

*Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin*

Prof. Dr. Dr. h. c. A. Mayr

*und dem Institut für Tierpathologie,
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie*

Prof. Dr. J. von Sandersleben

*Fachbereich Tiermedizin
Ludwig Maximilians-Universität München*

Versuche zur Entwicklung einer Immunprophylaxe gegen die Übertragbare Gastroenteritis (TGE) der Schweine

I. Pathogenität des Stammes Bl im Verlaufe von Serienpassagen*

Von

R. G. HESS, P. A. BACHMANN und T. HÄNICHEN

Mit 2 Abbildungen und 3 Tabellen

(Eingegangen am 15. Februar 1977)

Einleitung

Die übertragbare Gastroenteritis der neugeborenen Ferkel (TGE) ist nach wie vor ein Problem, das die Ferkelaufzuchtbetriebe weltweit schwer belastet. In der Bundesrepublik Deutschland sind bisher die norddeutschen Aufzucht- und Mastbetriebe in einem wesentlich stärkeren Ausmaß von der Erkrankung betroffen (26) als die süddeutschen. Da die höchste Mortalitätsrate während der ersten Lebenswoche der Ferkel auftritt — zu einem Zeitpunkt, da eine aktive Immunisierung noch nicht möglich ist — richtet sich das Hauptaugenmerk einer Immunprophylaxe zwangsläufig auf die passive Immunisierung über die Muttersau. Der Immunschutz wird durch die kontinuierliche Aufnahme von antikörperhaltigem Kolostrum und Milch gewährleistet. Die zur Übertragung dieses Immunschutzes notwendigen Antikörper der Immunglobulinklasse A (IgA) werden nach BOHL et al. (3; 6) nur nach intestinaler Infektion der Sau mit virulentem Virus in ausreichendem Maße gebildet. In zahlreichen Arbeiten (1; 4; 24) ist bisher gezeigt worden, daß nach parentaler Immunisierung mit einem inaktivierten bzw. attenuierten Virus keine oder

* Die Arbeit wurde mit Unterstützung des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten durchgeführt

eine ungenügende Stimulation der IgA-Antikörper im Gegensatz zu einer starken IgG-Synthese in der Milchdrüse der Sau erreicht wird.

Ein Lebendimpfstoff, der Aussichten auf eine Praxisanwendung haben soll, muß neben seiner immunogenen (IgA-stimulierenden) Wirksamkeit für die Muttersau eine weitgehende Reduzierung seiner Pathogenität für Neugeborene aufweisen und in dieser Eigenschaft stabil sein. Da das Virus nach Immunisierung von Muttersauen von diesen einige Tage lang (9) über den Darmtrakt ausgeschieden wird, ist sicherzustellen, daß dieses ausgeschiedene Impfvirus für neugeborene Ferkel allenfalls eine geringe Restvirulenz besitzt.

In der vorliegenden Arbeit wurde an Hand von klinischen und pathologisch-histologischen Untersuchungen sowie mittels der Immunofluoreszenz und der Antigentitrierung in Zellkulturen der von BACHMANN et al. (2) isolierte TGE-Virusstamm Bl auf seine Pathogenität für neugeborene Ferkel im Verlauf von Serienpassagen in Zellkulturen geprüft.

Material und Methoden

Virusstämme: Der im Institut isolierte TGE-Virusstamm Bl (2) wurde über 350 Serienpassagen in sekundären Schweineschilddrüsen (ST)-Zellkulturen attenuiert. Um die schrittweise Virulenzabschwächung zu demonstrieren sowie den Pathogenitätsendpunkt zu ermitteln, wurden die Passagen Bl-2. ST (2×10^4 PFU/ml), Bl-120. ST (2×10^6 PFU/ml), Bl-250. ST (8×10^6 PFU/ml), Bl-300. ST (4×10^6 PFU/ml) und Bl-350. ST (4×10^6 PFU/ml) zur Infektion von jeweils zwei Einzelferkeln und einem Wurf neugeborener Ferkel verwendet (in Klammern die jeweiligen Infektiositätstiters der Inokula als plaquebildende Einheiten pro ml). Biologische Eigenschaften des Stammes wurden von HESS und BACHMANN (14) beschrieben.

Zellkulturen: Zur Züchtung des Bl-Stammes in Serienpassagen sowie zur Bestimmung der Virusinfektiosität in den Dünndarmabschnitten dienten sekundäre Zellkulturen von Schweineschilddrüsen. Die Herstellung der Kulturen erfolgte mit geringfügigen Modifikationen nach der von WITTE und EASTERDAY (27) beschriebenen Methode.

