

*Aus der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere,
Tübingen, Germany*

Möglichkeiten der Vakzinierung mit inaktiviertem Virus über den Respirationstrakt untersucht am System Aujeszky-Virus — weiße Maus¹

Von

M. NEUKIRCH und K. BAUER

Mit 3 Abbildungen und 4 Tabellen

(Eingegangen am 28 Januar 1976)

1. Einleitung

In der Veterinärmedizin ließen die immer mehr in den Vordergrund tretende Verlagerung von Therapie auf Prophylaxe sowie die Umstrukturierung der Tierhaltung von Einzel- auf Massentierhaltung den Wunsch nach einer Impfmethode aufkommen, durch die mit geringstem Arbeitsaufwand in möglichst kurzer Zeit große Tierzahlen immunisiert werden können. Die Impfstoffapplikation in Form eines Aerosols scheint eine Methode zu sein, mit der diesen Forderungen entsprochen werden kann. Hinzu kommt, daß der Respirationstrakt die Eintrittspforte zahlreicher Krankheitserreger ist, und somit eine Vakzinierungsart, bei der eine Induktion lokaler Antikörper erreicht wird, gerade bei solchen Erkrankungen sinnvoll erscheint.

Die Anwendung der Spray- oder Aerosolvakzinierung mit Impfstoffen, die aktives Virus enthalten, ist schon mehrfach beschrieben worden, so z. B. von ALENKO und BRAZNIKOV (1970), DORN et al. (1973) und SCHULZE-REHM et al. (1974) mit Newcastle disease (ND) — Vakzinen sowie von ACKERMANN (1966) und KULL et al. (1970) mit Staupevakzinen.

Bei der Verwendung solcher Impfstoffe kann eine geringe aufgenommene Antigenmenge durch die Vermehrungsfähigkeit des Virus wieder ausgeglichen werden, was bei der Vakzinierung mit inaktiviertem Virus nicht der Fall ist. Aus diesem Grunde liegen auch nur relativ wenig Berichte über erfolgreiche Impfungen mit nicht vermehrungsfähigem Virus über den Respirationstrakt vor. Diese betreffen die ND (ZAKAY-RONES, et al., 1971), die infektiöse Bronchitis des Geflügels (CORIA u. HOFSTADT, 1971; CORIA, 1973), die Influenza des Menschen (KASEL et al., 1969; WALDMAN et al., 1969, 1970, 1973) sowie Rhinoviren (PERKINS et al., 1969).

¹ Teile dieser Arbeit wurden zur Inaugural-Dissertation des Erstautors verwendet.

In der folgenden Arbeit wollten wir am Beispiel der Aujeszky'schen Krankheit als einer Erkrankung, deren Eintrittspforte auch der Respirations-trakt sein kann, prüfen, ob mit nicht vermehrungsfähigem Virus als Aerosol eine Immunität zu erzielen ist.

2. Material und Methoden

Virus

In allen Versuchen kam der Stamm Phylaxia des *Aujeszky-Virus* (*AuV*) der 15.—19. Passage in der permanenten Babyhamsterzelllinie BHK₂₁ mit einem durchschnittlichen Titer von 10^7 KID₅₀ (50 % kulturinfektiöse Dosen) je 0,1 ml zur Anwendung.

Die Virustiter der 10 %igen Organverreibungen oder von zur Vakzineherstellung bestimmten Viruschargen wurden auf Röhrchenkulturen von BHK₂₁-Zellen bestimmt und nach der Methode von KÄRBER (1931) berechnet. Titerunterschiede wurden bei der Titration in Zehnerstufen und der Verwendung von 5 bzw. von 10 Probanden pro Verdünnung bei einem Unterschied von mehr als 0,89 bzw. von mehr als 0,65 log als signifikant (LORENZ, 1960) angesehen.

Versuchstiere

Für die Infektions- und Vakzinierungsversuche verwendeten wir 4—5 Wochen alte männliche und weibliche NMRI-Mäuse der institutseigenen Zucht. Während der Versuche wurden die Tiere nach Geschlecht getrennt gehalten und mit pelletiertem Standardfutter Altromin (Fa. Altrogge, Lage, Lippe) ernährt.

Vakzineherstellung und Immunisierung der Mäuse

Das virushaltige Medium wurde, wie von SKODA und WITTMANN (1973) beschrieben, mit 0,15 %igem (v/v) Äthyläthylenimin (EEI) inaktiviert, anschließend mit 10 %igem (w/v) Polyäthylenglykol (PEG) präzipitiert und das Sediment in 1/50 bis 1/100 des Ausgangsvolumens aufgenommen. Jede inaktivierte Viruscharge wurde in BHK₂₁-Zellkulturen auf Unschädlichkeit geprüft. Vermehrungsfähiges Virus konnte in keinem Fall nachgewiesen werden.

Als Adjuvans stand eine mit Merthiolat 1 : 10 000 als Konservierungsmittel versetzte Bordetella pertussis-Keimsuspension zur Verfügung². Diese Suspension wurde mehrmals eingefroren und wieder aufgetaut, der Zelldetritus niedertourig abzentrifugiert und der Überstand über Nacht gegen Aq. dest. dialysiert. Von diesem Bordetella pertussis-Extrakt (BPE) wurde soviel zu dem inaktivierten Viruskonzentrat gegeben, daß die Konzentration des BPE in der Vakzine 1×10^{10} Bordetella pertussis-Keimen/ml äquivalent war.

