

Bestimmung neutralisierender Antikörper gegen *Pasteurella multocida* Toxin im ELISA und im Zellkultur-Neutralisationstest

Volker Öppling, Manuela Kusch, Petra Rübmann und Klaus Cußler

Paul-Ehrlich-Institut, Abteilung Veterinärmedizin, D-Langen

Zusammenfassung

Das *Pasteurella multocida* Toxoid ist das wichtigste Antigen in Impfstoffen gegen die atrophische Rhinitis (AR) des Schweines. Ein Serum-Neutralisationstest auf embryonalen bovinen Lungenzellen (EBL-SNT) und ein modifizierter, kommerziell erhältlicher ELISA (DAKO-ELISA) erlauben einen sensitiven und gut reproduzierbaren Nachweis von Antikörpern gegen das *Pasteurella multocida* Toxin. Die beiden Methoden erbringen bei Prüfung von Schweine- und Meerschweinchen Serum gut miteinander korrelierende Ergebnisse. Insgesamt dreißig Chargen von zehn verschiedenen *Pasteurella multocida* Toxoid (PMTd) haltigen Impfstoffen wurden durch zweimalige subkutane Immunisierung von Meerschweinchen mit einer fünftel Schweinedosis im Abstand von drei Wochen geprüft. Drei Wochen nach der Zweitimmunisierung waren bei 25 Chargen Titer gegen *Pasteurella multocida* Toxin nachzuweisen, die mindestens um zwei log₂-Stufen höher als ein stets mitgeführtes Referenzserum lagen. Bei fünf von sechs Chargen eines Impfstoffes konnte keine Bildung von Antikörpern gegen *Pasteurella multocida* Toxin nachgewiesen werden. Die Prüfung zweier negativer und der positiven Charge dieses Impfstoffes nach zweimaliger Immunisierung von Schweinen gemäß den Vorgaben des Herstellers erbrachte, verglichen mit der Prüfung im Meerschweinchen, völlig übereinstimmende Ergebnisse.

Die verabreichten Impfstoffmengen führten bei keiner Prüfung zu einer sichtbaren Störung des Allgemeinbefindens der Meerschweinchen. Mit dieser Methode steht ein versuchstierschonendes Modell zur Beurteilung der Wertigkeit der PMTd-Komponente von Impfstoffen gegen die AR des Schweines im Rahmen der staatlichen Chargenprüfung zur Verfügung.

Einleitung

Die atrophische Rhinitis (AR), eine weltweit auftretende Erkrankung der oberen Atemwege des Schweines, wird in der Regel durch bakterielle

Mischinfektionen mit *Bordetella* (B.) *bronchiseptica* und *Pasteurella* (P.) *multocida* hervorgerufen. Toxinbildende *P. multocida* spielen als Krankheitsverursacher eine entscheidende Rolle. Es wurde gezeigt, daß

Summary: Detection of antibodies against Pasteurella multocida toxin with a cell culture method and an enzyme immunoassay.

Pasteurella multocida toxoid is the most important antigen in vaccines against progressive atrophic rhinitis in pigs. Testing antibodies against *Pasteurella multocida* toxin in a cell culture neutralization assay on embryonic bovine lung cells and a modified, commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (DAKO, Denmark) is sensitive and gives good reproducible results. Determination of antitoxin antibodies in swine and guinea pigs simultaneously in both methods resulted in good coefficients of correlation ($r = 0,88$ and $0,93$). Induction of antibodies to *Pasteurella multocida* toxin by thirty batches of ten toxoid containing vaccines was tested by subcutaneous application of one fifth pigdose (0,4–1 ml) twice in intervals of three weeks. The animals showed neither signs of illness nor significant local or systemic reactions. Three weeks after the second immunization 25 batches induced titres being at least 2 log₂ dilutions higher than a parallel titrated reference serum (mean titre of reference serum was 1:2^{3,26}). Five batches belonging to one vaccine induced no detectable antibodies to the toxin. Additional testing of two negative and one positive batch of this vaccine in the target species by immunizing them twice according to the manufacturers scheme, gave identical results. Therefore it is concluded that immunization of guinea pigs and determination of humoral immune response in vitro, is a potent and ethical justifiable method to judge the quality of the *Pasteurella multocida* toxoid component of vaccines against progressive atrophic rhinitis in pigs.

Keywords: Rhinitis atrophicans, pig, vaccine, potency testing, antibody, ELISA, guinea pig, cell culture neutralization assay

nach Vorschädigung der Nasenschleimhäute mit verdünnter Essigsäure toxinbildende *P. multocida* allein in der Lage sind, die Erkrankung auszulösen (Pedersen und Elling, 1984; Chanter und Rutter, 1990).

