

26 16

Bibliothek der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München
Königinstr. 10
80539 München
Tel. 089 / 21 80 - 26 72

Tierärztliche Praxis

Zeitschrift für den Tierarzt

Supplement 2, 1987

Schriftleitung

Prof. Dr. Hartwig Bostedt

Ambulatorische und Geburtshilfliche Veterinärklinik der
Universität Gießen
Frankfurter Str. 106, D-6300 Gießen

Prof. Dr. Wilfried Kraft

Vorstand der I. Med. Tierklinik der Universität München
Veterinärstr. 13, D-8000 München 22

Prof. Dr. Ulrike Matis

Chir. Tierklinik der Universität München
Veterinärstr. 13, D-8000 München 22

Prof. Dr. Barbara Mayr-Bibrack

Lehrstuhl für Mikrobiologie und Seuchenlehre der Tier-
ärztlichen Fakultät der Universität München
Bockmeyrstr. 9, D-8000 München 50

Wissenschaftlicher Beirat

Arbeiter, K., Wien
Bogner, H., Grub
Bollwahn, W., Hannover
Dorn, P., Grub
Eikmeier, H., Gießen
Ficus, H. J., Bremen
Forenbacher, S., Zagreb
Gerber, H., Bern
Gründer, H.-D., Gießen
Hollmann, P., Beuerberg
König, H. E., München
Lasch, H. G., Gießen
Lettow, E., Berlin
Oksanen, H. E., Helsinki
Reichenbach-Klinke, H. H., München
Röcken, H., Starnberg
Sandersleben, J. von, München
Schmid, A., München
Schön, L., Kulmbach
Sokolovsky, V., Chicago
Sova, Zd., Prag
Supperer, R., Wien
Zeller, R., Hannover
Zettl, K., Kassel



Schattauer

Stuttgart –
New York 1987

Inhalt – Contents

<i>Mayr, A.</i> Respiratorische Infektionskrankheiten beim Pferd	1
<hr/>	
<i>Coombs, S. L., P. M. Webbon</i> Observations on Tracheal Mucociliary Clearance in Horses	5
<hr/>	
<i>Grabner, A.</i> Diagnose und Therapie der Luftsackmykosen des Pferdes	10
<hr/>	
<i>Breuer, D.</i> Untersuchung und Behandlung der Atemwegserkrankungen des Pferdes in der Praxis	15
<hr/>	
<i>Johnston, A. M.</i> Evaluation and Management of Respiratory Disease in the Horse	21
<hr/>	
<i>Kraft, W., A. Gawlik, A. Grabner, Eva Maria Dämmer</i> Behandlung von chronisch-obstruktiven Lungenerkrankungen	24
<hr/>	
<i>Wittmann, J.</i> Respiratorische und nichtrespiratorische Funktionen der Lunge	33
<hr/>	
<i>Edington, N., C. G. Bridges, S. C. Broad</i> Rapid Diagnosis and Characterization of Equid Herpesvirus 1 Using Monoclonal Antibodies	37
<hr/>	
<i>Eichhorn, W.</i> Zur Differenzierung von Pferdeinfluenzaviren des Subtyps 2 mit monoklonalen Antikörpern	41
<hr/>	
<i>Bridges, C. G., N. Edington</i> The Proteins of Equid Herpesvirus 1 (EHV 1) Recognised by Equine Antisera and their Ability to Promote Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity	47
<hr/>	
<i>Gothe, R.</i> Zur Dictyocaulose der Equiden	50
<hr/>	
<i>Geisel, O., J. v. Sandersleben</i> Pathomorphologie der chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung beim Pferd	52
<hr/>	
Impressum	V

Zur Differenzierung von Pferdeinflenzaviren des Subtyps 2 mit monoklonalen Antikörpern

W. Eichhorn

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München (Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. mult. A. Mayr)

Schlüsselwörter

Pferdeinfluenza – Varianten – monoklonale Antikörper

Zusammenfassung

Zur Differenzierung von Pferdeinflenzaviren des Subtyps 2 mit monoklonalen Antikörpern

Infektion und klinische Erkrankungen mit Pferdeinflenzaviren werden weltweit beobachtet. Das häufige Auftreten dieser Infektion wird oft mit Variationen der Oberflächenproteine von Pferdeinflenzaviren in Zusammenhang gebracht.

Zur Untersuchung solcher Veränderungen wurden monoklonale Antikörper hergestellt. Sie sind gegen das Hämagglutinin bzw. die Neuraminidase des Referenzstammes A/eq/Miami/1/63 (H3N8) gerichtet.

Bei den hämagglutinationshemmenden monoklonalen Antikörpern (MAK) konnten zwei Reaktionsmuster beobachtet werden: vier der MAK reagierten mit 14 von 17 untersuchten Stämmen, während ein weiterer MAK nur mit 4 Stämmen reagierte. Ein Stamm wurde von keinem der MAK gehemmt. Dieses Reaktionsmuster konnte durch unterschiedliche Reinigungsverfahren der MAK nicht verändert werden. Auch nach Tween-Äther-Behandlung einiger Stämme wurde dieses Verhalten gesehen: Der stammspezifisch reagierende MAK zeigte nun gegen die vier Stämme wesentlich höhere Titer, während sich bei den mehr subtypspezifisch reagierenden MAK keine Auswirkungen zeigten.