Die intramuskuläre (i. m.) Immunisierung der Mäuse erfolgte durch Injektion in die Oberschenkelmuskulatur des rechten Hinterbeines. Die intranasale (i. n.) Vakzination wurde zur genauen Dosierung in Äthernarkose vorgenommen. Bei der Aerosolvakzination wurden jeweils Gruppen von 20 Mäusen in einem modifizierten Apparat nach HENDERSON (1952) dem Aerosol ausgesetzt.

Zur Aerosolerzeugung diente dabei ein Ultraschallvernebler (Modell 722, Fa. Hense u. Co. KG., Eltville/Rhein), der Teilchengrößen von 1—5 μ bei einem Durchschnitt von 3 μ erzeugt. Das Aerosolvolumen wurde mit einem Experimentier-Gaszähler („Unimat“, Meßgerätfabrik J. F. Lange, Gelsenkirchen) gemessen; zur Einstellung eines kontinuierlichen Aerosolflusses ver-

² Für die Überlassung der Pertussis-Keimsuspension danken wir der Behringwerke A. G.

wendeten wir eine Saugpumpe (Medvak-Pumpe, Typ M, Fa. A. Pfeifer, Wetzlar). Die maximale theoretisch inhalierbare Vakzinemenge (= theoretische Inhalationsdosis) wurde bei einem angenommenen Atemminutenvolumen (AMV) der Maus von 25 ml (GUYTON, 1947) nach der Formel

$$\frac{\text{vernebelte Vakzinemenge}}{\text{Aerosolvolumen}} \times \text{AMV} \times \text{Expositionszeit}$$

ermittelt.

Neutralisationstests

Vor der Testinfektion wurde den vakzinierten Mäusen nach der von RILEY (1960) beschriebenen Methode aus dem retrobulbären Venensinus des Auges Blut entnommen und die gewonnenen Seren von meist 5 Mäusen gepoolt.

Zur Gewinnung von Lungenspülflüssigkeit wurde in Anlehnung an die Methode von WAGNER (1956) vorgegangen, wobei wir als Spülflüssigkeit VM 3 a (SCHWÖBEL und SIEDENTOPF, 1961) mit Zusatz von 500 i. E. Penicillin und 0,5 mg Streptomycin pro ml verwendeten. Lungenextrakte wurden 1 : 10 (w/v) mit dem gleichen Medium verrieben.

Alle im Neutralisationstest zu untersuchenden Proben wurden vorher 30 Min. lang bei 56 °C inaktiviert. Die Proben wurden dann in Potenzen von 2 verdünnt und zu jeder Verdünnung das gleiche Volumen einer konstanten Virusverdünnung von 20—50 KID₅₀/0,1 ml hinzugegeben. Die Gemische wurden für 30 Min. bei 37 °C im Wasserbad gehalten und anschließend mit jeder Verdünnungsstufe 5 BHK-Zellkulturröhrchen beimpft. Die Röhrchen wurden bis zum 5. Tag abgelesen und die Neutralisationstiter nach KÄRBER (1931) berechnet.

Testinfektionen

16—18 Tage p. vacc. bzw. 14 Tage p. revacc. wurden die Mäuse i. m. oder i. n. testinfiziert. Dabei ist das Testinfektionsvirus entweder in einer konstanten Menge oder in Form einer Verdünnungsreihe in 10er Stufen an 5 oder 10 Probanden verabreicht worden. Die 50 % letale Dosis bestimmten wir nach KÄRBER (1931), den Schutzindex berechneten wir als Quotient der LD₅₀ von Kontrollmäusen und der LD₅₀ von vakzinierten Mäusen.

Tabelle 1

Schutzindizes und Titer neutralisierender Antikörper nach i. n. und i. m. Vakzination von Mäusen mit unterschiedlich konzentriertem und inaktiviertem AuV. Die Testinfektion erfolgte durch i. n. Applikation der Virusverdünnungen

Antigen	Impfung	Adjuvans	AK-Titer ¹	Schutzindex
0,1 ml AuV ²	i. n.	ohne	< 1 : 1	0,68
		mit BPE	1 : 1	1,8
unverdünnt	i. m.	ohne	1 : 1	1,0
		mit BPE	1 : 3	1,7
0,1 ml AuV	i. n.	ohne	n. u. ³	1,0
		mit BPE	n. u.	1,6
1 : 5 verdünnt	i. m.	ohne	n. u.	0,45
		mit BPE	n. u.	1,64

¹ Geometrisches Mittel der Antikörpertiter aus je 6 Serumpools von jeweils 5 Mäusen

² 50fach konzentriertes Antigen, Titer vor Inaktivierung: 10^{7,9} KID₅₀

³ Nicht untersucht

3. Ergebnisse

Vergleich der i. m. und i. n. Immunisierung

Um das Immunisierungsvermögen der Vakzinen nach Applikation über den Respirationstrakt beurteilen zu können, wurden zunächst Mäuse i. m. und i. n. mit verschiedenen Antigenkonzentrationen sowohl mit als auch ohne BPE als Adjuvans vakziniert. In der Tab. 1 sind die Ergebnisse aufgeführt, die nach i. n. Testinfektion erhalten worden sind. Die Impfung mit unverdünnter Aujeszky-Vakzine ohne Adjuvans zeigte bei der i. n. Applikation einen Schutzindex von 0,68 und bei der i. m. Verimpfung einen Index von 1,0. Nach Zusatz von BPE als Adjuvans waren die Schutzindizes von 1,8 für die i. n. vakzinierten und von 1,7 für die i. m. vakzinierten Mäuse nahezu identisch.