Heute wird *P. multocida* Toxin (PMT), ein von *P. multocida* gebildetes Protein, als wesentliches ätiologisches Agens angesehen. Durch parenterale Applikation von hochgereinigtem PMT konnten Dominick und Rimler (1986) das klinische Bild der AR induzieren.

Um andere, in der Regel nur mit vorübergehenden Schäden einhergehende atrophische Rhinitiden von diesem Krankheitsbild besser abgrenzen zu können, führten Pedersen et al. (1988) den Begriff der progressiven atrophischen Rhinitis (PAR) für das durch toxinbildende *P. multocida* verursachte Krankheitsbild ein.

Bei der Bekämpfung der PAR hat die Immunprophylaxe eine große Bedeutung. Jährlich werden in Deutschland über 3 Millionen Impfstoffdosen zur Vermarktung freigegeben.

Pasteurella multocida Toxoid (PMTd), welches meist durch Formalinaktivierung des PMT gewonnen wird, stellt den wichtigsten Bestandteil dieser Impfstoffe dar. Foged et al. (1989) sowie Nielsen et al. (1991) zeigten, daß für die Herstellung gut wirksamer Impfstoffe hochgereinigtes PMTd, bzw. ein rekombinantes PMT-Derivat, als Antigen ausreicht.

Für die Freigabe von Impfstoffen im Rahmen der amtlichen Chargenprüfung muß jeder Hersteller die Wirksamkeit der PMTd-Komponente nachweisen. Da für die Wirksamkeitsprüfung von AR-Impfstoffen keine bindende Vorschrift etwa in Form einer Arzneibuchmonographie existiert, sind die Hersteller gezwungen, entsprechende Methoden im Rahmen der Zulassung selbst zu erarbeiten. Derzeit finden eine Vielzahl von Methoden hierfür Anwendung. Sie bestehen grundsätzlich aus zwei Teilen. Im ersten werden Tiere mit dem zu prüfenden Impfstoff immunisiert, im zweiten wird der Immunstatus dieser Tiere bewertet. Als Versuchstiere werden je nach Impfstoffhersteller Schweine, Kaninchen, Meerschweinchen oder Mäuse eingesetzt. Für die Bestimmung des

Immunstatus werden *in vitro* (Bestimmung von Antikörpern gegen PMT in verschiedenen Zellkulturen bzw. ELISAs), z.T. aber auch noch *in vivo* Methoden (Belastung immunisierter und nicht immunisierter Tiere mit letalen Toxindosen) eingesetzt.

Aufgrund der komplexen Zusammensetzung von Impfstoffen reicht die Bestimmung der Antigenmenge für die Beurteilung ihrer Wirksamkeit nicht aus. Auf Tierversuche kann daher nicht völlig verzichtet werden. Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es daher, eine auf alle Impfstoffe anwendbare, für die Impflinge wenig belastende Methode zur Wirksamkeitsprüfung von AR-Impfstoffen zu erarbeiten. Die hierfür erforderlichen Referenzmaterialien sollten in ausreichender Menge hergestellt werden. Zudem sollten Daten erstellt werden, die eine Festlegung von Mindestanforderungen an die zu prüfenden Produkte erlauben. Dies sollte die Möglichkeit eröffnen, die mit einer Toxinbelastung verbundenen Tierversuche abzuschießen und ferner Tierversuche zur Erarbeitung von weiteren neuen Methoden durch die Hersteller im Rahmen der Zulassung neuer AR-Impfstoffe überflüssig zu machen.

In Vorversuchen, über die hier nicht berichtet wird, erwies sich das Meerschweinchen als guter Antikörperbildner gegen das PMTd.

Im folgenden wird über die vergleichende Untersuchung eines Serum-Neutralisationstestes auf embryonalen bovinen Lungenzellen (EBL-SNT) (Rutter und Luther 1984; Bechmann und Schöss 1991) mit einem geringfügig modifizierten, kommerziell erhältlichen ELISA (DAKO Diagnostika, Dänemark) berichtet, die beide für den Nachweis von Antikörpern gegen PMT geeignet sind. Die Prüfung einer größeren Anzahl auf dem Markt befindlicher PAR-Impfstoffe sollte als Grundlage für die Festlegung einer Mindestanforderung an die *Pasteurella multocida* Toxoid-Komponente dieser Impfstoffe dienen.

Versuchstiere

Für die Studien wurden 400–600 g schwere SPF-Meerschweinchen (Stamm: Dunkin Hartley; Züchter: Charles River, Sulzfeld, Deutschland) eingesetzt.

Material und Methoden

Impfstoffe

Für die Untersuchungen wurden alle in Deutschland zugelassenen PAR-Impfstoffe eingesetzt. Ferner wurden Impfstoffe während des Zulassungsverfahrens und ein Produkt aus den USA geprüft. Als Negativkontrolle wurde ein aus nicht toxinbildenden *P. multocida* hergestellter Impfstoff (Nr. 11) verwendet.