Die Untersuchung der Neuraminidase von 17 A-equi-2-Stämmen zeigte eine deutliche Variation bei zwei Stämmen. Auch hier wurde durch unterschiedliche Reinigungsverfahren der MAK die Höhe der Titer zwar stark beeinflusst, das Muster der Reaktion mit den verwendeten Stämmen aber nicht verändert.

Die mit monoklonalen Antikörpern nachgewiesenen Variationen der Oberflächenantigene können bei der Verwendung von konventionell hergestellten Antisera nicht deutlich beobachtet werden. Daher ist anzunehmen, daß für die beschriebenen Ausbrüche von Pferdeinflenzavirusinfektionen auch bei geimpften Tieren diese Variationen nicht als alleinige Ursache verantwortlich gemacht werden können.

Key words

Equine influenza – Variations – Monoclonal antibodies

Summary

Diagnosis and differentiation of equine 2 influenza A viruses using monoclonal antibodies

Infections and clinical diseases caused by equine 2 influenza A viruses are observed worldwide. The frequency of these outbreaks supports the hypothesis that antigenic variation of the surface proteins may play an important role.

For the demonstration of these variations, monoclonal antibodies (Mabs) were prepared. They are directed against the hemagglutinin or the neuraminidase of the prototype strain a/eq/Miami/1/63. In hemagglutination-inhibition assays with Mabs two reaction patterns were observed: four Mabs inhibited 14 out of 17 strains tested. Another Mab recognized the hemagglutinin of only 4 strains. One strain was not inhibited by any of the Mabs. This reaction pattern was not changed by purification of the Mabs using different techniques. Following tween 80/ether treatment of some strains, the Mab reacting more strain-specific had higher titers against the four closely related strains. Tween 80/ether treatment did not affect the titers of the Mabs reacting more subtype-specific.

Analysis of the neuraminidase of 17 strains revealed a marked variation in two strains. Different purification procedures had some influence on the titers of the Mabs but did not alter the pattern of the reaction.

The antigenic variation of surface proteins detected by Mabs are not seen so clearly when conventional antisera are used.

Therefore, antigenic variations are probably not responsible for outbreaks of equine influenza in vaccinated animals.

Influenzavirusinfektionen spielen eine bedeutende Rolle bei der Auslösung respiratorischer Infektionskrankheiten des Pferdes. Diese Bedeutung besitzen sie zunächst als Erreger von monokausalen Infektionen. Außerdem sind sie häufig an Mischinfektionen mit anderen Viren betei-

ligt. Über das klinische Bild, die Prophylaxe und die Therapie solcher Erkrankungen, an denen Influenzaviren ursächlich beteiligt sein können, wird an anderer Stelle dieses Heftes berichtet. Daher folgt hier zunächst eine kurze Einführung in den Aufbau von Influenzaviren allgemein und ihrer wichtigsten Strukturkomponenten im besonderen, um ein besseres Verständnis der Vorgänge, die zu neuen Varianten von Pferdeinfluenzaviren führen können, zu erzielen. Die beim Pferd vorkommenden Influenzaviren gehören zum Typ Influenza A des Genus Orthomyxoviridae. Im Elektronenmikroskop kann man zwei morphologische Erscheinungsformen sehen: fadenförmige Partikel sowie annähernd sphärische Partikel von ca. 80–120 nm Durchmesser, die eine Hülle mit Projektionen besitzen. Innerhalb der Hülle liegt das Nukleokapsid, das aus dem Nukleoprotein und der Nukleinsäure besteht. Orthomyxoviren besitzen ein segmentiertes Genom, bestehend aus acht Segmenten einsträngiger RNS. Die virale RNS ist von negativer Polarität, d.h. sie kann direkt transkribiert werden, um dann als mRNA zu fungieren. Für diese Transkription ist die virale RNS-Polymerase zuständig, die DNS-abhängige RNS-Synthese der Wirtszellen wird aber auch benötigt.

Von großer Bedeutung für die Pathogenität – wie auch für die Diagnose – ist die Virushülle mit den Proteinen, die mit ihr vergesellschaftet sind. An der Innenseite der Hülle befindet sich das Matrixprotein (M), das eine wichtige Rolle beim Zusammenbau neu gebildeter Virionen hat. Außen an der Membran sitzen die Glykoproteine Hämagglutinin (H) und Neuraminidase (N). Das Hämagglutinin ist gleichmäßig über die Oberfläche des Virions verteilt, während die Neuraminidase in diskreten Ansammlungen vorkommt (7).