Tabelle 2

Vergleich von i. n. und i. m. Testinfektion mit AuV bei i. n. und i. m. vakzinierten Mäusen

Vakzination ¹		i. n.	i. m.
Schutzindizes nach Testinfektion ²	i. n.:	2,14	2,10
	i. m.:	1,65	≥ 2,75
Ak - Titer ³		< 1 : 1	1 : 3

¹ Aujeszky-Vakzine mit BPE, Titer: $10^{7,1}$ KID₅₀, 55fache Konzentrierung, Dosis: 0,1 ml/Maus

² 0,1 ml Virusverdünnungen/Maus

³ Geometrisches Mittel der Titer neutralisierender Antikörper aus je 4 Serumpools von jeweils 10 Mäusen

Die Untersuchung der Seren auf neutralisierende Antikörper ergab bei der i. m. Applikationsform Titer von 1 : 1 bzw. 1 : 3 mit BPE als Adjuvans, bei den i. n. geimpften Mäusen lagen die entsprechenden Werte bei < 1 : 1 bzw. 1 : 1. Die Verabfolgung von 1 : 5 verdünntem Antigen ergab für beide Applikationsarten keine signifikante Änderung in der Höhe des Schutzes. Um zu erfahren, ob sich der Applikationsweg des Testinfektionsvirus auf die Höhe

Tabelle 3

Schutzindizes und Titer neutralisierender Antikörper nach i. n. und Aerosolvakzination und Revakzination von Mäusen mit AuV. Die Testinfektion erfolgte durch i. n. Applikation einer Virusverdünnungsreihe

Impfung	Dosis ¹	Ak - Titer ²	Revakz.	Dosis	Ak - Titer	Schutzindex
i. n.	0,1 ml	n. u. ³	-	-	-	2,2
	0,1 ml	n. u.	i. n.	0,1 ml	n. u.	1,8
i. n. mit BPE	0,1 ml	n. u.	-	-	-	2,6
	0,1 ml	< 1 : 1	i. n. mit BPE	0,1 ml	1 : 8	3,8
Aerosol	0,2 ml ⁴	n. u.	-	-	-	0,6
	0,19 ml	n. u.	Aerosol	0,25 ml	n. u.	0,2
Aerosol mit BPE	0,18 ml	n. u.	-	-	-	0,8
	0,16 ml	neg.	Aerosol mit BPE	0,2 ml	neg.	0,8

¹ Aujeszky-Vakzine, Titer: $10^{7,8}$ KID₅₀, 60fache Konzentrierung

² Geometrisches Mittel der Antikörpertiter aus je 6 Serumpools der i. n. vakzinierten und aus je 4 Serumpools der mit Aerosol vakzinierten Mäuse. 1 Serumpool enthielt Seren von 5 Mäusen

³ Nicht untersucht

⁴ Es wurden bei der Aerosolapplikation die theoretischen Inhalationsdosen angegeben

des erhaltenen Schutzes auswirkt, wurde ein „Kreuzversuch“ ausgeführt. Je eine Hälfte i. n. und i. m. vakzinierter Mäuse wurden i. n. infiziert, die jeweilige andere Hälfte erhielt das Virus i. m. In Tabelle 2 sind die Ergebnisse wiedergegeben. Nach i. n. Testinfektion ergaben sich fast gleiche Schutzindizes mit 2,14 in der i. n. geimpften Gruppe und 2,10 bei den i. m. vakzinieren Mäusen. Die Antikörpertiter in der „i. m.-Gruppe“ lagen mit durchschnittlich 1 : 3 um mehr als das 3fache höher als in der „i. n.-Gruppe“ (1 : 1). Nach i. m. Testinfektion war der Schutz der i. n. vakzinieren Tiere mit einem Index von 1,65 wesentlich geringer als in der i. m. geimpften Gruppe mit > 2,75.

Vergleich der i. n. und Aerosolvakzination

Diese Versuche sollten die Frage klären, ob sich durch die Verabreichung der Vakzine als Aerosol ebenfalls ein Schutz induzieren läßt, und inwieweit dieser Schutz durch Adjuvanzusatz und/oder Revakzination erhöht werden kann.

Hierzu wurden Mäuse i. n. und per Aerosol sowohl mit als auch ohne BPE-Zusatz vakziniert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die i. n. durchgeführte Testinfektion ergab in der „i. n.-Gruppe“ ohne Adjuvans einen Schutzindex von 2,2 nach einmaliger Impfung und von 1,8 nach der Revakzination. Dagegen erfuhr der Schutzindex in der i. n. mit Adjuvanzusatz geimpften Gruppe durch die Revakzination eine Erhöhung von 2,6 auf 3,8 und der Antikörpertiter stieg von 1 : 1 auf 1 : 8. Bei den aerosolvakzinieren Mäusen blieb die Revakzination in allen Fällen ohne Erfolg. Eine zweimalige Applikation der Vakzine ohne Adjuvans ergab sogar eine Reduzierung des Schutzindex von 0,6 auf 0,2, mit Adjuvanzusatz wurde der Wert von 0,8 beibehalten. Virusneutralisierende Antikörper waren in den Seren der Aerosolgruppen in keinem Fall nachzuweisen. Die Isolierung von Antikörpern aus Lungenextrakten oder Lungenspülungen gelang weder aus der i. n.-Gruppe noch aus der Aerosolgruppe.