Zellkulturen

Die embryonale bovine Lungenzelle (EBL) wurde von Dr. Bechmann (Tiergesundheitsamt Oldenburg) in der 94. Passage übernommen. Die Zelle ist mittlerweile von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen in Braunschweig unter der Bezeichnung DSM ACC 192 zu beziehen.

Kultivierung der Zellen

Der Zellsplit wurde 1 × wöchentlich im Verhältnis 1:2 durchgeführt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C ohne CO₂-Begasung in verschlossenen Zellkulturflaschen (Nunc Delta, 80 cm², Nunc) in Eagle's Minimal Essential Medium (MEM, Seromed) mit Earle's Salzen, 2,2 g/l Bicarbonat und Zusatz von 10% foetalem Kälberserum, ohne Zugabe von Glutamin.

Immunisierung der Meerschweinchen

Die Tiere wurden zweimal im Abstand von drei Wochen subkutan mit jeweils einem Fünftel der für Mutter-schweine vorgesehenen Impfstoffdosis, was einer Meerschweinchendosis zwischen 0,4 und 1 ml entspricht, immunisiert. Drei Wochen nach der zweiten Immunisierung wurde den Tieren Serum entnommen und dieses

auf Antikörper gegen PMT untersucht.

Nachweis von Antikörpern gegen PMT mittels permanenter EBL-Zellen (EBL-Serum-Neutralisationstest [SNT])

Die zuvor 30 min. bei 56°C inaktivierten Serumproben wurden in einer 96er-Gewebekulturplatte (Nunc) mit Kulturmedium (Eagle's MEM mit Earle's Salzen, 2,2 g/l Bicarbonat, 10% FKS, 50 µg/ml Gentamycin) vorverdünnt (Volumen: 50 µl). Zu den Serumverdünnungen wurden jeweils 50 µl einer festgelegten Toxinverdünnung (vier EBL-zytotoxische Einheiten) in Kulturmedium pipettiert und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden je Näpfchen 50 µl einer EBL-Zellsuspension ($2,5 \times 10^5$ Zellen/ml Kulturmedium) zugegeben und die Gewebekulturplatte sieben Tage bei 37°C, 5% CO₂ und 80% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Vorhandene Antikörper gegen PMT neutralisieren dessen zytotoxische Wirkung, die Zellen bilden einen dichten Rasen. Bei Anwesenheit von nicht neutralisiertem Toxin zeigen die Zellen gehemmtes Wachstum, und es kommt zu Anhäufungen aus abgekugelten Zellen mit mehreren Ausläufern, so daß eine netzartige Struktur entsteht. Der Titer eines Serums entspricht der letzten Verdünnung, bei der noch eine Neutralisation der Toxinwirkung festgestellt werden kann. Zur Kontrolle der Zytotoxigenität des Prüftoxins wurde auf jeder Platte eine Toxintitration beginnend mit vier EBL-zytotoxischen Einheiten mitgeführt. Der Titer des Referenzserums aPMT1 wurde ebenfalls auf jeder Platte bestimmt.

Nachweis von Antikörpern gegen PMT mittels ELISA

Der Nachweis von Antikörpern gegen PMT im Serum geimpfter Tiere wurde mit dem DAKO PMT ELISA (K 009) und dem Zusatzkit für die PMT-Serologie (K 038) unter Modifikation der Toxinmenge, ansonsten

jedoch nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Von den zu testenden Proben wurden zunächst 60 µl mit je 40 µl einer festgelegten Menge Toxin 30 min. bei 37°C in einer 96er-Mikrotiterplatte vorinkubiert. Als Toxin wurde PMT aus dem Zusatzkit bzw. eine eigene, in *aqua dest.* verdünnte Toxinpräparation verwendet. Letztere entsprach der vierfachen, der nach der Testdefinition gerade noch als positiv zu bewertenden Menge. Zu 50 µl dieses Gemisches wurden 50 µl Peroxidase-markierte, gegen PMT gerichtete Kaninchenantikörper gegeben, die zuvor in die mit monoklonalen Antikörpern gegen PMT beschichteten Mikrotiterplatten vorgelegt wurden. Nach 45-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Schüttler wurden die Vertiefungen 4 mal mit *aqua dest.* gewaschen und anschließend je 100 µl chromogenes Substrat (OPD, H₂O₂) zugegeben. Die Reaktion wurde nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln mit 100 µl 0,85 M H₂SO₄ gestoppt und photometrisch ausgewertet (Wellenlänge 492 nm/Referenz 650 nm). Anhand des Extinktionsmittelwertes der mitlaufenden Toxinkontrolle wurde der *Cut-off* (= Mittelwert dividiert durch zwei) bestimmt. Bei Extinktionswerten der Proben unterhalb des *Cut-offs* konnte von einer Hemmung der Bindung des Toxins an die auf der Mikrotiterplatte gekoppelten monoklonalen Antikörper gegen PMT ausgegangen werden. Die Berechnung des Titers erfolgte gemäß den Vorgaben des Herstellers.