Die Neuraminidase ist morphologisch ein Knöpfchen, das an einem dünnen Stiel befestigt ist. Das Enzym besteht aus vier identischen Untereinheiten. Der biochemische Aufbau der Neuraminidase ist genau bekannt (11), ihre biologische Funktion ist dagegen noch nicht ganz geklärt. Vermutlich unterstützt dieses Enzym sowohl den Transport von Virus in die Zelle als auch – und dies ist wohl der wichtigere Vorgang – die Freisetzung neugebildeter Virionen aus infizierten Zellen. Antikörper, die gegen die Neuraminidase gerichtet sind, vermögen die Infektiosität des Virions nämlich nicht zu hemmen, setzen jedoch die Freisetzung von Nachkommenvirus herab.

Wesentlich mehr Details sind über das Hämagglutinin der Orthomyxoviren bekannt. Das Hämagglutinin wird vom RNS-Segment 4 kodiert und zunächst als zusammenhängende Polypeptidkette synthetisiert. Dann wird dieses Protein in zwei Untereinheiten gespalten: das größere, N-terminale Teilstück wird als HA1 bezeichnet, das kleinere als HA2 (2). Dieser Spaltungsvorgang ist essentiell für die Infektiosität und Pathogenität der Virionen. Ein Hämagglutininmolekül besitzt drei identische Untereinheiten, die jeweils aus HA1 und HA2 bestehen (12). Das Hämagglutinin wird durch hydrophobe Abschnitte des HA2 in der Hülle verankert, dann folgt ein Stiel, der aus durch Disulfidbrücken verbundenen Alpha-Helices besteht. Der Stiel wird ebenfalls fast ausschließlich vom HA2 gebildet. Peripher findet sich auf dem Stiel ein globuläres Gebilde, das nur vom HA1 gebildet wird. Hier liegen die Antigenorte, die bisher mit monoklonalen Antikörpern identifiziert wurden, sowie die Rezeptoren, die für die Bindung an die Wirtszelle verantwortlich sind.

Auch die Funktion des Hämagglutinins ist wesentlich besser bekannt als die der Neuraminidase (6). Primär ist das Hämagglutinin verantwortlich für die Bindung der Virionen an die Oberfläche von Zellen. Danach kommt es zur Viropexis, d.h. intakte Virionen werden durch Endozytose in Zellvesikel aufgenommen. In diesen Vesikeln sinkt nun der pH auf Werte unter 6,3. Diese Änderung des pH-Wertes hat eine Veränderung der Konformation des Hämagglutinintrimers zur Folge. Die globulären Regionen weichen auseinander und ermöglichen so einen engen Kontakt der Membran mit einem Bezirk der HA2-Region, der für die Fusion der Virushülle mit der Vesikelmembran verantwortlich ist. Nach dieser Verschmelzung gelangt das Nukleokapsid in die Zelle und schließlich wird die Polymerase aktiv, d.h. die Virusvermehrung beginnt. Antikörper gegen das Hämagglutinin können also an drei Stellen die Aktivität des Moleküls neutralisieren: a) sie können die Bindung des H an die Zelloberfläche verhindern (durch Blockade des Rezeptors); b) sie können die Fusion der Virushülle mit der Zellmembran verhindern (durch Beeinflussung der pH-bedingten Konfigurationsänderung) und c) können sie die Aktivität der Polymerase blockieren (13).

Weder das Hämagglutinin noch die Neuraminidase von Influenzaviren des Typs A ist einheitlich. Bis heute sind 13 Subtypen des Hämagglutinins und 9 Subtypen der Neuraminidase bei Tieren und beim Menschen bekannt. Daher werden diese Viren, basierend auf der Antigenität von Hämagglutinin und Neuraminidase, in Subtypen eingeteilt. Kommt es nun zu einer Mischinfektion mit zwei unterschiedlichen Subtypen, so kann es, durch das segmentierte Genom, zum Auftreten neuer Kombinationen von Hämagglutinin und Neuraminidase kommen. Die beiden Viren werden in die Zelle aufgenommen und beide vermehren sich, ohne sich gegenseitig zu behindern. Bei der Bildung von Nachkommenvirus kann es zu Austauschvorgängen von RNS-Segmenten kommen. Da jedes Elternvirus 8 RNS-Segmente besitzt, bestehen theoretisch 256 Variationsmöglichkeiten. Ein solcher Vorgang, die Bildung von Rekombinanten, wird als Antigen sprung (oder antigenic shift) bezeichnet, er führt zum Auftreten eines neuen Subtyps und in der Regel zu einer Epidemie in der empfänglichen Population. Solche Vorgänge wurden bei den Influenzaviren des Pferdes bisher aber nicht beobachtet. Innerhalb einzelner Subtypen lassen sich z.T. ebenfalls Unterschiede feststellen. Diese langsame Veränderung von Hämagglutinin bzw. Neuraminidase wird als Antigen drift bezeichnet. Sie entsteht durch Punktmutationen der viralen RNS, die zu Änderungen der Aminosäuresequenz des Hämagglutinins bzw. der Neuraminidase führen können. Die neuentstandenen Varianten sind noch verwandt, aber serologisch unterscheidbar.

