

*Aus der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere  
in Tübingen a. N.*

## **Die Interferenz zwischen inaktiviertem und aktivem Maul- und Klauenseuchevirus in Gewebekulturen. Ihre Bedeutung für die Unschädlichkeitsprüfung von Formalinvakzinen**

Von

G. WITTMANN

*(Eingegangen am 12. Februar 1964)*

Zur Unschädlichkeitsprüfung von Maul- und Klauenseuche (MKS)-Formalinvakzinen dient gewöhnlich das Rind als Versuchstier. Aus einer Impfstoffcharge werden bei mono- und bivalenten Vakzinen 20 ml, bei trivalenten 30 ml auf 2 bzw. 3 Rinder intradermolingual verimpft. Nach den Angaben von HENDERSON (1) muß dabei mit 5% Wahrscheinlichkeit gerechnet werden, daß in einer großen, mit einer solchen Vakzine geimpften Rinderpopulation etwa 7,2% bzw. 4,9% der Tiere erkranken können. Verglichen mit den diesbezüglichen Anforderungen an Poliomyelitisvakzine, bei deren Unschädlichkeitsprüfung pro Impfstoffcharge 6 Liter in Gewebekulturen geprüft werden (2), sind jene bei MKS-Vakzinen milde. Die Beschränkung der Prüfdosis auf 30 ml ist einzig und allein der Verwendung von Rindern als Versuchstiere zuzuschreiben. Größere Prüfungsvolumen, die auch eine größere Sicherheit gewährleisten, würden größere Tierzahlen erfordern und die Vakzine somit unangemessen verteuern. Zur Feststellung, daß weniger als 18 LD<sub>50</sub>-Einheiten von aktivem Virus pro Liter Vakzine enthalten sind, wären bereits 14 Rinder notwendig.

Diesen Schwierigkeiten könnte begegnet werden, wenn anstelle von Rindern Gewebekulturen zur Unschädlichkeitsprüfung von MKS-Vakzinen herangezogen würden. Allerdings erhebt sich hierbei die Frage, inwieweit das inaktivierte Virus der Vakzine mit dem noch in Spuren vorhandenen aktiven Virus interferiert und dadurch sein Vorhandensein verschleiert.

In der vorliegenden Arbeit wird über diesbezügliche Untersuchungen berichtet.

### **Material und Methoden**

#### **Virus**

Für die Untersuchungen verwendeten wir das MKS-Virus C Gaidorf und zwar die 3. Rinderpassage und die 123. Passage in Nierenepithelkulturen vom Kalb. Sofern wir das Virus nicht sofort benötigen, froren wir es bei  $-65^{\circ}\text{C}$  ein. Hierzu verarbeiteten wir das Rindermaterial zu einem 10%igen Extrakt in dem Gewebekulturmedium VM<sub>3a</sub> (3).

Zur Herstellung der inaktivierten Viruspräparationen für die Interferenzversuche benutzten wir frisch geerntetes Virus der 123. Kulturpassage. Wir versetzten eine entsprechende Menge davon im Verhältnis 1 : 2000 mit Formalin und ließen das Gemisch 7 Tage bei 25 °C und weitere 4 Tage bei 4 °C stehen. Hierauf entfernten wir das Formalin durch 24stündige Dialyse gegen die 25fache Menge VM<sub>3a</sub> bei 4 °C.

#### Gewebekulturen

Alle Titrations und Interferenzuntersuchungen erfolgten in Epithelkulturen von Schweine- und Kälbernieren (ENS bzw. ENK). Diese wurden aus trypsinisierten Geweben in der üblichen Weise hergestellt. Als Virusmedium verwendeten wir VM<sub>3a</sub>.

#### Virustitrierung

Die Verdünnungen des Virus erfolgten in Potenzen von 10 in 1/90 mol phosphatgepufferter physiologischer NaCl-Lösung mit einem pH-Wert von 7,6. Pro Verdünnungsstufe wurden gewöhnlich 5, in besonderen Fällen auch 20 Gewebekulturröhrchen mit 0,1 ml beimpft. Die Berechnung des Virusgehaltes erfolgte nach BEHRENS und KÄRBER (4). Die Titerangaben in KID<sub>50</sub> (kulturinfektiöse Einheiten) beziehen sich auf 1 ml.