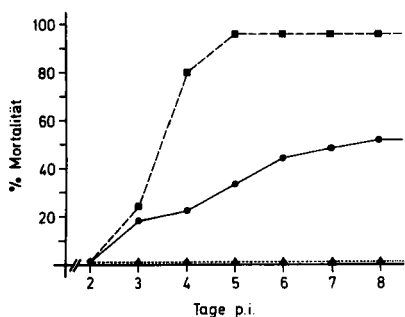


Abb. 1. Summenprozentkurven von gestorbenen verschieden vorbehandelten Mäusen nach i. n. durchgeführter Testinfektion mit AuV (etwa 8 MLD₅₀/Maus)

■ ————— ■ unbehandelte Kontrollmäuse
● ————— ● aerosolvakzinieren Mäuse
▲ - - - - - ▲ i. n. vakzinieren Mäuse

Die weiteren Untersuchungen zur Bestimmung der aerosolinduzierten Immunität wurden mit geändertem Infektionsmodus ausgeführt. Dabei wurden i. n. und per Aerosol mit BPE-Zusatz vakzinieren Mäuse sowie Kontrollen 16 Tage p. vacc. mit einer konstanten Virusmenge von 8 MLD₅₀/Maus infiziert und die Überlebensrate bestimmt (siehe Abb. 1). Die Aerosolvakzination reduzierte zwar die Todesrate von 96% auf 52%, die i. n. Impfung bewirkte jedoch eine vollständige Immunität. Auch hier konnten von den aerosolvakzinieren Mäusen trotz des Schutzes gegenüber einer Testinfektion keine Antikörper in den untersuchten Organen nachgewiesen werden.

Virusvermehrung in immunen und nicht immunen Mäusen

Die nachfolgenden Versuche sollten klären, inwieweit eine Aerosolvakzination mit nicht vermehrungsfähigem Antigen die Vermehrung und Ausbreitung des i. n. verabfolgten Testinfektionsvirus zu hemmen in der Lage ist.

In Vorversuchen, in denen mehrere Organe von Mäusen nach i. n. Infektion auf Virusgehalt untersucht worden waren, konnte nur in Gehirnen und Lungen regelmäßig *AuV* nachgewiesen werden, so daß wir diese Organe für die weiteren Virusisolierungsversuche auswählten.

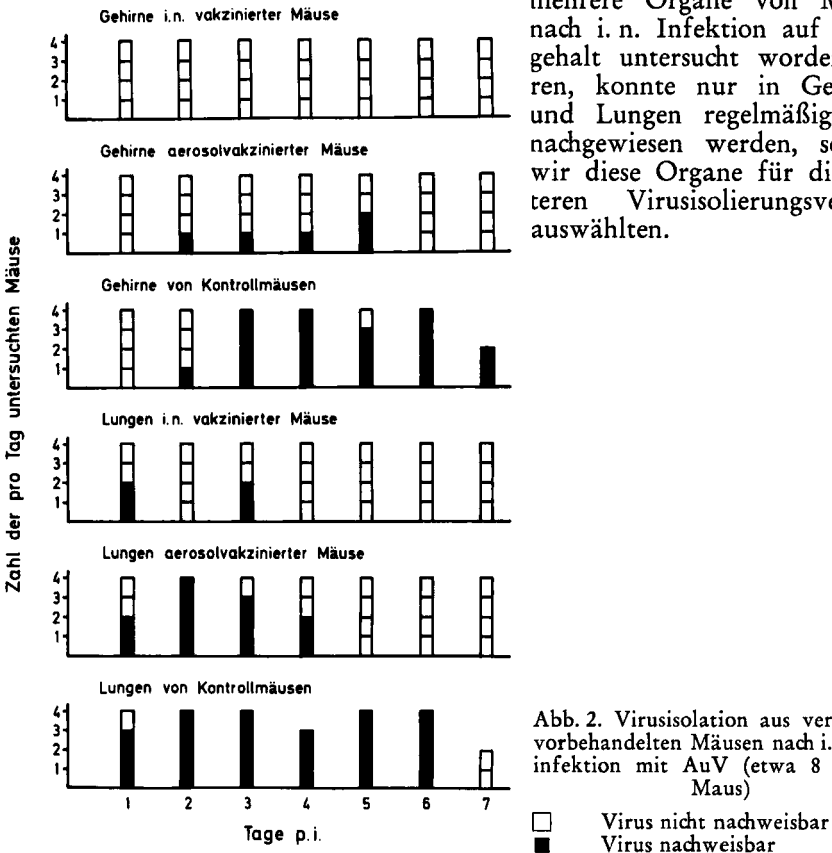


Abb. 2. Virusisolierung aus verschiedenen vorbehandelten Mäusen nach i. n. Testinfektion mit *AuV* (etwa 8 MLD_{50} /Maus)

□ Virus nicht nachweisbar
 ■ Virus nachweisbar

Zu diesem Zweck wurden i. n. und per Aerosol vakzinierter Mäuse sowie nicht vorbehandelte Kontrollen 16 Tage p. vacc. i. n. mit 8 MLD_{50} /Maus testinfiziert. Vom 1. bis 7. Tag p. i. wurden aus jeder Gruppe jeweils 4 Mäuse getötet und der Virusgehalt der Lungen und Gehirne bestimmt. Die Isolationsversuche ergaben folgendes Bild: Aus 25 von 26 untersuchten Kontrollmäusen, aus 13 von 28 mit Aerosol und aus 4 von 28 i. n. vakzinierter Mäuse konnte entweder aus Gehirnen oder Lungen Virus isoliert werden. Der jeweilige Anteil der virushaltigen Organe und der Zeitpunkt der Virusisolierung können der Abbildung 2, die genauen Titer der Tabelle 4 entnommen werden.