Versuchstiere: Die neugeborenen Ferkel stammten aus konventionellen Zuchten der Deutschen Landrasse. Sie wurden im Alter von 1—2 Tagen von den Muttersauen, die keine neutralisierenden Antikörper gegen TGE-Virus aufwiesen, abgenommen und durch Flaschenfütterung mit der Ferkelaufzuchtmilch Biofix-F ernährt. Die Infizierung der Ferkel erfolgte am 2. Lebenstag mit einer oralen Gabe von 2 ml des jeweiligen Virusmaterials. Dem Kontrollferkel wurden 2 ml Zellkulturmedium inokuliert.

Auch die Muttersauen der Würfe, die mit den verschiedenen Viruspassagen infiziert wurden, waren frei von TGE-Virusantikörpern. Der Verlauf der klinischen Erkrankung wurde zweimal täglich kontrolliert. Bei überlebenden Ferkeln erfolgte am 10. Lebenstag eine Blutentnahme zur Antikörperbestimmung. Antikörper wurden mittels des Neutralisationstestes unter Verwendung der Mikrotitermethode bestimmt (25).

Probengewinnung und Virustitrierung: Sofort nach Auftreten der ersten Symptome einer typischen TGE-Virusinfektion wurden die isoliert gehaltenen einzeln infizierten Ferkel getötet. Beginnend vom Anfangsabschnitt des Duodenums wurden in gleichmäßigen Abständen von 25—35 cm von jedem Dünndarm 10 Proben entnommen. Je ein Drittel dieser Proben wurde für die pathologisch-histologische Untersuchung, für den Antigennachweis mit Hilfe der Immunofluoreszenz und für die Virustitration verwendet. Die Virustitrierung erfolgte nach Homogenisierung der Proben im Mörser und Zentrifugation der 10 %igen Suspension in PBS durch Verdünnung des Überstandes

in log 10-Stufen und Verimpfung von 0,2 ml der einzelnen Proben auf jeweils 4 ST-Zellkulturröhrchen. Nach 7tägiger Bebrütung bei 37 °C wurde der cytopathische Effekt der Kulturen abgelesen und die Infektiositätstiter nach der Methode von KÄRBER (16) errechnet.

Pathologisch-histologische Untersuchung: Nach Formolfixierung erfolgte die Einbettung des Materials routinemäßig in Paraplast. 4—6 µ dicke Schnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Einzelne Serien wurden in SCHAFFERscher Lösung fixiert und nach der von BURKHARDT (8) angegebenen Technik in Methacrylsäure-Methylester eingebettet. Die Färbung der etwa 3 µ dicken Schnitte erfolgte nach LADEWIG.

Um Unterschiede in der Pathogenität der einzelnen Viruspassagen des TGE-Virusstammes auch morphologisch zu erfassen, wurde das Schleimhautprofil von kranial nach kaudal in den von 1—10 durchnummerierten Dünndarmabschnitten im Hinblick auf das Vorhandensein und Ausmaß von Zottenatrophie und Epithelabflachung subjektiv beurteilt. Messungen wurden nicht vorgenommen. Die abschließende Beurteilung erfolgte an Hand von kodierten Proben in Unkenntnis der Ergebnisse der parallel durchgeführten Untersuchungen.

Immunofluoreszenz: Zur Herstellung eines Anti-TGE-Virus-Konjugates diente das Hyperimmunserum eines 4 Wochen alten SPF-Ferkels, welches mehrfach oral und intraperitoneal mit dem virulenten Bl-Stamm infiziert

Tabelle 1

Klinischer Verlauf der Infektion in Würfen neugeborener Ferkel mit dem TGE-Virusstamm Bl nach verschiedenen Zellkulturpassagen im Vergleich zum virulenten Feldstamm

Virus Passagezahl	Ferkel - Nr.	Klinische Erkrankung / Lebenstag									
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
Bl - 2	Nr. 13	-	-	+	±						
	14	-	-	+++	±						
Bl - 120	Nr. 15	-	-	++	++	+++	±				
	16	-	-	+	++	++	+++	++	+++	±	
	17	-	-	-	++	+++	+++	±			
	18	-	-	+	+	++	++	±			
	19	-	-	++	+++	+++	±				
	20	-	-	-	++	++	++	++	±		
Bl - 250	Nr. 85	-	-	-	++	++	+++	±			
	86	-	-	-	+++	+++	±				
	87	-	-	-	+	++	++	++	±		
	88	-	-	-	+++	+++	+	+	-	-	1:128
Bl - 300	Nr. 51	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	1: 8
	52	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	1: 16
	53	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	1: 4
	54	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	1: 64
Bl - 350	Nr. 76	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	77	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	79	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	81	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	82	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	83	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

+ bis +++: Geringradiger bis starker Durchfall.

I: Exitus.