#### Technik der Interferenzversuche

Zu inaktiviertem Virus wurde soviel aktives Virus zugesetzt, daß seine Konzentration 5, 1,25, 0,31 und 0,077 KID<sub>50</sub> in ml betrug. Diese Mischungen verimpften wir auf eine angemessene Zahl von Gewebekulturen. Deren Anzahl richtete sich nach dem Volumen der Probe, die den Gemischen zum Nachweis des aktiven Virus entnommen werden mußte. Wir stützten uns dabei auf Berechnungen von LORENZ\*), die dieser nach einer Arbeit von PRIGGE und Mitarbeiter (5) durchgeführt hat: wenn man in 0,6, 2,4, 10,0 und 39,2 ml Probevolumen kein Virus nachweisen kann, so besagt das, daß höchstens noch 5, 1,25, 0,31 und 0,077 KID<sub>50</sub>/ml in der Probe enthalten sind. Damit diese Virusmenge mit Sicherheit in der Gewebekultur in Erscheinung traten, verwendeten wir in einigen Versuchen das 4-, in anderen das 16fache dieser Probevolumen.

Die Proben wurden parallel auf Kulturröhrchen sowie Kolle- und Rouxflaschenkulturen verimpft. Vorher entfernten wir aus den Kulturgefäßen in der Regel die Hälfte des Kulturmediums und ersetzten es durch das Gemisch aus inaktiviertem und aktivem Virus. Ein Prüfungsvolumen von 10 ml verteilten wir also auf 10 Röhrchen (10mal 1 ml), auf 2 Kolleflaschen (2mal 5 ml) und auf 1 Rouxflasche (1mal 10 ml; nur 10 ml Kulturmedium vorher entfernt). Die entsprechenden Werte bei 40 ml waren 40 Röhrchen, 8 Kolleflaschen und 1 Rouxflasche und bei 140 ml betrug sie 140, 28 und 3.

Um den Einfluß der Impfdosis auf die Interferenz festzustellen, impften wir in einer Versuchsreihe eine entsprechende Anzahl von Rouxflaschen sowohl im Verhältnis 1 : 2 als auch im Verhältnis 1 : 10 mit den Virusgemischen.

Jedem Interferenzansatz lief eine Kontrolle parallel, bei der anstelle des inaktivierten Virus VM<sub>3a</sub>-Medium trat. Die Volumengröße und der Gehalt an aktivem Virus entsprachen der Interferenzreihe.

Die Bebrütung der beimpften Kulturen erfolgte stationär bei 37 °C. Trat kein zytopathischer Effekt auf, so erstreckte sich ihre Beobachtungszeit auf 7 Tage.

Jeder Versuch wurde einmal wiederholt.

\*) Herrn Dipl. Mathem. R. J. LORENZ sei für die Berechnungen an dieser Stelle gedankt.

### Versuche und Ergebnisse

Nach eigenen Beobachtungen rufen nicht alle MKS-Stämme in Kälbernierenkulturen (ENK) schon in der ersten Passage einen deutlichen zytopathischen Effekt (ZPE) hervor. Bei Schweinenierenkulturen (ENS) liegen die Verhältnisse dagegen bedeutend günstiger, denn die Mehrzahl der von uns geprüften MKS-Stämme führt darin zu einer starken Zellerstörung. Dieses Kulturverhalten der MKS-Stämme kann bei der Unschädlichkeitsprüfung von Vakzinen in Gewebekulturen eine Rolle spielen, wenn die Impfstoffe aus Rinderoriginalvirus mit schlechten zytopathischen Eigenschaften hergestellt sind.

In Vorversuchen bestimmten wir, welches Gewebekultursystem für den Nachweis des von uns verwendeten C Gaidorf-Virus am geeignetsten ist. Wie die in Tabelle 1 wiedergegebenen Ergebnisse zeigen, handelt es sich bei C Gail-

Tabelle 1

Die Empfänglichkeit von Kälber- und Schweinenierenkulturen für einen MKS-Virusstamm vom Typ C

Abstammung des MKS-Virus	ENK <sup>1)</sup>		ENS <sup>2)</sup>	
	Titer <sup>3)</sup>	ZPE <sup>4)</sup>	Titer	ZPE
Rinderoriginalmaterial	5,7 <sup>5)</sup>	(+) <sup>6)</sup>	6,6	4 + <sup>7)</sup>
123. Passage in ENK-Kulturen	6,8	4 +	6,7	4 +