Ein Vergleich der an den einzelnen Tagen nach der Infektion aus Lungen und Gehirnen erhaltenen Durchschnittstitern ist graphisch in den Abbildungen 3 a und 3 b zusammengefaßt. Sie zeigen für alle 3 Gruppen bei den Lungenisolaten den Gipfel der Virusvermehrung am 3. Tag mit Titern von 3,52 für die Kontrolltiere, von 2,35 für die „Aerosoltiere“ und von 0,9 für die i. n. vakzinierter Mäuse. Die Kurve für die Gehirnisolate zeigt bei den Kontrollen einen Peak am 4. und einen am 6. Tag mit Titern von 4,15 und 3,7, die Kurve

Tabelle 4

Reisolierung von AuV aus Organen verschieden vorherbehandelter Mäuse nach Testinfektion mit 8 MLD₅₀ pro Maus

Tage p. i.	Kontroll - Mäuse		mit Aerosol vakzinierter Mäuse		i. n. vakzinierter Mäuse	
	Gehirn	Lunge	Gehirn	Lunge	Gehirn	Lunge
1	- ¹	-	-	0,9	-	-
	-	1,1 ²	-	-	-	-
	-	2,1	-	-	-	0,7
	-	1,7	-	1,0	-	0,8
2	-	3,3	-	2,9	-	-
	-	3,1	0,7	2,1	-	-
	3,3	2,5	-	1,7	-	-
	-	3,3	-	1,3	-	-
3	4,3	5,5	3,5	2,7	-	0,7
	3,5	4,3	-	-	-	1,9
	1,7	2,7	-	3,5	-	-
	1,7	1,6	-	2,7	-	-
4	4,1	n. u. ³	3,9	1,7	-	-
	4,5	3,7	-	2,3	-	-
	3,9	2,9	-	-	-	-
	4,1	1,4	-	-	-	-
5	4,1	3,5	4,3	-	-	-
	3,9	2,7	4,1	-	-	-
	-	1,0	-	-	-	-
	1,2	1,4	-	-	-	-
6	3,9	1,9	-	-	-	-
	3,9	2,3	-	-	-	-
	3,5	0,7	-	-	-	-
	3,5	1,5	-	-	-	-
7	2,9	-	-	-	-	-
	2,7	-	-	-	-	-
	n. u.	n. u.	-	-	-	-
	n. u.	n. u.	-	-	-	-

¹ In 0,05 g Organmaterial kein Virus nachweisbar² \log_{10} KID₅₀/0,1 ml Organverreibung; Organverreibung 10⁰/0,1 g == 10⁻¹³ Nicht untersucht

der „Aerosoltiere“ weist dagegen nur ein Maximum mit einem Titer von 2,35 am 5. Tag auf. Kein Virus konnte aus den Gehirnen i. n. vakzinierter Mäuse isoliert werden. Darüberhinaus ergab sich, daß bei den per Aerosol vakzinieren Tieren gegenüber den Kontrollen die Zeitspanne, innerhalb der ein Virusnachweis aus Lungen und Gehirnen geführt werden konnte, um 2 Tage verringert war.

4. Diskussion

Die vorliegenden Versuche haben gezeigt, daß bei der Aujeszky'schen Krankheit der Mäuse — einer Erkrankung, deren Eintrittspforte auch der obere Respirationstrakt sein kann — grundsätzlich eine Immunisierung mit inaktiviertem Antigen über die Atemwege möglich ist. Dabei ergab ein direkter Vergleich zwischen der i. n. Vakzination und der i. m. Impfstoffverabreichung (Tab. 1 u. 2) bei annähernd gleicher Dosierung in der Schutzwirkung keinen Vorteil für die i. m. Immunisierungsform, sofern das Infektionsvirus

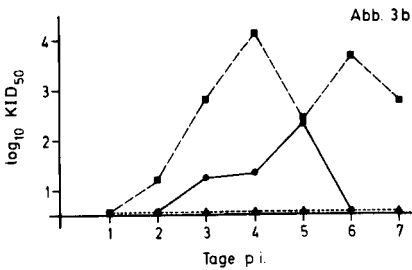
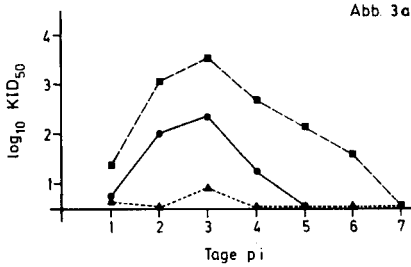


Abb. 3. Reisolierung von AuV aus Lungen (Abb. 3 a) und Gehirnen (Abb. 3 b) verschieden vorbehandelter Mäuse nach i. n. Testinfektion mit etwa 8 MLD₅₀/Maus. Jeder Kurvenpunkt gibt den Durchschnittstiter von 4 Proben an

■ — — — — ■ unbehandelte Kontrollmäuse
 ● — — — — ● aerosolvakzinierter Mäuse
 ▲ - - - - - ▲ i. n. vakzinierter Mäuse

i. n. appliziert wurde. Wurde die Testinfektion jedoch parenteral (i. m.) durchgeführt, erwies sich die i. m. Impfung als wesentlich wirkungsvoller. Weiterhin wurde deutlich, wie wenig der nach einer Testinfektion über die Atemwege nachgewiesene Schutz mit dem humoralen Antikörperspiegel korreliert. Trotz eines gegenüber den i. n. vakzinieren Mäusen mehrfach erhöhten durchschnittlichen Antikörpertiters im Serum wiesen die i. m. geimpften Tiere keinen besseren Schutz auf, und die Folgerung scheint berechtigt, daß ein lokaler Immunmechanismus für den Schutz nach i. n. Impfstoffverabreichung mitverantwortlich ist, obgleich keine lokalen Antikörper nachgewiesen werden konnten. Letztere Beobachtung steht im Gegensatz zu FAZEK DE ST. GROTH und DONNELLY (1950), die inaktivierte Influenzavakzinen verwendeten, sowie PERKINS et al. (1969), die mit inaktivierten Rhinoviren arbeiteten. Sie fanden nach Vakzination über den Respirationstrakt und anschließender Testinfektion zwar ebenfalls keine Korrelation zwischen humoralem Antikörperspiegel und erzieltm Schutz, aber eine deutliche Abhängigkeit des Schutzeffektes von der Höhe des sekretorischen Antikörpertiters. Daraus läßt sich schließen, daß beim Schutz gegen die Aujeszky'sche Krankheit die zelluläre Immunität in höherem Maße beteiligt ist, als bei den beiden anderen Infektionen.