- : ohne Befund.

worden war. Die Methode der Konjugatherstellung ist im Detail bei MAYR et al. (17) beschrieben. 40 ml des Hyperimmunserums, das einen neutralisierenden Antikörpertiter von 1 : 1024 aufwies, wurden zweimal mit gesättigtem Ammoniumsulfat gefällt, über DEAE-Zellulose-Säulen gereinigt und mit 2 mg FITC/100 mg Globulin (Baltimore Biological Labs., Cockeysville, Maryland, USA) konjugiert. Nichtgebundenes FITC wurde durch Gelfiltration über eine Sephadex G-25 Säule abgetrennt. Zur Eliminierung unspezifischer Fluoreszenzaktivitäten erfolgte eine zweimalige Adsorption des Konjugates an mehrfach gewaschenes Schweineleberpulver.

Die zur Immunfluoreszenz (IF)-Untersuchung bestimmten Dünndarmabschnitte wurden in Gelatinekapseln geeigneter Größe mit Tissue Tek II compound (Lab-Tek Products, Naperville, Ill., USA) eingebettet und bei -70°C eingefroren. Unmittelbar vor Anfertigung der Schnitte erfolgte die Entfernung der Gelatine kapsel. Von den etwa 5 mm breiten Blöcken wurden Gefrierschnitte von etwa $4-6\ \mu$ Dicke angefertigt. Nach 10minütiger Fixierung in -20°C kaltem Aceton und Trocknung lagerten die Schnitte bei -20°C . Die Spezifität der IF-Färbung wurde mit Dünndarmschnitten von nichtinfizierten Kontrollferkeln sowie TGE-Virus-infizierten und nichtinfizierten ST-Zellkulturen auf Deckgläsern abgesichert. Für die direkte Färbung

Tabelle 2

Inkubationszeiten und Virustiter in den einzelnen Darmabschnitten (\log_{10} KID₅₀/0.2 ml.) mit dem TGE-Virusstamm Bl nach oraler Infektion neugeborener Ferkel

Virus / Passagezahl	Inkubationszeit	Infektiositäts - titer	Virus / Passagezahl	Inkubationszeit	Infektiositäts - titer
Bl - 2	16 Std. (1. Versuch) 18 Std. (2. Versuch)	Nr. 1 : neg	Bl - 300	76 Std. (1. Versuch) 80 Std. (2. Versuch)	Nr. 1 : 1,5
		2 : 0,5			2 : 1,0
		3 : 0,5			3 : 3,0
		4 : 0,5			4 : 3,0
		5 : 1,0			5 : 4,0
		6 : 0,5			6 : 3,5
		7 : 0,5			7 : 2,5
		8 : 0,5			8 : 3,5
		9 : 0,5			9 : 3,5
		10 : 0,5			10 : 4,5
Bl - 120	30 Std. (1. Versuch) 34 Std. (2. Versuch)	Nr. 1 : 2,0	Bl - 350	ohne Symptome	Nr. 1 : neg
		2 : 2,5			2 : neg
		3 : 2,5			3 : neg
		4 : 3,5			4 : neg
		5 : 3,0			5 : 2,5
		6 : 4,5			6 : 3,0
		7 : 3,0			7 : 0,5
		8 : 2,5			8 : neg
		9 : 3,0			9 : neg
		10 : 2,5			10 : neg
Bl - 250	40 Std. (1. Versuch) 52 Std. (2. Versuch)	Nr. 1 : neg	Kontrolle nicht infiziert	ohne Symptome	Nr. 1-10 neg
		2 : 1,5			
		3 : 1,5			
		4 : 2,0			
		5 : 3,0			
		6 : 2,0			
		7 : 2,5			
		8 : 3,5			
		9 : 2,5			
		10 : 2,5			

wurde das Konjugat in entsprechender Verdünnung für 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei 37 °C auf die mit PBS befeuchteten Schnitte pipettiert. Das anschließende Waschen über dreimal 10 Minuten in PBS diente der Entfernung von überschüssigem, nichtgebundenem Konjugat.

Die gefärbten Präparate wurden mit einem Leitz-Laborlux-Mikroskop im Auflichtverfahren unter Verwendung der Filter BG-38, KP-540 und K-510 ausgewertet.

Ergebnisse

Die Kriterien, nach denen die verschiedenen Viruspassagen des Stammes Bl auf ihre pathogenen Eigenschaften für neugeborene Ferkel untersucht wurden, bestanden in der Dauer von Inkubationszeit und Erkrankung, dem Ort der Virusvermehrung im Dünndarm, der Höhe der Virustiter in den einzelnen Dünndarmabschnitten und in Art und Ausmaß der histologischen Veränderungen der Dünndarmschleimhaut.