Zeichenerklärung: <sup>1)</sup> Gewebekulturen aus Kälbernieren  
<sup>2)</sup> Gewebekulturen aus Schweinenieren  
<sup>3)</sup> pro Virusverdünnung 20 Röhrchen beimpft  
<sup>4)</sup> zytopathischer Effekt  
<sup>5)</sup>  $-\log_{10}$   
<sup>6)</sup> schwacher ZPE  
<sup>7)</sup> völlige Kulturzerstörung

dorf um einen Virusstamm, der in ENS-Kulturen einen starken, in ENK-Kulturen dagegen nur einen schwachen ZPE hervorrief. In ENS-Kulturen kam es je nach Virusdosis am 1. oder 2. Tag zu einer vollständigen Zerstörung des Zellrasens. In ENK-Kulturen trat nur an einigen Stellen eine kugelige Degeneration der obersten Zellschicht auf, die 24 Stunden später bereits wieder verschwunden war, ohne Spuren zu hinterlassen. Weiter konnten wir feststellen, daß der Infektiositätstiter des Virus in ENS-Kulturen mit  $10^{-6,6}$  KID<sub>50</sub> um 0,9 Zehnerpotenzen höher war als der in ENK-Kulturen ( $10^{-5,7}$  KID<sub>50</sub>). Da wir pro Verdünnungsstufe 20 Kulturröhrchen einsetzten, liegt diese Differenz einwandfrei über der Signifikanzgrenze von 0,49.

Titrierten wir dagegen die 123. Kulturpassage des Virus in derselben Weise in ENK- und ENS-Kulturen, so konnten wir keine Unterschiede feststellen.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wurden die Interferenzuntersuchungen bevorzugt mit ENS-Kulturen ausgeführt.

In der ersten Doppelserie der Interferenzversuche setzten wir dem inaktivierten Virus, dessen Titer zwischen  $10^{-6,1}$  und  $10^{-6,6}$  KID<sub>50</sub>/ml schwankte, soviel aktives Rindervirus desselben Stammes zu, daß dessen Gehalt bei der 1. Probe 5 KID<sub>50</sub> im ml, bei der 2. Probe 1,25 KID<sub>50</sub> und bei der 3. Probe 0,31 KID<sub>50</sub> betrug. Damit beimpften wir ENS-Kulturen und zwar mit der Probe I eine Rouxflasche mit 10 ml, 2 Kolleflaschen mit je 5 ml und 10 Röhrchen mit je 1 ml. Mit der Probe II beimpften wir eine Rouxflasche mit 40 ml, 8 Kolleflaschen mit je 5 ml und 40 Röhrchen mit je 1 ml. Die entsprechenden Werte bei der Probe III waren drei Rouxflaschen mit je 50 ml sowie 28 Kolleflaschen und 140 Röhrchen mit je 5 ml bzw. 1 ml. Die Ergebnisse der Versuche

Tabelle 2

Die Interferenz zwischen inaktiviertem und aktivem MKS-Virus vom Typ C in Schweinenierenkulturen bei Verwendung von aktivem Rinderoriginalvirus

Probe	Virusgehalt der Probe	Volumen der Probe	verimpft auf	Impfdosis	Interferenzprüfung <sup>1)</sup>			Kontrolle <sup>2)</sup>		
					a)	b	ZPE <sup>4)</sup>	a)	b	ZPE
I	5 KID <sub>50</sub> im ml	10 ml	1 Roux	1 x 10 ml	1/1 <sup>3)</sup>	1/1	4+	1/1	1/1	4+
			2 Kolle	2 x 5 ml	0/2	0/2	2/2	2/2	4+	
			10 Röhrchen	10 x 1 ml	0/10	0/10	9/10	9/10	4+	
II	1,25 KID <sub>50</sub> im ml	40 ml	1 Roux	1 x 40 ml	1/1	0/1	4+	1/1	1/1	4+
			8 Kolle	8 x 5 ml	0/8	0/8	6/8	7/8	4+	
			40 Röhrchen	40 x 1 ml	0/40	0/40	8/40	17/40	4+	
III	0,31 KID <sub>50</sub> im ml	140 ml (150 ml)	3 Roux	3 x 50 ml	0/3	0/3		3/3	3/3	4+
			28 Kolle	28 x 5 ml	0/28	1/28	4+	7/28	14/28	4+
			140 Röhrchen	140 x 1 ml	0/140	0/140	7/140	21/140	4+	