Auch durch die Aerosolapplikation von nicht vermehrungsfähigem Virus konnten wir eine Immunität erzielen (siehe Tab. 3). Ein signifikanter Schutz war jedoch nur mit einem Adjuvans zu erreichen. Hier war auch ohne Nachweis jeglicher Antikörper eine Immunität vorhanden, die, wie aus den Abbildungen 2 und 3 zu entnehmen ist, eine geringere Virusvermehrung in der Lunge sowie ein selteneres Übertreten des Virus ins Gehirn bewirkte. Dies kann wiederum als Hinweis auf die Bedeutung der zellulären Immunität gewertet werden.

In allen Versuchen war jedoch die i. n. Applikation der Aerosolvakzination weit überlegen. Dies ist deutlich aus dem Vergleich der Schutzindizes i. n. und per Aerosol vakzinierter Mäuse ersichtlich (Tab. 3). Weiterhin gelang es in den Reisolierungsversuchen in keinem Fall, aus den Gehirnen i. n. vakzinierter Mäuse Virus zu isolieren, und die Virustiter in den Lungen lagen erheblich niedriger. Die Ursache für die insgesamt wesentlich schwächere Aerosol-

wirksamkeit ist einerseits trotz der theoretischen hohen Inhalationsdosen in einer zu geringen Antigenaufnahme zu suchen. Bei den theoretischen Inhalationsdosen handelt es sich ja um die theoretisch möglichen Maximalwerte, die z. B. durch mehrmalige Inhalation des gleichen Aerosolvolumens praktisch nicht erreicht werden können. Weiterhin muß die Auswirkung des Lungen-Clearance (KASS et al., 1966; RYLANDER, 1966) in Form der Eliminierung eingedrungener Aerosolpartikeln ohne Kontakt mit der Schleimhaut mit berücksichtigt werden. Dazu kommt noch, daß auch von einem für den Menschen lungengängigen Aerosol bei manchen Tieren ein erheblicher Teil in der Nase zurückgehalten wird. Nach WORTH und SCHILLER (1951) werden bei Kaninchen etwa 85 % eines Aerosols mit Tröpfchengrößen von etwa 2μ und kleiner im Nasenbereich niedergeschlagen. Für die Mäuse dürften ähnliche Bedingungen gelten, so daß das von unserem Gerät erzeugte Aerosol mit einer durchschnittlichen Tröpfchengröße von etwa 3μ zum größten Teil nur den Nasenstrakt des Atmungsapparates stimulieren kann. Umgekehrt gelangen nach i. n. Verabfolgung einer Vakzine zwar auch etwa 10—20 % des Inokulums in die Lunge (FAZEKAS DE ST. GROTH und DONNELLY, 1950), der größere Teil verbleibt jedoch im Nasenrachenraum. Die bessere Immunität nach i. n. Vakzination muß daher auf die größere Wirksamkeit in diesem Gebiet und dem hierfür zuständigen lymphatischen System zurückgeführt werden. Hierfür spricht auch die Arbeit von WALDMANN et al. (1970), die die beste Induktion sekretorischer Antikörper in Nasensekreten nach Applikation nicht mehr lungengängiger Aerosole von etwa 50μ Partikeldurchmesser bzw. nach i. n. Vakzination erhielten.

Unsere Ergebnisse lassen also den Schluß zu, daß zumindest beim System AuV — weiße Maus und der von uns angewandten Impftechnik die Induktion der Immunität über den Respirationstrakt im Nasenbereich stattfindet.

Von Interesse ist noch eine Beobachtung, die bei der Revakzination über den Atmungsapparat gemacht wurde, und die auch die Bedeutung eines potenten Adjuvans bei der Aerosolvakzination erkennen läßt. Sowohl bei der i. n. Revakzination als auch nach 2maliger Applikation der Vakzine als Aerosol wurde dann eine Depression des nach einmaliger Vakzination erhaltenen Schutzes gesehen, wenn dem Impfstoff kein Adjuvans hinzugegeben worden war. Ähnliche Ergebnisse sind schon von SCHÜTZLER und DOCKHORN (1972) erhalten worden, die nach Aerosolapplikation von Tetanusantigen bei Pferden eine Senkung des Antikörperspiegels im Serum erhielten. Es muß also zur Verhinderung einer Depression durch eine zweite Verabfolgung einer inaktivierten Vakzine über den Respirationstrakt eine so große Menge an Antigen zugeführt werden, daß sie nicht mehr neutralisiert werden kann und dabei nur den Schutz herabsetzt. Diese Forderung wirkt bei Massenvakzinationen per Aerosol speziell im Bereich der Veterinärmedizin hinsichtlich der Induzierung eines ausreichenden Schutzes mit nicht vermehrungsfähigem Antigen noch große Probleme auf, deren Lösung nicht zuletzt auch von dem Zusatz eines potenten Adjuvans abhängen dürfte.