Klinische Beobachtungen: Das erstmalige Auftreten eines Durchfalls, der in seiner Konsistenz bei den verschiedenen Viruspassagen Unterschiede aufwies, wurde als Beendigung der Inkubationszeit betrachtet. Erbrechen wurde lediglich bei den Ferkeln beobachtet, die mit dem hochvirulenten Bl-2-Virus infiziert waren. Die Inkubationszeit betrug für Bl-2 16—18 Stunden. Nach Infektion mit den höheren Zellkulturpassagen trat eine kontinuierliche Verlängerung der Inkubationszeit ein, die sich bis zu etwa 80 Stunden ausdehnte (Bl-300). Einzelheiten sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Nach Infektion mit Bl-2, Bl-120 und Bl-250 entwickelten die Ferkel einen hochgradigen, wässrigen, übelriechenden Durchfall, der mehrere Tage anhielt. Bei den mit Bl-300-Virus infizierten Ferkeln wies der Kot lediglich eine klebrige Konsistenz für die Dauer eines Tages auf. Bl-350 infizierte Ferkel zeigten keinerlei Symptome.

Ferkel, die mit dem hochvirulenten Bl-2-Virus infiziert waren, starben 1 bzw. 2 Tage p. inf. Auch nach Infektion mit Bl-120 überlebte keines der 6 infizierten Tiere; der Tod trat zwischen dem 4. und 7. Tag p. inf. ein. Von den mit Bl-250 infizierten Tieren überlebte ein Ferkel die Erkrankung, während die übrigen 3 Tiere zwischen dem 4. und 6. Tag nach der Infektion starben. Das Überleben aller infizierten Tiere (4 Ferkel) wurde erstmalig bei Bl-300-Virus beobachtet. Auch nach Infektion mit Bl-350-Virus starb keines der 7 infizierten Ferkel. Detaillierte Daten über den klinischen Verlauf der Infektion bei den einzelnen Würfen sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Virustiter der Dünndarmabschnitte: Das virulente Bl-2-Virus vermehrte sich im gesamten Dünndarm, mit Ausnahme des Duodenums, genauso wie Bl-120- und Bl-250-Virus. Die Virustiter in den einzelnen Abschnitten lagen zwischen 0,5 und 1,0 log 10 KID₅₀/0,2 ml. Das stärker an Zellkulturen adaptierte Bl-120-Virus wies dagegen Infektiositätstiter von 2,0 bis 4,5 log 10 KID₅₀/0,2 ml auf. Ähnliche Titerhöhen wurden auch bei den höheren Passagen Bl-250 und Bl-300 beobachtet. Bei dem Bl-350-Virus ließ sich nur im mittleren Abschnitt des Jejunums Virusinfektiosität nachweisen. Die höchsten Virustiter wurden in der Regel im mittleren Jejunumbereich festgestellt. Die Ergebnisse der Titration der einzelnen Dünndarmabschnitte enthält Tabelle 2.

Histopathologie und Immunofluoreszenz: Die Daten der Immunofluoreszenzuntersuchungen der einzelnen Darmabschnitte stimmen mit den Ergebnissen der Histopathologie überein (Tab. 3). Abschnitte mit stark ausgeprägter Zottenatrophie sind bei den mit Bl-2 und Bl-120 infizierten Ferkeln häufiger anzutreffen als bei den höher passierten Stämmen. Bl-350 stellt vermutlich den

Tabelle 3

Pathologisch-anatomische Veränderungen der Dünndarmschleimhaut und Antigenennachweis mittels Immunfluoreszenz nach Infektion neugeborener Ferkel mit dem attenuierten TGE-Virusstamm Bl nach verschiedenen Zellkulturpassagen im Vergleich zum virulenten Feldstamm

Virus / Passagezahl	Dünndarm- Abschnitt	Grad der Zottenatrophie		Immunfluoreszenz	
		1. Versuch	2. Versuch	1. Versuch	2. Versuch
Bl - 2	1	neg	++	+	+
	2	++	++	+	+
	3	+++	++	++	+
	4	+++	+++	+	++
	5	+++	+++	++	+++
	6	+++	+++	++	++
	7	+++	++	++	++
	8	++	++	+	++
	9	neg	+++	neg	+++
	10	neg	++	neg	++
Bl - 120	1	neg	neg	neg	+
	2	neg	+	+	++
	3	+	++	++	++
	4	+++	++	+++	+
	5	+++	+++	++	+++
	6	+++	++	++	++
	7	+++	+	++	++
	8	+++	++	+++	+
	9	+++	++	++	++
	10	+	+	+	++
Bl - 250	1	neg	neg	neg	neg
	2	+	+	++	+
	3	+	+	++	+
	4	++	+++	++	+
	5	+	++	++	++
	6	++	+++	++	++
	7	++	++	+++	+
	8	+	+	++	+
	9	neg	neg	+++	+
	10	neg	neg	+	neg
Bl - 300	1	neg	neg	neg	neg
	2	neg	neg	neg	neg
	3	neg	++	neg	+
	4	+	+	+	+
	5	++	+	++	+
	6	++	+++	++	+
	7	++	+++	++	++
	8	+++	+++	++	++
	9	+	+++	+	+
	10	neg	neg	+	neg
Bl - 350	1	neg	neg	neg	neg
	2	neg	neg	neg	neg
	3	neg	neg	neg	neg
	4	+	neg	neg	+
	5	neg	neg	neg	+
	6	neg	neg	neg	neg
	7	neg	neg	neg	neg
	8	neg	neg	neg	neg
	9	neg	neg	neg	neg
	10	neg	neg	neg	neg
nicht infizierte Kontrolle	1 - 10	neg		neg	