Herstellung eines *Pasteurella multocida* Rohtoxins

Ein toxinbildender *P. multocida* Stamm (Bezeichnung: 1994), den Prof. Schimmel (BGA, Bereich Jena) freundlicherweise zur Verfügung stellte, wurde 15 h bei 37°C in Hirn-Herz-Bouillon angezüchtet. Die Bakterien wurden durch Zentrifugieren bei 6.500 g und anschließendem Waschen mit PBS gewonnen. Die Bakterien-Feuchtmasse wurde zu-

nächst bei -80°C tiefgefroren und nach dem Auftauen in Aliquots zu 5 ml im Eisbad beschallt (Sonopuls HD 60, Bandelin electronic, Berlin, 10 min., max. Leistung, Zyklus 30%). Danach wurde der Gesamtansatz nochmals für 15 min. unter gleichen Bedingungen beschallt.

Der durch Ultrazentrifugation (30.000 g, 4°C, 1 h) gewonnene Überstand, wurde über einen 0,22 µm-Filter steril filtriert, mit PBS auf 100 ml aufgefüllt und zu je 1 ml in Rollrandflaschen portioniert. Nach 24-stündiger Gefriertrocknung wurden die Behältnisse mit Gummistopfen verschlossen und mit Aluminiumbördelkappen versehen. Die Lagerung erfolgte bei +4 bis +8°C.

Herstellung eines anti *Pasteurella multocida* Toxin Referenzserums (aPMT 1)

Zwei Schweine mit einem Körpergewicht zwischen 70 und 80 kg wurden mit einem Impfstoff einmalig i.m. immunisiert und nach sechs Wochen geblutet. Der sterilfiltrierte (0,22 µm) und hitzeinaktivierte (56°C, 30 min) Serumpool wurde in Portionen zu 1 ml in 5 ml-Rollrandflaschen abgefüllt, tiefgefroren und über 24 h gefriergetrocknet. Die anschließend mit Gummistopfen und Aluminiumbördelkappen verschlossenen Behältnisse wurden bei +4 bis +8°C gelagert.

Ergebnisse

Methoden, die im Rahmen der Wirksamkeitsprüfung von Impfstoffen eingesetzt werden, müssen ausreichend zuverlässige Resultate erbringen. Die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen sowohl im ELISA als auch im Zellkultur-Neutralisationstest ist aus der Tabelle zu ersehen. In dieser Tabelle sind die Titer von Wiederholungsbestimmungen des bei allen Tests mitgeführten Referenzserums (aPMT1) zusammengefaßt. Die Ergebnisse im ELISA wurden an unterschiedlichen Tagen mit zwei verschiedenen Herstellerchargen des ELISA-Kits ermittelt.

Tabelle: Reproduzierbarkeit der Ergebnisse im Zellkultur-Neutralisationstest (EBL-SNT) und im DAKO-ELISA

Methode	Anzahl der Bestimmungen (n)	höchster Titer ($\log_2^{-1}$)	niedrigster Titer ($\log_2^{-1}$)	mittlerer Titer ($\log_2^{-1}$)	Standardabweichung	Variationskoeffizient (%)
DAKO-ELISA	8	4,88	4,25	4,47	0,26	5,8
EBL-SNT	313	4	2	3,26	0,47	14,25

Ergebnisse von Wiederholungsbestimmungen des anti *Pasteurella multocida* Toxin Titers eines Referenzserums vom Schwein (aPMT1). Vergleich eines modifizierten kommerziellen ELISAs (DAKO, Dänemark) mit einem Neutralisationstest auf embryonalen bovinen Lungenzellen.

Einzelresultate in der Zellkultur wurden auf verschiedenen Gewebekulturplatten ermittelt, wobei bis zu sieben Mikrotiterplatten parallel an einem Tag angesetzt wurden.

Wie an den jeweils mittleren Titern des Serums zu erkennen ist, erwies sich der ELISA, verglichen mit dem Zellkulturtest für die Bestimmung des anti *Pasteurella multocida* Toxin Titers bei diesem vom Schwein stammenden Referenzserum als geringfügig sensitiver. Auf EBL-Zellen schwankte der Titer zwischen $1:2^3$ und $1:2^4$, wobei der niedrige Titer nur bei einer der 313 Wiederholungsbestimmungen auftrat. Auffällig war, daß der Titer im Laufe eines Jahres von anfänglich $1:2^3$ auf später $1:2^4$ anstieg. Ein Einfluß der Zellkulturpassage kann als Ursache ausgeschlossen werden, da zwischendurch auf Zellen niedri-

gerer Passagezahl gewechselt wurde, ohne daß dies einen Einfluß auf das Ergebnis ausübte (in den Untersuchungen wurden EBL-Zellen zwischen der 100.-135. Kulturpassage verwendet). Der inter-assay Variationskoeffizient liegt beim EBL-SNT mit 14,25% höher als beim ELISA, dessen inter-assay Variationskoeffizient ein Schwanken der Standardabweichung um den Mittelwert von lediglich 5,8% anzeigt.