Zusammenfassung

Mit einer Äthyläthylenimin-inaktivierten und konzentrierten Aujeszky-Virusvakzine wurden Mäuse i. m., i. n. und per Aerosol vakziniert. Mit allen drei Verabreichungsformen wurde eine unterschiedliche Immunität erzielt. Der Grad der induzierten Immunität und ihre Bestimmung waren abhängig von der Art der Applikation sowohl der Vakzinen als auch des Testinfektionsvirus. Gegenüber einer parenteralen Infektion erwies sich die i. m. Vakzination der i. n. Impfung deutlich überlegen, nach i. n. Testinfektion war die i. n.

durchgeführte Immunisierung aber zumindest der i. m. gleichwertig. Eine Aerosolvakzination mit inaktiviertem *Aujeszky-Virus* induzierte nur mit Adjuvanzzusatz einen signifikanten Schutz, der aber im Vergleich zu den beiden anderen Applikationsarten wesentlich geringer war.

Die i. n. Impfung reduzierte die Vermehrung und Ausbreitung des i. n. applizierten Testinfektionsvirus fast vollständig. Die Vakzination per Aerosol verringerte gegenüber den Kontrollen sowohl die Zahl der Lungen- und Gehirnisolats als auch die Virustiterhöhe in den Lungen.

Neutralisierende Antikörper konnten nur im Serum i. m. und i. n. geimpfter Mäuse, aber nicht nach Aerosolvakzination nachgewiesen werden. In Lungenspülflüssigkeiten und Lungenextrakten wurden in keinem Fall neutralisierende Antikörper gefunden.

Summary

Possibilities of vaccination with inactivated virus via the respiratory tract studied in the Aujeszky virus — white mouse system

Using an ethylethelenimin-inactivated and concentrated Aujeszky disease virus vaccine, mice were vaccinated i. m., i. n. and by aerosol. A different immunity resulted from all three routes. The grade of immunity induced and its disposition depended both on the method of application of the vaccine and of the challenge virus. Against parenteral challenge i. m. vaccination was superior to i. n. vaccination. Using i. n. challenge i. n. vaccination was at least as good as i. m. vaccination. Aerosol vaccination with inactivated virus gave significant protection only when adjuvant was included and was in any case less effective than the other two methods of vaccination.

I. n. vaccination reduced the spread and multiplication of the i. n. challenge dose almost completely. Aerosol vaccination reduced the number of lung and brain isolations and also the lung virus titres compared with the controls.

Neutralizing antibodies could be found only in the sera of mice vaccinated i. m. and i. n. and not in mice vaccinated with aerosol. In lung washings and extracts no evidence of neutralizing antibodies was found on any occasion.

Résumé

Possibilité d'une vaccination par voie aéro-gène avec un virus inactivé de la maladie d'Aujeszky chez la souris blanche

Des souris ont été vaccinées par voies i. m., i. n. et par aérosols avec un vaccin du virus d'Aujeszky concentré et inactivé à l'éthyléthylénimine. Une immunité différente fut obtenue avec les trois formes d'application. Le degré d'immunité induite et sa détermination ont dépendu du mode d'application, des vaccins et du virus de l'infection-test. La vaccination i. m. fut supérieure à l'i. n. par rapport à une infection parentérale; l'immunisation i. n. faite après une infection-test i. n. fut égale à l'i. m. La vaccination par aérosols avec un virus d'Aujeszky inactivé n'a donné une protection qu'avec l'addition d'un adjuvant et fut moins efficace que les deux autres méthodes.

La vaccination i. n. diminue presque complètement la multiplication et l'extension du virus appliqué dans l'infection-test. La vaccination par aérosols diminua le nombre des isolations à partir des poumons et du cerveau ainsi que la hauteur du titre viral dans les poumons par rapport aux témoins. Des anticorps neutralisants n'ont été trouvés que chez des souris vaccinées i. m. et i. n.

et non chez celles vaccinées par aérosols. On n'a absolument pas trouvé d'anticorps neutralisants dans des lavages de poumons et des extraits de poumons.

Resumen

Posibilidades de vacunación con virus inactivado a través del tracto respiratorio estudiadas en el sistema virus de Aujeszky-ratón blanco

Se vacunaron ratones blancos por las vías im., in. y con aerosoles mediante una virusvacuna de Aujeszky inactivada con etiletilenimina y concentrada. Con todas las tres formas de administración se logró una inmunidad diferente. El grado de inmunidad inducida y su valuación dependían del tipo de aplicación, tanto de las vacunas como del virus de infección de prueba. Frente a la infección parenteral se reveló la vacunación im. muy superior a la vacunación in., pero tras la infección in. de prueba era la inmunización lograda por vía in. equivalente al menos a la im. La vacunación aerosólica con virus inactivado de Aujeszky inducía solo con adición de adyuvante una protección significativa, la cual, sin embargo, era bastante inferior en comparación con los otros tipos de aplicación.

La vacunación in. reducía así por completo la multiplicación y difusión del virus de infección de prueba aplicado por vía in. La vacunación por medio de aerosoles disminuía frente a los testigos tanto el número de aislamientos en pulmones y cerebros como el nivel de los títulos virósicos pulmonares.

Solo se pudieron identificar anticuerpos neutralizantes en el suero sanguíneo de ratones vacunados por las vías im. e in., ya que no tras vacunación aerosólica. En los líquidos de lavado pulmonar y en extractos pulmonares no se hallaron en ningún caso anticuerpos neutralizantes.