Zeichenerklärung: <sup>1)</sup> aktives Virus in der angegebenen Konzentration dem inaktivierten Virus zugesetzt, Ergebnisse zweier Versuche (a, b)

<sup>2)</sup> aktives Virus in der angegebenen Konzentration mit Kulturmedium gemischt

<sup>3)</sup> Zähler: Anzahl der viruszerstörten Kulturen, Nenner: Anzahl der geimpften Kulturen

<sup>4)</sup> Intensität des zytopathischen Effektes

sind aus der Tabelle 2 zu ersehen. Sie zeigen, daß das inaktivierte Virus mit dem aktiven Virus stark interferierte.

Zur Feststellung, ob diese Interferenzerscheinungen auch auftreten, wenn das aktive Rindervirus durch kulturadaptiertes Virus ersetzt wird, wiederholten wir die Versuche mit der 123. Kulturpassage des Virus. Nach den in

Tabelle 3

Die Interferenz zwischen inaktiviertem und aktivem MKS-Virus vom Typ C in Schweinenierenkulturen bei Verwendung von aktivem kulturadaptiertem Virus

Probe	Virusgehalt der Probe	Volumen der Probe	verimpft auf	Impfdosis	Interferenzprüfung <sup>1)</sup>			Kontrolle <sup>2)</sup>		
					a)	b	ZPE <sup>4)</sup>	a)	b	ZPE
I	5 KID <sub>50</sub> im ml	10 ml	1 Roux	1 x 10 ml	1/1 <sup>3)</sup>	1/1	4+	1/1	1/1	4+
			2 Kolle	2 x 5 ml	0/2	0/2				
			10 Röhrchen	10 x 1 ml	1/10	0/10	4+			
II	1,25 KID <sub>50</sub> im ml	40 ml	1 Roux	1 x 40 ml	1/1	0/1	4+	1/1	1/1	4+
			8 Kolle	8 x 5 ml	0/8	0/8	8/8	7/8	4+	
			40 Röhrchen	40 x 1 ml	0/40	0/40	29/40	21/40	4+	
III	0,31 KID <sub>50</sub> im ml	140 ml (150 ml)	3 Roux	3 x 50 ml	0/3	0/3		3/3	3/3	4+
			28 Kolle	28 x 5 ml	0/28	0/28	26/28	14/28	4+	
			140 Röhrchen	140 x 1 ml	0/140	0/140	32/140	40/140	4+	

Zeichenerklärung: s. Tab. 2

Tabelle 3 niedergelegten Ergebnissen bestand zwischen beiden Versuchsansätzen kein besonderer Unterschied.

Erwähnenswert ist noch, daß die zytopathische Wirkung des Virus in ENS-Kulturen stets zur völligen Kulturzerstörung führte.

Weiterhin prüften wir, wie stark das Interferenzphänomen in ENK-Kulturen ausgeprägt ist. Wir setzten allerdings hier nur eine Versuchsreihe mit 1,25, 0,31 und 0,075 KID<sub>50</sub> pro ml der 123. Kulturpassage des Virus an, deren Ergebnisse Tabelle 4 wiedergibt. Im Gegensatz zu den ENS-Kulturen konnten wir in ENK-Kulturen, vom quantitativen Gesichtspunkt aus betrachtet, keine einwandfreie Interferenz feststellen. Höchstens die mit den 0,31- und 0,075

Tabelle 4

Die Interferenz zwischen inaktiviertem und aktivem MKS-Virus vom Typ C in Kälbernierenkulturen bei Verwendung von kulturadaptiertem Virus

Probe	Virusgehalt der Probe	Volumen der Probe	verimpft auf	Impfdosis	Interferenzprüfung <sup>1)</sup>		Kontrolle <sup>2)</sup>	
					ZPE <sup>4)</sup>	ZPE	ZPE	ZPE
I	1,25 KID <sub>50</sub> im ml	10 ml	1 Roux	1 x 10 ml	1/1	2+ <sup>5)</sup>	1/1	4+
			2 Kolle	2 x 5 ml	2/2	2+	2/2	4+
			10 Röhrchen	10 x 1 ml	0/10		1/10	4+
II	0,31 KID <sub>50</sub> im ml	40 ml	1 Roux	1 x 40 ml	0/1		1/1	4+
			8 Kolle	8 x 5 ml	1/8	2+	3/8	4+
			40 Röhrchen	40 x 1 ml	7/40	2+	1/40	4+
III	0,075 KID <sub>50</sub> im ml	140 ml (150 ml)	3 Roux	3 x 50 ml	0/3		2/3	4+
			28 Kolle	28 x 5 ml	2/28	(+) <sup>6)</sup>	7/28	4+
			140 Röhrchen	140 x 1 ml	1/140	(+)	4/140	4+