+ = angedeutete Zottenatrophie, * = einzelne Epithelzellen IF positiv.

++ = deutliche Zottenatrophie, ** = herdförmig IF positive Epithelzellbereiche.

+++ = starke Zottenatrophie, *** = gesamte Zottenoberfläche IF positiv.

Pathogenitätspunkt des attenuierten Virusstammes dar. Nur in einzelnen Abschnitten des mittleren Jejunums konnte noch eine geringgradige Degeneration des Zottenepithels bzw. fluoreszierende Einzelzellen nachgewiesen werden (Abb. 1).

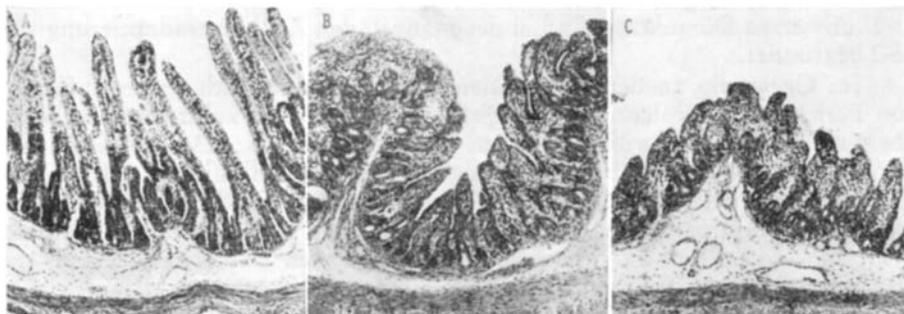


Abb. 1. Histologische Veränderungen im Dünndarm von Ferkeln nach Infektion mit dem attenuierten TGE-Virusstamm Bl. A: Normales Zottenprofil, nicht infiziert, Jejunum, 2. Abschn. B: Deutliche Zottenatrophie, Bl 300. ST, Jejunum, 5. Abschn. C: Starke Zottenatrophie, Bl 300. ST, Jejunum 8. Abschn., Kunststoffeinbettung, Färbung nach LADEWIG, schwaches Trockensystem

Das erste Viertel des Dünndarms der mit Bl-300 infizierten Ferkel wies keinerlei Zeichen einer TGE-Virusinfektion auf, dagegen waren die Abschnitte 5—9 von einer deutlichen bis starken Zottenatrophie und herdförmigen IF-Reaktionen geprägt (Abb. 2).



Die entzündlich-zellige Reaktion, die in der Schleimhaut beobachtet wurde, konnte nicht als Gradmesser der Pathogenität der einzelnen Viruspassagen herangezogen werden, da sie unregelmäßig auftrat und auch bei den hochpassierten Stämmen beobachtet werden konnte.

Abb. 2. Immunfluoreszenzfärbung eines Gefrierschnittes vom Jejunum (6. Abschn.) eines neugeborenen Ferkels nach oraler Infektion mit dem TGE-Virusstamm Bl 300. Herdförmig infizierter Zottenepithelbereich zweier benachbarter Zotten.

× 480

Diskussion

Die nach Infektion mit Bl-120, Bl-250 und Bl-300 festgestellten Virustiter wiesen keinen signifikanten Unterschied auf. Daß auch in dem Anfangsteil des Duodenums entgegen bisherigen Erfahrungen (PENSAERT et al., 1970) Virus nachweisbar war, ist wahrscheinlich auf eine Regurgitation des Darminhalts in den Magen zurückzuführen. Die sehr geringen Virustiter des mit Bl-2 infizierten Dünndarms sind in der mangelnden Zellkulturadaptierung von Bl-2 begründet.