Bei den beim Pferd vorkommenden Influenzaviren sind zwei Subtypen bekannt. Der Subtyp 1 besitzt die Antigenkonfiguration H7N7 und wird durch den Prototyp Prag/56 repräsentiert. Dieser Subtyp zeichnet sich durch eine bemerkenswerte genetische Stabilität aus. Auch serologisch verhält sich dieser Subtyp sehr einheitlich. Erst 23 Jahre nach der Isolierung des Stammes Prag im Jahr 1956 wurde ein Equi-1-Stamm isoliert, der eine geringgradige Drift von diesem Prototyp aufweist (10). Der Subtyp 1 wird selten isoliert.

Der Subtyp 2 dagegen, der die Antigenkonfiguration H3N8 besitzt, wird häufiger isoliert. Bei diesem Subtyp

kommt es auch wesentlich häufiger zu genetischen Variationen, die oft auch serologisch nachgewiesen werden können (9). Diese Variationsfreudigkeit des Subtyps 2 wird durch rasche Passagen in empfänglichen Tieren gefördert, besonders wenn diese Tiere eine partielle Immunität gegen solche Viren besitzen. Dieser Prozeß stellt eine ständige Bedrohung der Pferdepopulation dar. Es ist daher wichtig, neuauftretende Varianten möglichst rasch zu charakterisieren. Diese Charakterisierung soll es auch ermöglichen, festzustellen, ob die neuen Isolate durch Antikörper gegen bisher aufgetretene Viren neutralisiert werden. Zur Lösung solcher Fragestellungen sind monoklonale Antikörper sehr gut geeignet. Mit solchen Antikörpern lassen sich die Antigenorte, die einer Veränderung unterliegen, genau identifizieren, besonders wenn eine größere Anzahl unterschiedlicher monoklonaler Antikörper zur Verfügung steht. Wir haben versucht, ein solches »Panel« monoklonaler Antikörper gegen Pferdeinfluenzaviren des Subtyps 2 herzustellen. Dazu haben wir Mäuse mehrmals mit über Sucrose-Gradienten gereinigtem Influenzavirus, Stamm Miami, immunisiert. Dann wurden die Milzzellen dieser Mäuse gewonnen und mit Hilfe der von Köhler und Milstein (4) entwickelten Fusionstechnik mit Myelomzellen fusioniert. Diese fusionierten Zellen wurden dann auf Mäusemakrophagen ausgesät, die zur Ernährung dieser Zellen beitragen. Durch ein Selektionsmedium werden nichtfusionierte Myelomzellen am Wachstum gehindert, nichtfusionierte B-Lymphozyten sterben in Kultur ebenfalls rasch ab. Dagegen zeigen sich ca. 14 Tage später deutliche Kolonien von fusionierten Hybridomzellen. Diese Zellkolonien wurden nun auf die Produktion von antigenspezifischen Antikörpern untersucht. Dazu wurden die Hämagglutinationshemmung (HI) und die Neuraminidasehemmung (NI) verwendet. Auf Antikörperbindungstests, wie z. B. ELISA, wurde bewußt verzichtet, um eine möglichst hohe Spezifität der Antikörper zu erreichen. Zellkolonien, die in einem der Tests positiv waren, wurden vermehrt und dann durch die Endverdünnungstechnik kloniert. Die Einzelzellen wurden dann wieder ver-

mehrt und auf spezifische Antikörperproduktion, wieder mit HI und NI, untersucht. Positive Klone wurden schließlich in der Peritonealhöhle von Mäusen vermehrt. Diese Aszitesflüssigkeit wurde dann durch Affinitätschromatographie an Protein-A-Sepharose gereinigt. Bei dieser Technik werden die Immunglobuline bei alkalischem pH am Fc-Teil gebunden und im sauren Milieu eluiert. Dadurch lassen sich elektrophoretisch reine IgG-Präparationen herstellen. Diese gereinigten Immunglobuline erwiesen sich als optimal im HI- und NI-Test. Interessanterweise ließen sich mit den gereinigten Präparaten im HI höhere Hemmtiter erzielen, im NI niedrigere Werte (8). 11 Hybridomzelllinien, die Antikörper gegen die Neuraminidase des Stammes Miami sezernieren, wurden verwendet, um die Variation dieses Antigens zu untersuchen. Aus den Ergebnissen von serologischen Untersuchungen mit polyklonalen Antisera wurde bisher geschlossen, daß diese Neuraminidase relativ einheitlich ist. Klingeborn und Mitarb. (1980) beschreiben eine signifikante Drift eines Stammes (A/eq/Solvalla/79) vom Referenzstamm Miami, die wir mit Antiserum aber nicht feststellen konnten. Mit den monoklonalen Antikörpern lassen sich die untersuchten Stämme in drei Gruppen einteilen: eine Gruppe mit dem Stamm Miami, deren Neuraminidase von den MAK sehr gut erkannt wird, eine Gruppe, die zwar erkannt wird, aber mit wesentlich niedrigeren Titern reagiert, und schließlich Stämme, die nur sehr schwach oder gar nicht erkannt werden (Abb. 1). Die biologische Bedeutung der Neuraminidase für das Infektionsgeschehen ist gering, daher ist auch die Bedeutung von Varianten klein, ihr Auftreten ist aber dennoch überraschend. Gegen das Hämagglutinin wurden bisher fünf MAK-produzierende Hybridomzellklone hergestellt. Alle MAK-Antikörper reagieren mit H3, nicht aber mit den übrigen Hämagglutininen H1–H11. Bei der weiteren Differenzierung lassen sich die MAK in mehr subtypspezifisch reagierende und in mehr stammspezifisch reagierende MAK einteilen. Die subtypspezifischen MAK reagieren nicht nur mit H3-Stämmen, die vom Pferd isoliert worden waren, sondern auch mit H3-Stämmen von anderen