Zeichenerklärung: <sup>1)</sup> bis <sup>4)</sup> s. Tab. 2

<sup>5)</sup> mittelgradiger zytopathischer Effekt

<sup>6)</sup> sehr schwacher, nur vorübergehend sichtbarer ZPE

KID<sub>50</sub>-Proben erzielten Resultate in Roux- und Kolleflaschen deuten auf das Vorliegen einer Interferenz hin. Zieht man dagegen den Grad des zytopathischen Effektes als Maßstab für die Interferenz heran, so machten sich doch erhebliche Unterschiede zu den Kontrollen bemerkbar. Während bei diesen alle positiven Reagenten eine völlige Zerstörung des Zellrasens aufwiesen, zeigten die entsprechenden Kulturen des Interferenzversuches nur einen partiellen zytopathischen Effekt. Dieser nahm bei Weiterbebrütung der Kulturen an Stärke nicht zu, sondern verschwand bei den Proben mit 0,075 KID<sub>50</sub> sogar wieder.

Betrachtet man die Tabellen 2, 3 und 4, so fällt auf, daß die geringsten Interferenzerscheinungen stets dann auftraten, wenn Proben von 10 ml Volumen auf Rouxflaschen verimpft worden sind. Während sonst bei allen Kulturen zwischen dem Interferenzgemisch und dem Kulturmedium ein Verhältnis von 1:1 bestand, betrug es in diesen Fällen 1:10. Es könnte sein, daß hierbei durch die stärkere Verdünnung die Interferenzwirkung aufgehoben worden ist. Um dies festzustellen, beimpften wir in einer Versuchsreihe eine Rouxflasche mit 40 ml und 4 Rouxflaschen mit je 10 ml einer 1,25 KID<sub>50</sub>-Probe sowie drei Rouxflaschen mit je 50 ml und 14 mit je 10 ml einer 0,31 KID<sub>50</sub>-Probe. Entsprechende Kontrollen liefen parallel.

Wie Tabelle 5 zeigt, scheint das Verhältnis zwischen der Größe des Impfvolumens und dem Volumen der Gewebekulturflüssigkeit, d. h. der Grad der Verdünnung des Interferenzgemisches, für den Nachweis des aktiven Virus von Bedeutung zu sein. Wurden nämlich mit der 0,31 KID<sub>50</sub>-Probe drei Rouxflaschen mit 50 ml beimpft, so wies keine davon einen virusspezifischen zyto-

Tabelle 5

Der Einfluß des Animpfvolumens auf das Auftreten von Interferenzerscheinungen

Probe	Virusgehalt der Probe	Volumen der Probe	verimpft auf	Impfdosis	Interferenzprüfung <sup>1)</sup>		Kontrolle <sup>2)</sup>	
					ZPE <sup>4)</sup>	ZPE	ZPE	ZPE
I	1,25 KID <sub>50</sub> im ml	40 ml	1 Roux	1 x 40 ml	1/1	4+	1/1	4+
			4 Roux	4 x 10 ml	4/4	4+	4/4	4+
II	0,31 KID <sub>50</sub> im ml	140 ml (150 ml)	3 Roux	3 x 50 ml	0/3		3/3	4+
			14 Roux	14 x 10 ml	8/14	2+ / 4+	13/14	4+

Zeichenerklärung: s. Tab. 2

pathischen Effekt auf. Teilte man dagegen das Probevolumen von 140 ml auf 14 Rouxflaschen auf (14mal 10 ml), so waren acht davon positiv.

In einigen Fällen wurde am 5. Beobachtungstag aus Rouxflaschen, die mit Interferenzgemischen beimpft waren, aber keinen ZPE zeigten,  $\frac{1}{10}$  des Volumens (10 ml) entnommen und auf weitere Rouxflaschen verimpft. Dabei beobachteten wir, daß bei einigen dieser Subpassagen eine virusspezifische Zellzerstörung auftrat.