Im Gegensatz zu den intestinalen Veränderungen nach oraler Infektion von Ferkeln mit virulenten TGE-Virusstämmen, die in zahlreichen Arbeiten übereinstimmend beschrieben worden sind (10; 12; 15; 23), existieren nur wenige Untersuchungen über die Pathogenität von in Zellkulturen attenuierten Virusstämmen. SHEFFY (22) infizierte Ferkel mit dem SH-Stamm, der 45 Passagen in Zellkulturen gezüchtet worden war, und stellte keinerlei klinische Symptome fest. Über ähnliche Ergebnisse berichteten CSONTOS et al. (8) mit dem ungarischen Ckp-Stamm, der über 42 Zellkulturpassagen gelaufen war. Dagegen wurde geringgradiger Durchfall nach Infektion von Ferkeln mit dem Purdue-Stamm nach 115 Zellkulturpassagen (11) sowie mit dem Stamm SH in der 35. Passage und den Stämmen SH, SH 8, TO und KA zwischen der 28. und 82. Zellkulturpassage (13; 20) beobachtet. Generell war die Inkubationszeit bei diesen Untersuchungen verlängert. Alle Ferkel überlebten die Infektion mit den attenuierten Virusstämmen. Diese Erfahrungen stehen im Widerspruch zu den hier vorgelegten Ergebnissen mit dem Bl-Stamm, wo noch nach 120 bzw. 250 Zellkulturpassagen die Virulenz sowenig abgeschwächt war, daß eine Infektion in der Regel zu schwerer Erkrankung und anschließendem Tod führte. Bei den mit Bl-120 und Bl-250 infizierten Ferkeln wurde ferner im gesamten Dünndarbereich mit Ausnahme des Duodenums Zottenatrophie und Virusvermehrung nachgewiesen. Die von mehreren Autoren beschriebene Verlagerung der Virusvermehrung in die Epithelzellen des kaudalen und mittleren Dünndarbereiches nach Infektion mit attenuierten TGE-Virusstämmen (11; 13; 21) wurde in geringem Maße bei dem Bl-Virusstamm erstmalig nach 300 Zellkulturpassagen festgestellt und war stark ausgeprägt bei Bl-350.

Bis zur 300. Passage kam es weiterhin zu deutlicher bis starker Zottenatrophie. Diese histologischen Befunde wurden durch Ergebnisse der parallel laufenden Virus- und Antigennachweise bestätigt. Dagegen stehen Beobachtungen von OKINAWA und MAEDA (19), die nach Infektion neugeborener Ferkel mit der 82. Zellkulturpassage eine geringgradige Desquamation der Epithelzellen, jedoch keine Atrophie der Zotten beschrieben. Ähnliche Befunde erzielten MORILLA et al. (18) mit dem Miller-Stamm in der 100. Zellkulturpassage. PENSAERT et al. (21) sowie FREDERICK et al. (11) beobachteten Zottenatrophie in ihren Untersuchungen nur in den kaudalen Dünndarbereichen.

Die mit dem Bl-Virusstamm vorgelegten Ergebnisse lassen sich mit den Daten für andere attenuierte Stämme nicht vergleichen. Der Bl-Stamm zeigte schon als Feldstamm eine wesentlich höhere Virulenz als andere bekannte TGE-Virusstämmen (2), so daß bei diesem Virus, ähnlich wie bei dem Virus der infektiösen Bronchitis (IB), einem Coronavirus der Hühner, große Virulenzunterschiede zwischen einzelnen Virusstämmen angenommen werden müssen (7; 28). Eine Erklärung dieser deutlichen Unterschiede ist nicht möglich. Der Verlust der Virulenz scheint beim TGE-Virusstamm Bl nach etwa 300 Zellkulturpassagen erreicht zu sein. Allerdings werden von diesem Virus noch die gleichen pathologischen Veränderungen im Ferkeldünndarm hervorgerufen, wie nach Infektion mit virulentem Virus, wenn auch in geringerem Ausmaß.

Da jedoch klinische Symptome nach Infektion neugeborener Ferkel mit diesem Bl-300-Virus nicht auftreten, bietet sich der Stamm für die Entwicklung einer oralen Lebendvaccine zur passiven Immunisierung der Ferkel gegen TGE an, vorausgesetzt die Eigenschaft der Symptomlosigkeit bleibt nach *in vivo* Passagen in neugeborenen Ferkeln erhalten und BOHLs Hypothese, daß eine Stimulierung der IgA-Antikörpersynthese in der Milchdrüse in direktem Zusammenhang zur Stärke der Infektion und den Veränderungen im Dünndarm steht (5), auch für diesen Virusstamm gültig ist.

Der TGE-Bl-300-Virusstamm ruft nach oraler Applikation bei neugeborenen Ferkeln keine Nebenwirkungen hervor und kann als unschädlich bezeichnet werden.