In Abbildung 1 ist die Korrelation von Ergebnissen nach Titerbestimmung mittels DAKO-ELISA und EBL-SNT dargestellt. Sowohl für Meerschweinchen- als auch für Schweineseren liegen die Datenpunkte eng um die eingezeichnete Regressionsgerade. Der ermittelte Korrelationskoeffizient (r) liegt für Meerschweinchen bei 0,88 und für Schweineseren bei 0,93.

In Abbildung 2 ist die Fähigkeit verschiedener Impfstoffe zur Induktion von Antikörpern gegen PMT nach Verabreichung an Meerschweinchen dargestellt. Ein Balken entspricht dem mittleren Titer einer Charge bei Prüfung in drei bis fünf Tieren. Der Variationskoeffizient bei Tieren innerhalb einer einheitlich behandelten Gruppe lag zwischen 5 und 30%. Bei der Immunisierung mit Impfstoff 1 konnte bei zwei Prüfgruppen (Chargen) jeweils ein Tier beobachtet werden, welches auch nach zweimaliger Immunisierung keine Titer gegen PMT ausbildete.

Der mittlere Titer von ($1:2^{3,26}$) des stets mitgeführten Referenzserums aPMT1 ist als waagerechter Balken eingezeichnet. Mit Ausnahme von Impfstoff Nr. 4 waren alle PAR-Impfstoffe in der Lage einen Titer von mindestens $1:2^{5,26}$ (zwei $\log_2$ -Stufen über dem Titer des Referenzserums aPMT1), in der Abbildung als grau unterlegter Bereich gekennzeichnet, zu induzieren.

Bei Impfstoff 4 konnte nur eine von sechs geprüften Chargen im Meerschweinchen nachweisbare Titer gegen PMT erzeugen. Die einzige positive Charge erreichte den oben genannten Grenzwert. Die bei Prüfung im Meerschweinchen positive, sowie zwei negative Chargen dieses Impfstoffes wurden zusätzlich im Schwein durch Immunisierung gemäß den Vorgaben des Herstellers geprüft. Zwei bis sechs Wochen nach der Zweitimmunisierung konnten nur bei der Charge, die im Meerschweinchen eine meßbare Immunantwort bewirkte, auch im Schwein Antikörper gegen PMT nachgewiesen werden. Beide, bei der Prüfung im Meerschweinchen negativen Chargen waren auch im

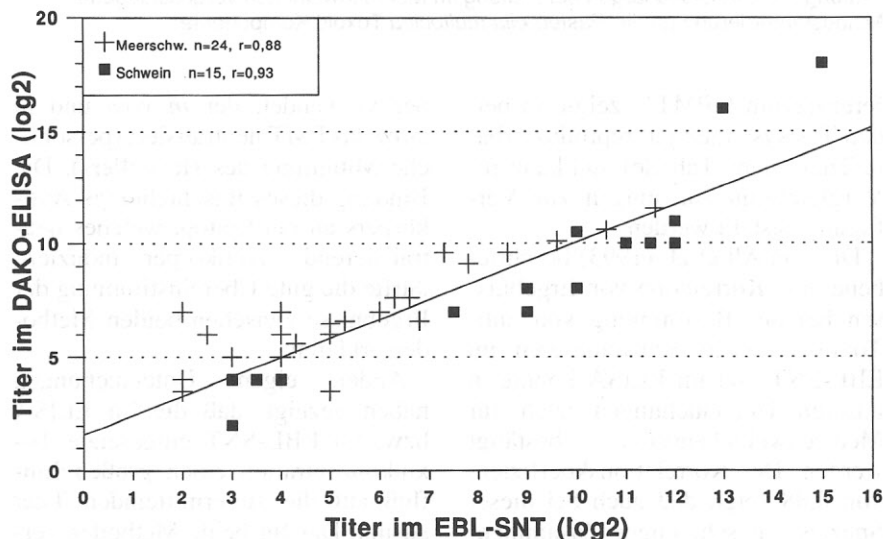


Abbildung 1: Korrelation der anti *Pasteurella multocida* Toxin Titer zwischen Zellkultur-Neutralisationstest (EBL-SNT) und DAKO-ELISA. Ein Datenpunkt entspricht einem Serum, dessen anti *Pasteurella multocida* Toxin Titer sowohl im modifizierten ELISA (DAKO, Dänemark) als auch im Zellkulturtest auf embryonalen bovinen Lungenzellen ermittelt wurde. Die Regressionsgerade wurde unter Einbezug aller Datenpunkte errechnet. n: Anzahl untersuchter Seren, r: Korrelationskoeffizient.