### Besprechung der Befunde

Der Nachweis von aktivem Restvirus in Maul- und Klauenseuche (MKS)-Vakzinen stößt in Gewebekulturen unter Umständen auf Schwierigkeiten, da das inaktivierte Virus Interferenzerscheinungen auslösen kann. Nach unseren Untersuchungen hängt das Maß der Interferenz von dem Empfindlichkeitsgrad ab, den Gewebekulturen gegenüber einer Infektion mit MKS-Virus besitzen, denn in Schweinenieren (ENS)-Kulturen, in denen die Vermehrung des MKS-Virus in der Regel rascher und intensiver vor sich ging als in Kälbernieren (ENK)-Kulturen, war die Interferenz bedeutend stärker ausgeprägt als in ENK-Kulturen.

Daraus folgt, daß die Unschädlichkeitsprüfung einer MKS-Vakzine, die einen ENK-kulturadaptierten Virusstamm als Grundlage hat, glatt vonstatten gehen dürfte, da die Prüfung in ENK-Kulturen vorgenommen werden kann. Dasselbe ist auch bei Vakzinen aus Rindermaterial der Fall, sofern das Virus für ENK-Kulturen zytopathisch wirkt. Häufig verursacht aber gerade Rinderoriginalvirus nur in ENS-, nicht aber in ENK-Kulturen einen ausreichenden zytopathischen Effekt. Zum Virusnachweis müßten also hier ENS-Kulturen herangezogen werden. Sofern man dabei das Probevolumen in der wirtschaftlichsten Weise verimpft, d. h. im Verhältnis 1:2 mit dem Kulturmedium gemischt auf die Kulturgefäße aufteilt, ist mit Interferenz zu rechnen. Wir haben festgestellt, daß gewöhnlich die Gegenwart von 0,31 KID<sub>50</sub> des aktiven Virus pro ml des Virusgemisches, unter Umständen aber sogar die von 5 KID<sub>50</sub>/ml verschleiert wurde.

Für den quantitativen Nachweis des aktiven Virus war es ohne Bedeutung, ob das Probevolumen auf eine entsprechende Zahl von Rouxflaschen-, Kolleflaschen- oder Röhrchen-Gewebekulturen verimpft wurde. Wichtig schien dagegen der Verdünnungsgrad der Probe zu sein, der sich nach der Verimpfung im Kulturgefäß einstellte. Wurde statt der Hälfte nur  $\frac{1}{10}$  des Kulturmediums durch die Probe ersetzt, so waren statt 0% 50% der geimpften Rouxflaschen positiv. Allerdings erhöhte sich bei diesem 1:10-Verhältnis die Zahl der notwendigen Gewebekulturen gegenüber dem 1:2-Verhältnis um das Fünffache.

Von praktischer Bedeutung ist außerdem, daß durch Weiterverimpfung des Kulturmediums von Gewebekulturen, die visuell keine virusspezifischen morphologischen Veränderungen erkennen ließen, aktives Virus nachgewiesen werden konnte. Aktives Restvirus kann sich also anscheinend in Gegenwart von großen Mengen inaktivierten Virus noch in einer gewissen Anzahl der Zellen vermehren. Der Prozentsatz der zerstörten Zellen ist aber so gering, daß er mikroskopisch nicht wahrgenommen werden kann. Trotzdem scheint die dabei freigesetzte Virusmenge groß genug zu sein, um nach Subpassierung auf andere Gewebekulturen in Erscheinung zu treten.

### Zusammenfassung

Nach Beimpfung von Gewebekulturen mit einem Gemisch aus formalin-inaktiviertem Maul- und Klauenseuche-Virus und homologem aktiven Virus

traten Interferenzerscheinungen auf. Diese konnten so stark sein, daß die Gegenwart von 5 KID<sub>50</sub> des aktiven Virus pro ml des Gemisches verschleiert wurde.

Die Interferenz war um so intensiver, je empfindlicher die Gewebekultur gegenüber einer Infektion mit MKS-Virus war. Aus diesem Grund trat sie in Kälbernierenkulturen kaum, in Schweinenierenkulturen dagegen stark hervor. Die Interferenz war besonders ausgeprägt, wenn das verimpfte Virusgemisch zum Kulturmedium im Verhältnis 1:2 stand. Eine Erhöhung auf 1:10 schien dagegen den Interferenzeffekt zu reduzieren.