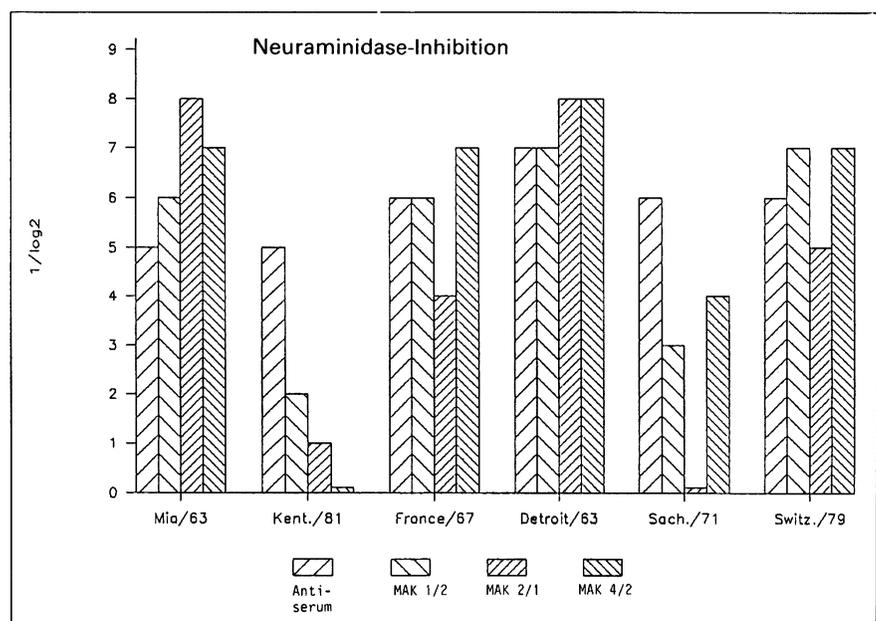


Abb. 1 Hemmungstiter von polyklonalem Antiserum und MAK mit der Neuraminidase verschiedener equiner H3N8-Stämme.

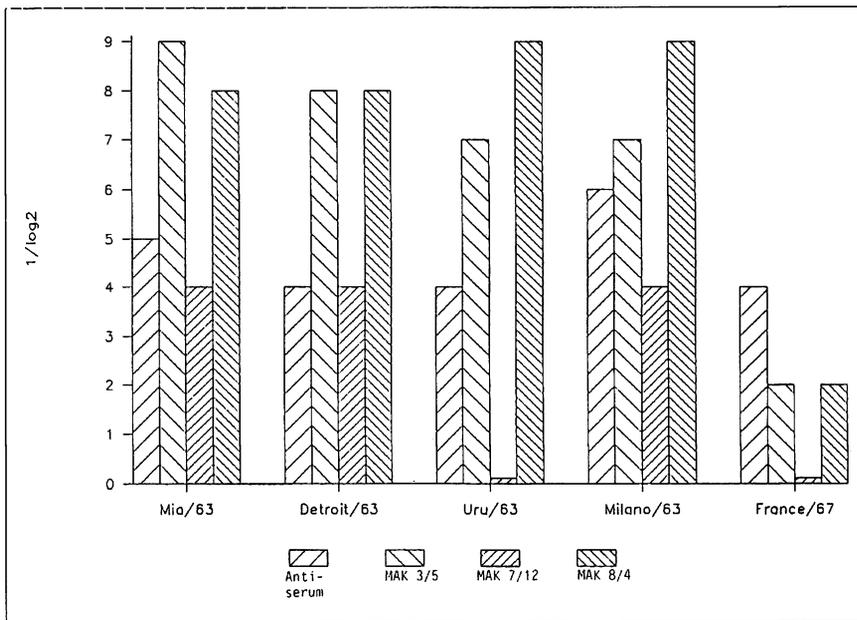


Abb. 2 Hämagglutinationshemmungstiter von polyklonalem Antiserum und monoklonalen Antikörpern mit einigen equinen H3N8-Stämmen.

Tieren und vom Menschen. Der stammspezifische MAK verhält sich völlig anders; er erkennt auch unter den vom Pferd stammenden Isolaten nur wenige Stämme. Bereits innerhalb eines Jahres treten Varianten auf, die vom stammspezifischen MAK nicht mehr erkannt werden, z. B. der Stamm Uruguay/63 (Abb. 2). Die Abbildung zeigt auch, daß es beim Pferd auch Influenzaviren gibt, die sich nicht nur von stammspezifischen MAK unterscheiden lassen, sondern auch mit dem subtypspezifischen MAK deutlich anders reagieren, z. B. das Isolat France/67. Hierbei handelt es sich aber wohl um kurzzeitige Episoden; solche Viren wurden 1967, 1971 und 1972 isoliert, später aber nicht mehr.