Schwein nicht in der Lage, nachweisbare Titer zu induzieren.

Diskussion

Methoden zur Qualitätskontrolle von Impfstoffen müssen zuverlässige Resultate liefern. Sowohl EBL-SNT als auch ELISA erbringen gut reproduzierbare Ergebnisse. Nach Tijssen (1985) ist ein *inter-assay* Variationskoeffizient von weniger als 10% für einen ELISA ausreichend. In Wiederholungsbestimmungen mit dem ELISA konnte dieser Wert deutlich unterschritten werden. Ein *inter-assay* Variationskoeffizient von 14,25% im Zellkultur-Neutralisationstest kann für ein solches biologisches System mit rein visueller Auswertung ebenfalls als ausreichend angesehen werden.

Im Gegensatz zu unseren Untersuchungen weisen Alt et al. (1993) dem EBL-SNT gegenüber dem ELISA für die Bestimmung der anti-PMT-Titer in Schweineseren eine höhere Sensitivität zu. Maßgebend für diese differierenden Beobachtungen dürften unterschiedliche Bewertungen des Grades zytopathischer Veränderungen bei der visuellen Auswertung durch verschiedene Untersucher sein. Obwohl immer von derselben Person ausgewertet wurde, konnte in unseren Untersuchungen im Laufe eines Jahres ein um etwa eine log₂-Verdünnungsstufe ansteigender Titer des stets mitgeführten Referenzserums beobachtet werden. Auch dies dürfte auf die doch subjektive visuelle Auswertung des Zellkulturtestes zurückzuführen sein. Um quantitative Schwankungen innerhalb und zwischen verschiedenen Laboratorien möglichst gut auszugleichen, sollte daher die Bewertung von Prüfseren im Rahmen der Qualitätskontrolle von Impfstoffen grundsätzlich nur in Relation zu einem Referenzserum erfolgen. Auch im ELISA sollte trotz der objektiven photometrischen Auswertung nicht auf den Vergleich zu einem Referenzserum verzichtet werden. Das im Paul-Ehrlich-Institut hergestellte Re-