Die Ergebnisse werden im Hinblick auf die Unschädlichkeitsprüfung von Maul- und Klauenseuche-Vakzine in Gewebekulturen diskutiert.

#### Summary

##### **Interference between inactivated and active foot-and-mouth disease virus in tissue culture: its significance in proving the safety of formalin vaccines**

After inoculating tissue cultures with a mixture of formalin-inactivated foot-and-mouth disease virus and homologous activated virus, signs of interference developed. These can be so marked as to mask the presence of 5 KID<sub>50</sub> (culture infective units) of active virus/ml.

Interference became more intensive with increased susceptibility of the tissue culture to infection with the virus. Thus it hardly occurred at all in calf kidney cultures, but was very marked in pig kidney cultures. Interference was particularly marked when the ratio of virus to culture medium was 1 to 2 and much reduced when the ratio was lowered to 1 to 10. The results are discussed in relation to proof of the harmlessness of foot-and-mouth disease vaccine in tissue culture.

#### Résumé

##### **L'interférence entre les virus aphteux inactivés et ceux qui ne le sont pas, en cultures de cellules. Son incidence sur le contrôle d'innocuité des vaccins formolés**

Des phénomènes d'interférence sont apparus après l'ensemencement sur cultures de tissus d'un mélange de virus aphteux inactivé à la formaline et de virus homologue actif. Ces phénomènes pouvaient être tels que les virus actifs se trouvaient neutralisés à raison de 5 doses infectantes moyennes (DI<sub>50</sub>) pour vaches, par cm<sup>3</sup> de mélange.

L'interférence était d'autant plus marquée que la culture de tissus était plus réceptive à une infection par le virus aphteux. Ainsi, elle était à peine perceptible sur cultures de cellules rénales de veaux tandis qu'elle était très nette sur cultures de cellules rénales de porcs. L'interférence était particulièrement marquée lorsque le mélange de virus était ensemencé dans la culture en proportion de 1:2. Lorsque ce rapport était de 1:10, l'effet d'interférence semblait par contre réduit.

Les résultats sont discutés en vue des contrôles d'innocuité des vaccins antiaphteux, opérés sur cultures de tissus.

#### Resumen

##### **La interferencia entre el virus aftoso inactivado y el activo en cultivos hísticos. Su importancia en el control de inocuidad de vacunas formalinadas**

Tras la inoculación de cultivos hísticos con una mezcla de virus aftoso inactivado con formalina y virus activo homólogo surgieron síntomas de interferencia, pudiendo ser tan marcados que se enmascaraba la presencia de 5 KID<sub>50</sub> de virus activo por ml de mezcla.

La interferencia era tanto más intensa cuanto más sensible era el cultivo hístico frente a una infección con virus de la glosopeda. Por esta razón, apenas destacó en cultivos de riñones de ternera y mucho sin embargo en cultivos de riñones de cerdo. La interferencia destacaba en especial cuando la mezcla vírica inoculada y el medio de cultivo se hallaban en la proporción de 1 : 2. El aumento a 1 : 10 parecía reducir el efecto de la interferencia.

Los resultados se discuten con respecto al control de inocuidad de las vacunas antiaftosas en cultivos hísticos.

#### Literaturverzeichnis

1. HENDERSON, W. M., 1952: J. Hyg. 50, 195. • 2. KÖRNER, L., 1959: Behringwerke Mitteilg. Heft 36, S. 44. • 3. SCHWÖBEL, W., und V. SIEDENTOPF, 1961: Zbl. Bakt. I Orig. 181, 3. • 4 a. BEHRENS, B., 1929: Naunyn-Schmiedbergs Arch. exp. Path. 140, 237. • 4 b. KÄRBER, G., 1931: Ibid. 162, 480. • 5. PRIGGE, R., O. GÜNTHER, O. BONIN und G. EISSNER, 1956: Dtsch. med. Wschr. 81, 325.

Frl. H. CORRENS und Herrn K. STAMPKE danke ich für ihre gute und gewissenhafte technische Assistenz.

Anschrift des Verfassers: Dr. G. Wittmann, 74 Tübingen, Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Waldhäuser Höhe.