Mit dem stammspezifischen MAK reagierten die acht untersuchten Pferdeinfluenzaviren, die in den Jahren 1964–78 isoliert worden waren, nicht. Erst im Jahr 1979 wurde wieder ein Stamm isoliert, der wie Miami reagierte

(Abb. 3). Im selben Jahr wurden die Stämme Fontainebleau und Solvalla isoliert, die sich deutlich anders verhalten. Durch die Untersuchung mit MAK wird die Einbeziehung neuer Stämme in Pferdeinfluenzavirusimpfstoffe nachträglich als richtig bestätigt. Wie verhalten sich nun Isolate, die in den letzten Jahren isoliert wurden? In der Abb. 4 sind die HI-Titer von Isolaten aus den USA und Frankreich dargestellt. Man erkennt deutlich, daß sich diese Isolate – wie die Mehrzahl aller bisher isolierten Stämme – in dem Epitop, das von dem stammspezifischen MAK 7/12 erkannt wird, vom Prototyp Miami unterscheiden. In ihrem übrigen Reaktionsverhalten sind diese jüngsten Pferdeinfluenzavirusisolate sehr einheitlich und wohl am besten mit den Stämmen Kentucky oder Fontainebleau zu vergleichen. Sowohl die subtypspezifischen als auch die stammspezifischen MAK können die Infektiosität von H3N8-Viren neutralisieren. Diese Fähig-

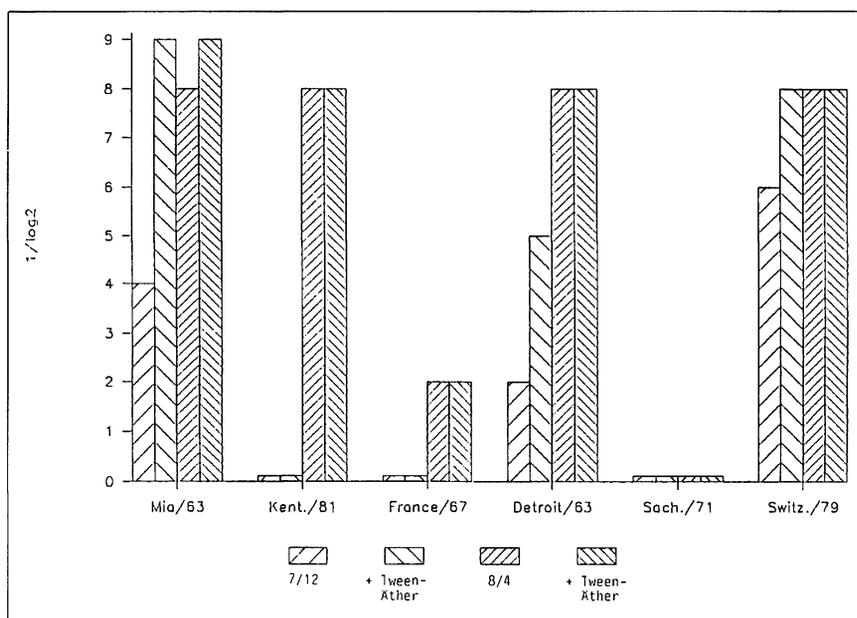


Abb. 3 Hämagglutinationshemmungstiter von polyklonalem Antiserum und monoklonalen Antikörpern mit einigen equinen H3N8-Stämmen.

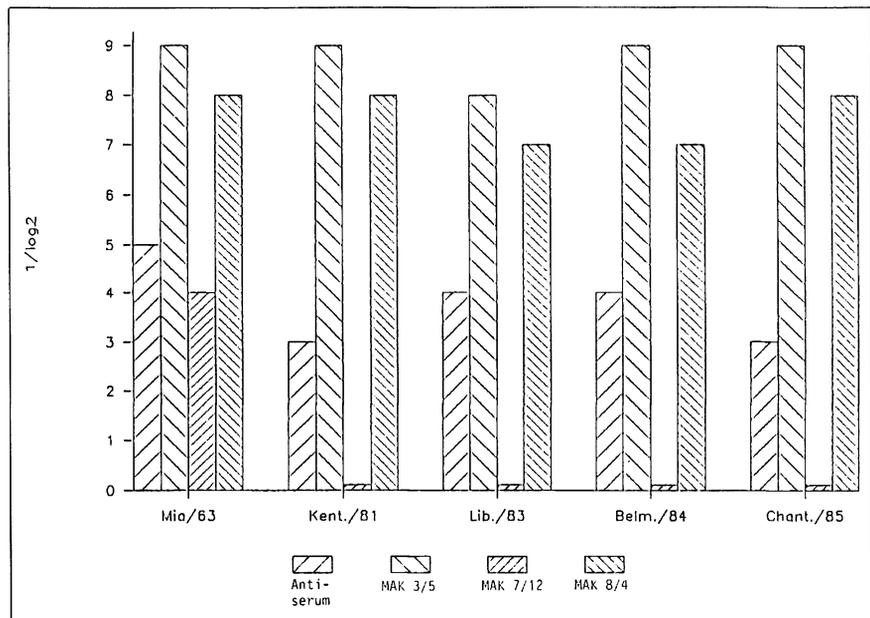


Abb. 4 Hämagglutinationshemmungstiter von polyklonalem Antiserum und monoklonalen Antikörpern mit einigen equinen H3N8-Stämmen.