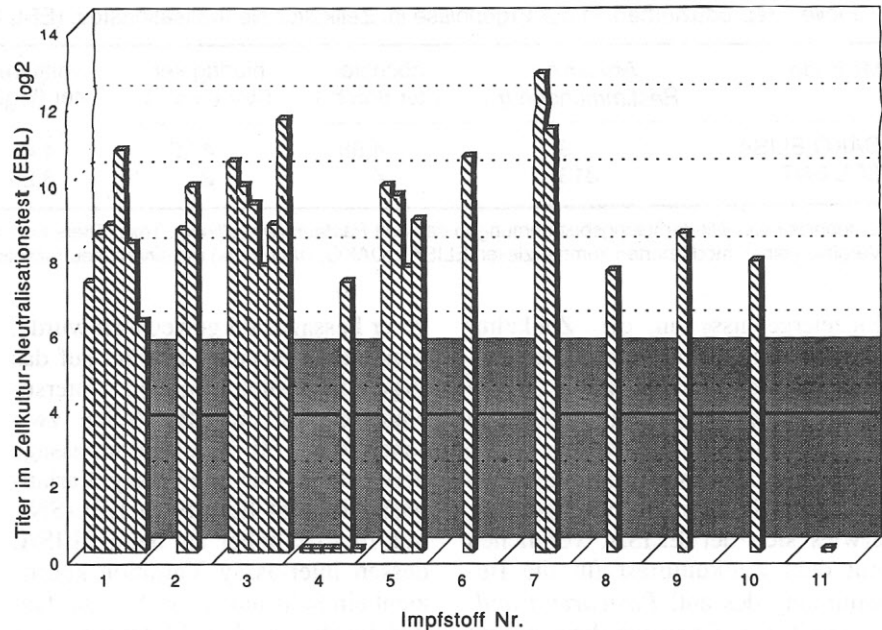


Abbildung 2: Bildung *Pasteurella multocida* Toxin neutralisierender Antikörper im Meerschweinchen nach zweimaliger Applikation einer fünftel Schweinedosis. Vergleichende Untersuchung verschiedener inaktivierter Impfstoffe gegen die progressive atrophische Rhinitis des Schweines hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Induktion von Antikörpern gegen *Pasteurella multocida* Toxin im Meerschweinchen. Impfstoffe 1 bis 10 enthalten gemäß den Vorgaben der Hersteller *Pasteurella multocida* Toxoid, Impfstoff 11 einen nicht toxinbildenden *Pasteurella multocida* Stamm. Ein Balken stellt den mittleren Titer einer Impfstoffcharge bei Prüfung in drei bis fünf Meerschweinchen dar. 400-600 g schwere SPF-Tiere wurden zweimal im Abstand von drei Wochen mit einem Fünftel der für Mutterschweine vorgesehenen Dosis immunisiert. Die Bewertung der Titer erfolgte drei Wochen nach der Zweitimmunisierung im Zellkulturneutralisationstest auf embryonalen bovinen Lungenzellen. Der horizontale Balken zeigt den mittleren Titer des stets mitgeführten Referenzserums aPMT1 an. Der grau unterlegte Bereich kennzeichnet die im Rahmen der staatlichen Prüfung von Impfstoffchargen bei Prüfung im Meerschweinchen vorgeschlagene Mindestanforderung an die *Pasteurella multocida* Toxoid Komponente.

ferenzserum (aPMT1) zeigte in beiden Testsystemen gut reproduzierbare Titer (siehe Tabelle) und kann für Vergleichsuntersuchungen zur Verfügung gestellt werden.

Die von Alt et al. (1993) beschriebene gute Korrelation von Ergebnissen bei der Bestimmung von anti-Toxin-Titern in Schweineseren im EBL-SNT und im ELISA konnte in unseren Untersuchungen auch für Meerschweinchenseren bestätigt werden. Der Korrelationskoeffizient von 0,88 zeigt, daß auch bei dieser Spezies ein sehr enger Zusammenhang zwischen toxinneutralisierenden (Zellkultur) und toxinbindenden (ELISA) Antikörpern besteht. Für die Beschichtung der Mikrotiterplatten wird ein von Foged (1988) beschriebener monoklonaler Antikör-

per verwendet, der *in vivo* und *in vitro* das PMT neutralisiert (persönliche Mitteilung des Herstellers). Die Bindung dieses Beschichtungs-Antikörpers an ein Epitop, welches neutralisierende Antikörper induziert, dürfte die gute Übereinstimmung der Ergebnisse zwischen beiden Methoden erklären.

Andere eigene Untersuchungen haben gezeigt, daß die im ELISA bzw. im EBL-SNT eingesetzte Toxinkonzentration einen großen Einfluß auf die zu ermittelnden Titer ausübt. Das für beide Methoden verwendete Referenz-Rohtoxin behielt seine EBL-zytopathische Wirkung bei Lagertemperaturen von +4 bis +8°C im lyophilisierten Zustand über mindestens 18 Monate und nach Resuspension und anschließender

Lagerung bei gleicher Temperatur über mindestens 35 Wochen bei (Öppling et al. 1994). Die Verwendung eines Referenzserums zum einen und die hohe biologische Stabilität des PMT-Rohtoxins zum anderen ermöglichen es, diesbezüglich bedingte Fehler auf ein Minimum zu reduzieren.

Beide Testsysteme erlauben einen sensitiven, miteinander korrelierenden und gut reproduzierbaren Nachweis von Antikörpern gegen das PMT in Schweine- und Meerschweinchen. Trotz der einfacheren Handhabung des ELISA ist für die Wirksamkeitsprüfung der PMTd-Komponente von PAR-Impfstoffen derzeit der EBL-SNT vorzuziehen, da alle zur Durchführung des EBL-SNTs erforderlichen Materialien frei zugänglich sind. Eine auf dem ELISA basierende Prüfung wäre hingegen stets von den kommerziellen, patentrechtlichen bzw. vertriebstechnischen Interessen des Herstellers abhängig.

Nach zweimaliger Applikation einer fünftel Schweinedosis waren alle geprüften PAR-Impfstoffe, mit Ausnahme des Impfstoffes 4, in der Lage, im Meerschweinchen einen um zwei log₂-Stufen höheren Titer als das Referenzserum aPMT1 zu induzieren. Ein als Negativkontrolle mitgeführter, nicht für die Indikation PAR zugelassener Impfstoff, der nur nicht toxischbildende *Pasteurella multocida* enthielt, induzierte erwartungsgemäß keine Antikörper gegen das PMT. Über die Wirksamkeit der Chargen, die sowohl im Schwein als auch im Meerschweinchen keinen nachweisbaren Titer erbrachten, kann bislang keine Aussage getroffen werden, da derartig aufwendige Versuche nur von Chargen, die im Rahmen von Zulassungsverfahren geprüft werden, vorliegen. Für Impfstoff 4 müssen daher neue klinische Untersuchungen über die Wirksamkeit der PMTd-Komponente des Impfstoffes angefordert werden.