Literaturverzeichnis

1. ACKERMANN, O., 1966: Bessere Immunisierungsmöglichkeiten bei Nerzen gegen Staupe. Dtsch. tierärztl. Wschr. 73, 11.
2. ALENKO, B. M., und J. A. BRAZNIKOV, 1970: Erfahrungen mit der Aerosol-Vakzination von Kühen gegen die Pseudopest (dtsh. Übers.). Veterinarija 6, 52.
3. CORIA, M. F., 1973: Protective effect of an inactivated avian coronavirus vaccine administered by aerosol. Arch. ges. Virusforsch. 41, 66.
4. CORIA, M. F., and M. S. HOFSTAD, 1971: Immune response in chickens to infectious bronchitis virus, strain 33. I. Response to beta-propiolactone-inactivated virus. Avian Dis. 15, 688.
5. DORN, P., H. WIEDEMANN und E. WESSLING, 1973: Untersuchungen zur Spray-Vakzination gegen die Newcastle-Krankheit. Tierärztl. Praxis 1, 423.
6. FAZEKAS DE ST. GROTH, S., and M. DONNELLEY, 1950: Studies in experimental immunology of influenza: IV. The protective value of active immunization. Aust. J. exp. Biol. med. Sc. 28, 61.
7. GUYTON, A. C., 1947: Measurement of the respiratory volumes of laboratory animals. Amer. J. Physiol. 150, 70.
8. HENDERSON, D. W., 1952: An apparatus for the study of air-borne infection. J. Hyg. 50, 53.
9. KÄRBER, G., 1931: Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 162, 480.
10. KASEL, J. A., E. B. HUME, R. V. FULK, Y. TOGO, M. HUBER and R. B. HORNICK, 1969: Antibody responses in nasal secretions and serum of elderly persons following local or parenteral administration of inactivated influenza virus vaccine. J. Immunol. 102, 555.
11. KASS, E. H., G. M. GREEN and E. GOLDSTEIN, 1966: Mechanisms of antibacterial action in the respiratory system. Bact. Rev. 30, 488.
12. KULL, K.-E., T. SVENSSON und O. ACKERMANN, 1970: Immuniseringsförsök med aerosol-vaccin mot valpsjuka hos mink i Sverige. Nordisk Vet.-Med. 22, 13.
13. LORENZ, R. J., 1960: Tabellen zur näherungsweisen Bestimmung von Infektiositäts- und Neutralisationstiteren sowie der zugehörigen mittleren Fehler nach dem Verfahren von KÄRBER (1931), unveröffentlicht.

14. PERKINS, J. C., D. N. TUCKER, H. L. S. KNOFF, R. P. WENZEL, R. B. HORNICK, A. Z. KAPKIAN, and R. M. CHANOCK, 1969: Evidence for protective effect of an inactivated rhinovirus vaccine administered by the nasal route. *Amer. J. Epid.* **90**, 319.
15. RILEY, V., 1960: Adaption of orbital bleeding technic to rapid serial blood studies. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, **104**, 751.
16. RYLANDER, R., 1966: Measurement of different mechanisms for elimination of bacteria from the lung. *Bact. Rev.* **30**, 514.
17. SCHÜTZLER, H., und W. DOCKHORN, 1972: Untersuchung zur aerogenen Hyperimmunisierung und aerogenen Hyperimmunserumbehandlung von Tieren. 1. Mitteilung: Versuche an Pferden zur aerogenen Hyperimmunisierung mit Tetanusantigen und zur aerogenen Behandlung mit Tetanus-Hyperimmunserum. *Arch. exp. Vet.-Med.* **26**, 11.
18. SCHULZE-REHM, G., G. MONREAL and V. KRAFT, 1974: Versuche zur Sprayimmunisierung gegen die Newcastle Krankheit. *Zbl. Vet. Med. B*, **21**, 489.
19. SCHWÖBEL, W., und V. SIEDENTOPF, 1961: Charakterisierung eines drei Jahre alten Zellstammes aus der Schweineinere und Untersuchungen über sein Verhalten gegenüber dem Virus der Maul- und Klauenseuche. *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.* **181**, 3.
20. SKODA, R., und G. WITTMANN, 1973: Die Immunisierung von Schweinen mit Vakzinen aus inaktiviertem Aujeszky-Virus. *Zbl. Vet. Med. B*, **20**, 127.
21. WAGNER, R. R., 1956: Studies on the pathogenesis of influenzal pneumonitis. Intranasal vs. intravenous infection of mice. *Yale J. Biol. Med.* **28**, 598.
22. WALDMAN, R. H., J. J. MANN and P. A. SMALL, 1969: Immunization against influenza: Prevention of illness in man by aerosolized inactivated vaccine. *J. Amer. med. Ass.* **207**, 520.
23. WALDMAN, R. H., S. H. WOOD, E. J. TORRES and P. A. SMALL, 1970: Influenza antibody response following aerosol administration of inactivated virus. *Amer. J. Epidem.* **91**, 575.
24. WALDMAN, R. H., P. F. JURGENSEN, G. N. OLSEN, R. GANGULY and J. E. JOHNSON, 1973: Immune response of the human respiratory tract. I. Immunoglobuline levels and influenza virus vaccine antibody response. *J. Immunol.* **111**, 38.
25. WORTH, G., und E. SCHILLER, 1951: Die Filterfähigkeit der Tiernase im Staubinhalationsversuch. *Arbeitsphysiol.* **14**, 407.
26. ZAKAY-RONES, Z., R. LEVY and G. SPIRA, 1971: Local immunological response to immunization with inactivated Newcastle disease virus. *J. Immunol.* **107**, 1180.

Anschrift der Verfasser: Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Postfach 1149, 7400 Tübingen.