengen gewonnen werden können, mußte das für Rinderseren benutzte Verfahren (2) entsprechend abgeändert werden. Wegen der starken Variation der Titerwerte bei Einzeltieren, die in der gleichen Weise immunisiert worden sind, erscheint es ratsam, künftig für jede Vaccineverdünnung wenigstens 8 Mäuse zu verwenden. Die Serumgewinnung sollte frühestens 4—5 Wochen nach der Impfung erfolgen.

Die in Abbildung 1 wiedergegebene Dosis-Wirkungs-Kurve ähnelt einer Normalverteilungskurve. Ähnliche Kurven lieferten die Sera von Mäusen, die mit anderen Vaccinen immunisiert worden waren. Es überrascht, daß selbst die Vaccineverdünnung 2^{-8} (1 : 256) noch in der Lage war, schwache Antikörperbildung bei 2 von 4 Tieren auszulösen (s. Tab. 6).

Die Frage, ob die Bildung von IKB-Antikörpern bei vaccinierten Mäusen der Bildung von neutralisierenden Antikörpern bei vaccinierten Rindern parallel läuft, kann nur durch Simultanversuche an Mäusen und empfänglichen Rindern beantwortet werden.

Der relativ schwache Neutralisationseffekt von Mäuse-Immunsereen gegenüber konzentriertem BHK-Antigen (s. Tab. 2) ist vielleicht damit zu erklären, daß letzteres vorwiegend lösliches Antigen enthält. Beim Zerfall der Proteinhülle des MKS-Virus in kleinere Einheiten kommt es zu einer starken Vergrößerung der reaktiven Oberfläche. Dadurch dürften wesentlich mehr Antikörpermoleküle benötigt werden als zur Neutralisation von kompletten Viruspartikeln. Außerdem besteht die Möglichkeit, daß zur Unterdrückung der Infektiosität eine geringere Antikörpermenge erforderlich ist als zur Beseitigung der serologischen Reaktionsfähigkeit.

Nach bisherigen Erfahrungen scheinen unspezifische „Inhibitoren“, die MKS-Antigen neutralisieren (3), bei Mäusen nicht vorzukommen, wenigstens nicht bei Tieren der hiesigen Zucht. Daher scheinen sich Mäuseseren für quantitative IKB-Teste besser zu eignen als Rindersera. Sollten weitere Untersuchungen dies bestätigen, so könnten in Mäuseversuchen vielleicht gewisse Probleme gelöst werden, deren Bearbeitung am Großtier technisch sehr schwierig oder unmöglich ist.

Die antikomplementäre Wirkung mancher Gemische von Mäuse-Immunsereum und Antigen beruht möglicherweise darauf, daß in diesen Fällen bei der Reaktion zwischen Mäusesereum und Antigen Komplement verbraucht wird, und daß die Restmenge dann nicht mehr ausreicht, um vollständige Hämolyse zu erzeugen in Röhrchen, in denen diese eintreten sollte.

Weitere Untersuchungen haben die oben geäußerte Vermutung bestätigt, daß bei der Reaktion zwischen Mäuseimmunsereum und Antigen C' verbraucht wird und daß hierauf die als „antikomplementär“ bezeichnete Wirkung solcher Gemische beruht. C'-Verbrauch wurde nur bei Gemischen von Mäuseimmunsereum und Antigen gleichen Typs festgestellt, nicht aber bei der schwächeren Kreuzreaktion mit anderen Virustypen.

Der störende Effekt konnte durch Zusatz kleiner Mengen von aktivem Meerschweinenserum zu den Gemischen von Mäusesereum und Antigen, die wir nunmehr über Nacht im Kühlschrank halten, und nachfolgende Inaktivierung des nicht gebundenen C' (56° C, 30 Min.) beseitigt werden. Dies gelang auch durch Verwendung großer C'-Dosen, doch ist hierfür C' von hoher Bindungsfähigkeit erforderlich, da bei der IKB mit Mäuseseren nur mit

kleinen Antigenmengen gearbeitet werden kann. Die Bindungsfähigkeit variiert bei Komplementen von verschiedenen Meerschweinchen erheblich. Sie geht dem Hämolysevermögen nicht parallel. Versuche mit aktiven Mäuseseren, deren eigenes C' nicht inaktiviert worden ist, sind noch nicht abgeschlossen. Außerdem wird noch die Möglichkeit geprüft, die Stärke von Mäuseimmunsereen durch Messung des C'-Verbrauchs bei der Reaktion mit typspezifischem Antigen zu bestimmen.

Statt durch Vakuumverdampfung werden Zellkulturantigene jetzt auf einfachere Weise durch Methanolfällung bei -25°C konzentriert. Der durchschnittliche Antigenverlust beträgt bei diesem Verfahren ebenfalls rund 50 %. Durch Methanolfällung konnten gute Antigenkonzentrate auch von infizierten Primärkulturen von Kälbernierenzellen gewonnen werden. Diese eignen sich für die Prüfung von Immunsereen von Tieren, die mit BHK-Vaccine behandelt worden sind. Statt Methanol kann auch das weniger giftige Äthanol zur Fällung von KB-Antigen benutzt werden.

Zusammenfassung

Mit Hilfe der indirekten Komplementbindung (IKB) gelang es, bei Mäusen nach Impfung mit MKS-Handelsvaccinen spezifische Antikörper nachzuweisen. Eine für kleine Serummengen geeignete Methode wird beschrieben.

Unspezifische „Inhibitoren“, welche die Reaktion bei Verwendung von Rinderseren bisweilen stören, wurden in Mäuse-Normalseren bislang nicht festgestellt.