Zusammenfassung

Der TGE-Virusstamm Bl wurde in 350 Serienpassagen in Schweine-schilddrüsenzellkulturen attenuiert. Nach 2, 125, 250, 300 und 350 Passagen wurde die Pathogenität des Stammes für neugeborene Ferkel geprüft. Nach der 300. Zellkulturpassage ruft der Bl-Stamm zwar keine klinische Erkrankung in einem infizierten Wurf, jedoch an isoliert gehaltenen Ferkeln noch die gleichen pathologischen Veränderungen hervor wie der virulente Feldstamm, wenn auch in einem verkürzten Bereich des Dünndarms. Nach 350 Passagen wird nur noch ein Viertel des mittleren Jejunumbereichs infiziert, ohne dabei klinische Symptome hervorzurufen. Die Ergebnisse werden im Hinblick auf die Verwendung des Stammes für eine Immunprophylaxe diskutiert.

Summary

Attempts to establish an immunoprophylaxis for transmissible gastroenteritis virus infection of pigs

I. Pathogenicity of the Bl strain after serial passages

The Bl strain of TGE virus was propagated for 350 passages in swine thyroid cell cultures. Pathogenicity for newborn piglets was tested after 2, 120, 250, 300 and 350 passages. Pathological lesions observed with passage number 300 were similar to those detected with the virulent field strain, however, in a shorter portion of the small intestine. It did not, however, produce clinical symptoms when administered to newborn piglets. After 350 passages only $\frac{1}{4}$ of the middle part of the jejunum is infected without any clinical signs. The results are discussed with respect to the possibility of using the described strain for the development of an immune prophylaxis.

Résumé

Recherches sur le développement d'une immunoprophylaxie contre la gastroentérite transmissible (TGE) du porc

I. Pathogénicité de la souche Bl durant des passages en séries

La souche du virus TGE Bl a été atténuée lors de 350 passages en séries dans des cultures cellulaires de glande thyroïde du porc. La pathogénicité de la souche a été testée sur des porcelets nouveaux-nés après 2, 125, 250, 300 et 350 passages. Après le troiscentième passage en culture cellulaire, la souche Bl n'a plus provoqué de signe clinique dans une portée infectée, mais a donné par contre les mêmes lésions pathologiques chez des porcelets maintenus isolés; ces lésions furent toutefois localisées à un secteur raccourci de l'intestin grêle. Après 350 passages, seul un quart de la localisation moyenne du jejunum fut infecté, sans apparition de symptômes cliniques. Les résultats sont discutés en fonction de l'emploi de la souche pour une immunoprophylaxie.

Resumen

Ensayos para implantar una inmunoprofilaxis frente a la infección por el virus de la gastroenteritis transmisible (GET) de los cerdos

I. Patogeneidad de la estirpe Bl en el curso de pases seriados

La estirpe Bl del virus de la GET se atenuó en 350 pases seriados por cultivos celulares de tiroides porcinos. Tras 2, 125, 250, 300 y 350 pases, se contrastó la patogeneidad de la cepa para lechones recién nacidos. Aunque tras el pase célulocultural 300º no ocasionaba la estirpe Bl ninguna enfermedad clínica en una ventrigada infectada, sí que aparecían en lechones mantenidos aislados las mismas modificaciones patológicas que con la cepa campal virulenta, aunque solo en un tramo abreviado del intestino delgado. Después de 350 pases solo se infectaba la cuarta parte del tramo mediano del yeyuno, sin llegar a evocar síntomas clínicos. Los resultados se discuten en atención al empleo de la estirpe para una profilaxis inmunológica.