Alle anderen überschritten den vorgeschlagenen Mindesttiter. Für diese Impfstoffe liegen aussagekräftige klinische Untersuchungen über

deren Wirksamkeit im Schwein vor. Ohne den tatsächlich protektiven Titer genau zu kennen, sollte daher der von den als wirksam eingestuften Impfstoffen erreichte Titer als Grenzwert für die Beurteilung der PMTd-Komponente von PAR-Impfstoffen herangezogen werden. Die Übereinstimmung der Ergebnisse bei paralleler Prüfung von drei Chargen des Impfstoffes 4 in Schwein und Meerschweinchen zeigt, daß die Resultate vom Labortier auf das Zieltier qualitativ übertragbar sind. Für den Nachweis einer quantitativen Korrelation sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Die vorgestellte Methode ist für die Bewertung der PMTd-Komponente von PAR-Impfstoffen geeignet und ermöglicht es, Impfstoffe niedriger von solchen höherer Wirkung zu unterscheiden. Der tierexperimentelle Teil besteht nur noch aus der zweimaligen subkutanen Verabreichung von geringen Volumina (0,4–1 ml) des Prüfimpfstoffes an Tiere mit mehr als 400 g Körpergewicht und einer Blutentnahme. Die Belastung ist damit gering. Eine Applikation von Toxin oder Bakterienkultur ist nicht erforderlich. Im Rahmen unserer Untersuchungen konnte bei keinem der geimpften Tiere eine sichtbare Beeinträchtigung des Wohlbefindens beobachtet werden.

Danksagung

Die Arbeiten wurden mit Unterstützung des Bundesministeriums für Forschung und Technologie durchgeführt.

Literatur

- Alt, M., Bechmann, G. und Schöss, P. (1993). Vergleich von EBL-Zellen und ELISA in der kulturellen und serologischen Diagnostik der Rhinitis atrophicans des Schweines. *Dtsch. tierärztl. Wschr.* 100, 99–102.
- Bechmann, G. und Schöss, P. (1991). Nachweis neutralisierender Antikörper gegen das *Pasteurella multocida*-Toxin bei Schweinen mit Rhinitis atrophicans.

- Dtsch. tierärztl. Wschr.* 98, 310–312.
- Chanter, N. und Rutter, J. M. (1990). Colonisation by *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis of pigs and immunity to the osteolytic toxin. *Vet. Microbiol.* 25, 253–265.
- Deutsches Arzneibuch, 10. Ausgabe (1991). Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag.
- Dominick, M. A. und Rimler, R. B. (1986). Turbinate atrophy in gnotobiotic pigs intranasally inoculated with protein toxin isolated from type D *Pasteurella multocida*. *Am. J. Vet. Res.* 47, 1532–1536.
- Foged, N. T. (1988). Quantitation and Purification of the *Pasteurella multocida* Toxin by using monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 56, 1901–1906.
- Foged, N. T., Nielsen, J. P. und Jorsal, S. E. (1989). Protection against progressive atrophic rhinitis by vaccination with *Pasteurella multocida* toxin purified by monoclonal antibodies. *Vet. Rec.* 125, 7–11.
- Nielsen, J. P., Foged, N. T., Sorensen, V., Barfod, K., Bording, A. und Petersen, S. K. (1991). Vaccination against progressive atrophic rhinitis with a recombinant *Pasteurella multocida* toxin derivative. *Can. J. Vet. Res.* 55, 128–138.
- Öppling, V., Kusch, M., Rübmann, P. und Cußler, K. (1994). Eine serologische Methode zur Wirksamkeitsprüfung von Impfstoffen gegen die Rhinitis atrophicans der Schweine. In H. Schöffl, H. Spielmann und H. A. Tritthart (Hrsg.), *Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen*, 3. Bd. Wien New York: Springer-Verlag. Im Druck.
- Pedersen, K. B. und Elling, F. (1984). Persistent atrophic rhinitis induced by dermonecrotic *Pasteurella multocida*. *Proceeding of the International Pig Veterinary society congress, Genf*, 158.
- Pedersen, K. B., Nielsen, J. P., Foged, N. T., Elling, F., Nielsen, N. C. und Willeberg, P. (1988). Atrophic rhinitis in pigs: proposal of a revised definition. *Vet. Rec.* 122, 190–191.
- Rutter, J. M. und Luther, P. D. (1984). Cell culture assay for toxigenic *Pasteurella multocida* from atrophic rhinitis of pigs. *Vet. Rec.* 114, 393–396.
- Tijssen, P. (1985). Practice and theory of enzyme immunoassays. In R. H. Burdon und P. H. van Knippenberg (Hrsg.), *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology* (419). Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier.

Korrespondenzadresse

Volker Öppling
Paul-Ehrlich-Institut
D-63207 Langen