Zur Entwicklung maximaler Antikörpertiter benötigten vaccinierte Mäuse eine Zeitspanne von mehr als 2 Wochen. Erwachsene Mäuse bildeten Antikörper rascher als Jungmäuse. Seren von weiblichen Mäusen waren für IKB-Teste geeigneter als Sera von Männchen, da letztere häufiger schwach antikomplementär wirkten. Die Antikörpertiter variierten erheblich bei Einzelmäusen, die in der gleichen Weise immunisiert wurden.

Bei quantitativer Vaccineprüfung glich die S-förmige Dosis-Wirkungskurve auf gewöhnlichem Millimeterpapier einer Normalverteilungskurve.

Summary

Indirect complement fixation with mouse sera after inoculation with monovalent foot-and-mouth vaccine

Using an indirect complement-fixation (ICF) test, it was possible to demonstrate specific antibodies in the sera of mice vaccinated with commercial foot-and-mouth disease vaccines. A method suitable for small amounts of serum is described.

Non-specific „inhibitors“, which sometimes disturb the reaction when cattle sera are used, have so far not been detected in normal mouse sera.

Vaccinated mice needed more than 2 weeks to develop maximum antibody titers. Adult mice formed antibody more rapidly than young mice. Sera from females were more suitable for ICF tests than sera from males, which more frequently were slightly anticomplementary. Antibody titers varied considerably in individual animals immunized in the same manner.

In a quantitative vaccine test, the S-shaped dose-response curve on ordinary graph paper resembled a normal-distribution curve.

Résumé

Fixation indirecte du complément à l'aide de sérums de souris après immunisation par des vaccins monovalents contre la fièvre aphteuse

Grâce à la fixation indirecte du complément (FIC), on parvient à mettre en évidence des anticorps spécifiques chez la souris après immunisation à l'aide de vaccins commerciaux contre la fièvre aphteuse. On décrit une méthode adéquate pour de petites quantités de sérum.

On n'a pas rencontré jusqu'ici dans les sérums normaux de souris des „inhibiteurs“ non spécifiques, qui gênent parfois la réaction lorsque l'on utilise les sérums bovins.

Il a fallu aux souris vaccinées plus de deux semaines pour atteindre le titre en anticorps maximum. Les souris adultes forment les anticorps plus rapidement que les jeunes souris. Les sérums de souris femelles se prêtent mieux aux tests de FIC que les sérums de souris mâles, car ces derniers donnent plus souvent une réaction anticomplémentaire faible. Les titres des anticorps varient considérablement entre les souris immunisées de la même façon.

Lors d'une détermination quantitative du vaccin, la courbe dose-action en forme de S sur papier millimétré ordinaire s'apparente à une courbe de répartition normale.

Resumen

Fijación indirecta del complemento con sueros sanguíneos de ratón tras la aplicación de vacuna antiaftosa monovalente

Con ayuda de la fijación indirecta del complemento (FIC), se logró identificar anticuerpos específicos en ratones inoculados con vacunas antiaftosas comerciales. Se describe una técnica apropiada para cantidades pequeñas de suero sanguíneo.

„Inhibidores“ inespecíficos, que perturban a veces la reacción al utilizar sueros sanguíneos bovinos, no se hallaron hasta ahora en los sueros normales de ratón.

Para desarrollar los títulos máximos de anticuerpos precisaban los ratones vacunados un periodo de tiempo superior a 2 semanas. Los ratones adultos formaban anticuerpos con velocidad mayor que los ratones jóvenes. Los sueros sanguíneos de ratonas resultaban más apropiados para las pruebas FIC que los sueros sanguíneos de los machos, ya que estos últimos actuaban con frecuencia mayor de forma ligeramente anticomplementaria. Los títulos de anticuerpos variaban de modo considerable en ratones individuales, que habían sido inmunizados de forma semejante.

En la contrastación cuantitativa de la vacuna se asemejó la curva dosis-acción, de forma de S, en papel milimetrado corriente, a la curva de distribución normal.

Literaturverzeichnis

1. BECHMANN, G.: Vergleich der Ergebnisse des Mutter-Babymaus-Testes und der indirekten Komplementbindung nach Impfung der Muttermäuse mit monovalenten Maul- und Klauenseuche-Vaccinen der Typen O, A und C. Zbl. Vet. Med. B (im Druck). • 2. TRAUB, E., M. HESSAMI and A. SHAFYI, 1968: Indirect complement fixation in foot-and-mouth disease, I. Study of antibody response in experimental cattle and sheep. Zbl. Vet. Med. B, 15, 421—432. • 3. TRAUB, E., M. HESSAMI and A. SHAFYI, 1968: Indirect complement fixation in foot-and-mouth disease. II. Screening of cattle serums. Zbl. Vet. Med. B,

15, 433—442. • 4. TRAUB, E., G. K. KANHAI and F. KESTING, 1968: Behavior of foot-and-mouth disease virus on serial passage in different kinds of cells. A contribution to experimental epidemiology at cell level. Zbl. Vet. Med. B, 15, 525—539. • 5. TRAUB, E., and H. MÖHLMANN, 1943: Typbestimmung bei Maul- und Klauenseuche mit Hilfe der Komplementbindungsprobe. II. Versuche mit Meerschweinchenserum und Rinderantigen. Zbl. Bakt. I. Orig. 150, 300—310. • 6. TRAUB, E., A. SHAFYI, F. KESTING and B. EWALDSSON, 1966: Serological variation of foot-and-mouth disease virus in Iran (1963—1966). Bull. Off. Intern. Epiz. 65, 2035—2050.

Anschrift des Verfassers: Prof. Dr. Erich Traub, Institut für Mikrobiologie und Infektionskrankheiten der Tiere, 8 München 22, Veterinärstraße 13.