Literaturverzeichnis

1. ABOU-YOUSSEF, M. H., und M. RISTIC, 1975: Protective effect of immunoglobulin in serum and milk of sows exposed to transmissible gastroenteritis virus. *Canad. J. comp. Med.* 35, 41—45.
2. BACHMANN, P. A., T. HÄNICHEN, K. DANNER und B. BIBRACK, 1972: Zur Epidemiologie der übertragbaren Gastroenteritis (TGE) beim Schwein. *Zbl. Vet. Med. B*, 19, 166—174.
3. BOHL, E. H., und L. J. SAIF, 1975: Passive immunity in transmissible gastroenteritis of swine: immunoglobulin characteristics of antibodies in milk after inoculating virus by different routes. *Infect. Immun.* 11, 23—32.
4. BOHL, E. H., G. T. FREDERICK und L. J. SAIF, 1975: Passive immunity in transmissible gastroenteritis of swine: intramuscular injection of pregnant swine with a modified live virus vaccine. *Am. J. Vet. Res.* 36, 267—271.
5. BOHL, E. H., R. K. GUPTA, L. W. McCLOSKEY und L. J. SAIF, 1972: Immunology of transmissible gastroenteritis. *J. Amer. Vet. Med. Ass.* 160, 543—549.
6. BOHL, E. H., R. K. P. GUPTA, F. M. W. OLQUIN und L. J. SAIF, 1972: Antibody responses in serum, colostrum and milk of swine after infection or vaccination with transmissible gastroenteritis virus. *Infect. Immun.* 6, 289—301.
7. BÜLOW, V. VON, 1966: Infektiöse Bronchitis der Hühner. III. Vergleichende Untersuchungen der Virulenz und Wirksamkeit von vier Lebendvakzinen. *Zbl. Vet. Med. B*, 13, 767—781.
8. BURKHARDT, R., 1970: Farbatlas der klinischen Histopathologie von Knochenmark und Knochen. Springer Verlag, Berlin.
9. CSONTOS, L., T. SZENT-IVANYI und J. BENYEDA, 1974: Vaccination experiments against transmissible gastroenteritis (TGE) of swine. I. Relationship of antibody level and immunity. *Acta vet. Acad. Sci. hung.* 24, 111—119.
10. DOYLE, L. P., und L. M. HUTCHINGS, 1946: A transmissible gastroenteritis in pigs. *J. Amer. Vet. Med. Ass.* 108, 257—259.
11. FREDERICK, G. T., E. H. BOHL und R. F. CROSS, 1976: Pathogenicity of an attenuated strain of transmissible gastroenteritis virus for newborn pigs. *Am. J. vet. Res.* 37, 165—169.
12. HAELTERMAN, E. D., 1972: On the pathogenesis of transmissible gastroenteritis of swine. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 160, 534—540.
13. HARADA, K., S. FURUUCHI, T. KUMAGAI und J. SASAHARA, 1969: Pathogenicity, immunogenicity and distribution of transmissible gastroenteritis virus in pigs. *Natl. Inst. Anim. Health Quart.* 9, 185—192.
14. HESS, R. G., und P. A. BACHMANN, 1976: In-vitro differentiation and pH sensitivity of field and cell culture attenuated strains of transmissible gastroenteritis virus. *Infect. Immun.* 13, 1642—1646.
15. HOOPER, B. E., und E. O. HAELTERMANN, 1969: Lesions of the gastrointestinal tract of pigs infected with transmissible gastroenteritis. *Canad. J. comp. Med.* 33, 29—36.
16. KÄRBER, G., 1931: Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmakologie* 162, 480—483.
17. MAYR, A., P. A. BACHMANN, B. BIBRACK und G. WITTMANN, 1977: Virologische Arbeitsmethoden. Bd. II. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, im Druck.

18. MORILLA, A., R. C. KLEMM, P. SPRINO und M. RISTIC, 1976: Neutralization of a transmissible gastroenteritis virus of swine by colostrum antibodies elicited by intestine and cell culture-propagated virus. *Am. J. Vet. Res.* 37, 1011—1016.
19. OKINAWA, A., und M. MAEDA, 1965: Histopathology of transmissible gastroenteritis in experimentally infected newborn piglets. I. Lesions in the digestive tract. *Natl. Inst. Anim. Health. Quart.* 5, 190—201.
20. PENSART, M., T. BURNSTEIN und E. O. HAELTERMAN, 1970: Cell culture-adapted SH strain of transmissible gastroenteritis virus of pigs: in vivo and in vitro studies. *Am. J. Vet. Res.* 31, 771—781.
21. PENSART, M., E. O. HAELTERMAN und T. BURNSTEIN, 1970: Transmissible gastroenteritis of swine: virus-intestinal cell interactions. I. Immunofluorescence, histopathology and virus production in the small intestine through the course of infection. *Arch. ges. Virusforsch.* 31, 321—334.
22. SHEFFY, B. E., 1965: Characterization of transmissible gastroenteritis virus. *Proc. Ann. Meet. US Livestock Sanit. Ass.* 69, 351—363.
23. THAKE, D. C., 1968: Jejunal epithelium in transmissible gastroenteritis. *Am. J. Pathol.* 53, 149—168.
24. THORSEN, J., und S. DJURICKOVIC, 1972: Experimental immunization of sows with inactivated transmissible gastroenteritis (TGE) virus. *Canad. J. comp. Med.* 35, 99—102.
25. WITTE, K. H., 1971: Micro-color test for assay of transmissible gastroenteritis virus-neutralizing antibodies. *Arch. ges. Virusforsch.* 33, 171—176.
26. WITTE, K. H., 1974: Häufigkeit und Verbreitung Transmissible-Gastroenteritis (TGE) Virus neutralisierender Antikörper bei Mastschweinen in acht Kreisen Nordwestdeutschlands. *Zbl. Vet. Med. B.* 21, 376—384.
27. WITTE, K. H., und B. C. EASTERDAY, 1967: Isolation and propagation of the virus of transmissible gastroenteritis of pigs in various pig cell cultures. *Arch. ges. Virusforsch.* 20, 327—350.
28. WOERNLE, H., 1968: Probleme der Impfungen gegen die infektiöse Bronchitis des Huhnes. *Tierärztl. Umsch.* 23, 58—63.

Adresse der Autoren: Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin, Veterinärstraße 13, 8000 München 22.