keit läuft mit der HI-Aktivität parallel. Beide Epitope besitzen also für die Infektiosität des Virus dieselbe Bedeutung.

Influenzavirusdiagnostik wird meist serologisch betrieben, da die Isolierung von Virus aus Feldmaterial nur relativ selten gelingt. Bei der serologischen Diagnostik werden die Antikörpertiter eines Serumpaars verglichen. Für solche Tests wird meist die HI verwendet, und es hat sich eingebürgert, die Testviren durch eine Tween-Äther-Behandlung aufzuspalten, um höhere Hemmungstiter zu erhalten. Wir haben nun überprüft, ob auch andere Influenzastämme so reagieren und ob sich die beteiligten Epitope gleich verhalten. Betrachten wir zunächst die Reaktion von polyklonalem Antiserum mit behandelten und Tween-Äther-behandelten Stämmen (Abb. 5). Beim Stamm Miami hat die Behandlung des Antigens einen

Anstieg des Hemmtiters um mindestens drei Titerstufen zur Folge, bei anderen Stämmen steigt der Titer nicht so stark an. Vergleicht man die Reaktionen der mehr subtypspezifisch reagierenden MAK mit nativem und behandeltem Antigen, so fallen hier die Titersteigerungen niedriger aus oder fehlen. Dies wird in der nächsten Abbildung (Abb. 6) noch deutlicher. Der stammspezifische MAK 7/12 erkennt Epitope nach der Behandlung wesentlich besser, es werden also wesentlich höhere Hemmtiter erzielt. Epitope, die nativ nicht erkannt werden, werden auch nach Behandlung nicht erkannt.

Die Epitope vom equinen Influenzavirus reagieren also sehr unterschiedlich auf eine Spaltung des Virions, wobei die stammspezifischen (für den Stamm Miami) besonders stark reagieren. Dieses Epitop fehlt aber bei der Mehrzahl der Stämme, daher ist es zumindest fraglich, ob die

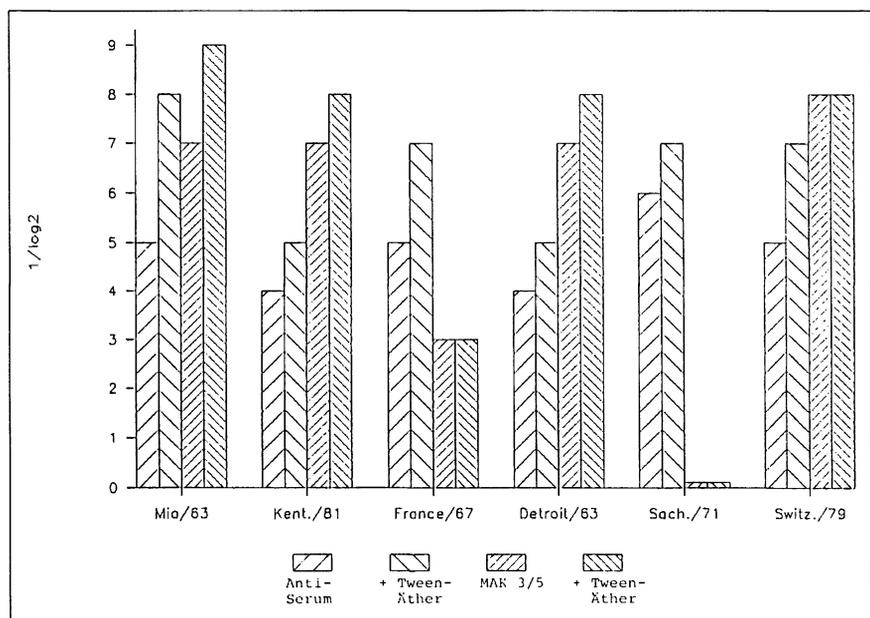


Abb. 5 Auswirkung der Tween-Äther-Behandlung von einigen equinen H3N8-Stämmen auf die Hämagglutinationshemmungstiter von polyklonalem Antiserum bzw. monoklonalen Antikörpern.

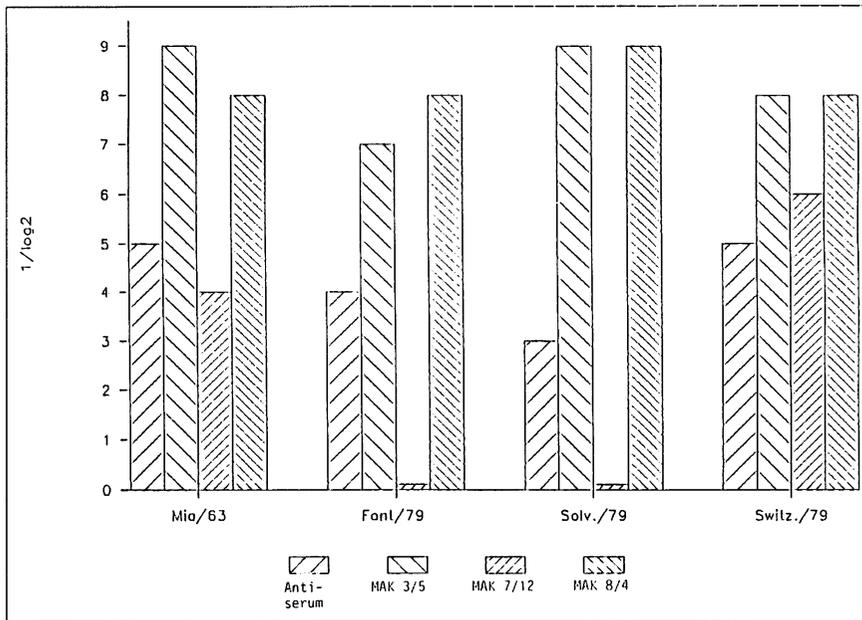


Abb. 6 Auswirkung der Tween-Äther-Behandlung von einigen equinen H3N8-Stämmen auf die Hämagglutinations-hemmungs-Titer von monoklonalen Antikörpern.

Tween-Äther-Spaltung für die Diagnose von Influenza-virusinfektionen angebracht ist. Derzeit sind wir dabei, neuere Testverfahren, wie den SRH-Test (single radial hemolysis), einzuführen und die Ergebnisse mit Untersuchungen, die mit etablierten Testverfahren erzielt werden, zu vergleichen. In diese Untersuchungen sollen auch weitere, möglichst stammspezifische MAK einbezogen werden.

Literatur

- Desselberger, U. S., K. Nakajima, P. Alifino, F. S. Pedersen, W. A. Haseltine, C. Hannoun, P. Palese: Biochemical evidence that new influenza virus strains in nature may arise by recombination (reassortment). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 3341–3345 (1978).
- Klenk, H. D., R. Rott, M. Orlich: Further studies on the activation of influenza virus by proteolytic cleavage of the hemagglutinin. *J. Gen. Virol.* **36**, 151–161 (1977).
- Klingeborn, B., G. Rockborn, Z. Dinter: Significant drift within the influenza equ 2 subtype in Sweden. *Vet. Rec.* **106**, 363–364 (1981).
- Köhler, G., L. Milstein: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495–497 (1975).
- Laver, W. G., G. M. Air, R. G. Webster, W. Gerhard, C. W. Ward, T. A. A. Dopheide: Antigenic drift in type A influenza virus: sequence differences in the hemagglutinin of Hongkong (H3N2) variants selected with monoclonal hybridoma antibodies. *Virology* **98**, 226–237 (1979).
- Marsh, M.: The entry of enveloped viruses into cells by endocytosis. *Biochem. J.* **218**, 1–10 (1984).
- Murti, K. G., R. G. Webster: Distribution of hemagglutinin and neuraminidase on influenza viruses as revealed by immunoelectron microscopy. *Virology* **149**, 36–43 (1986).
- Noe, T.: Charakterisierung und Differenzierung von equinen Influenza-A-Viren (H3N8) mit monoklonalen Antikörpern. Diss. vet. med. München (1986).
- Pereira, M. S., S. Takimoto, N. S. Piegas, L. A. Ribeiro do Valle: Antigenic variation of equine (Heq2Neq2) influenza viruses. *Bull. Wld. Hlth. Org.* **47**, 465–469 (1972).
- Tumova, B., A. Stumpa, J. Zakopal, D. Veznikova, J. Mensik: Persistence in nature of influenza virus A/eq/Praha/56 (Heq1 Neq1). *Acta Virol.* **24**, 63–67 (1980).
- Varghese, J. N., W. G. Laver, P. M. Colman: Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution. *Nature* **303**, 35–40 (1983).
- Wilson, I. A., J. J. Skehel, D. C. Wiley: Structure of the hemagglutinin membrane glycoprotein at 3 Å resolution. *Nature* **283**, 366–373 (1981).
- Yoden, S., H. Kida, R. Yanagawa: Is bivalent binding of antibodies to different antigenic areas on the hemagglutinin of influenza virus required for neutralization of viral infectivity? *Arch. Virol.* **85**, 209–216 (1985).

Der Autor bedankt sich bei A. Pflieger und Th. Noe für die technische Assistenz und bei K. Sultan für die Hilfe bei der Erstellung des Manuskripts.

Dr. Werner Eichhorn
 Institut für Medizinische Mikrobiologie,
 Infektions- und Seuchenmedizin
 Veterinärstr. 13
 8000 München 22