

European Commission, The Rules governing Medicinal Products in the European Union, Volume VII, Guidelines for the Testing of Veterinary Medicinal Products, July 1994

Hendriksen, C. F. M. (1996): A Short History of the Use of Animals in Vaccine Development and Quality Control. In F. Brown, K. Cussler and C. Hendriksen (eds.), *Replacement, reduction and refinement of animal experiments in the development and control of biological products* (3-10). Basel: Karger Verlag.

Roberts, B. and Lucken, R. N. (1996). Reducing the Use of the Target Animal Batch Safety Test for Veterinary Vaccines. In F. Brown, K. Cussler and C. Hendriksen (eds.), *Replacement, Reduc-*

tion and Refinement of Animal Experiments in the Development and Control of Biological Products (97-102). Basel: Karger Verlag.

Weißer, K. and Hechler, U. (1997). *Animal Welfare Aspects in the Quality Control of Immunologicals, a critical Evaluation of the Animal Tests in Pharmacopoeial Monographs*. Nottingham: FRAME.

Zeegers, J. J. W., Vries, de, W. F. and Remie, R. (1997). Reducing the use of animals by abolishment of the safety test as a routine batch control test on veterinary vaccines. In L. F. M. B. van Zutphen and M. Balls (eds.), *Animal Alternatives, Welfare and Ethics*. (1003-1005). Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier Science Publishers B.V.

Danksagung

Diese Arbeit wird vom Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie finanziert (BMBF-Projekt-Nr. 0311 423).

Korrespondenzadresse

Dr. Angela Pößnecker
Paul-Ehrlich-Institut,
Abteilung Veterinärmedizin
Paul-Ehrlich-Str. 51 - 59
D-63225 Langen
Tel.: +49-6103-778051
Fax: +49-6103-771254
E-mail: Poesnecker@em.uni-frankfurt.de



Entwicklung eines Lymphozytentransformationstests für die Überprüfung von Fischimpfstoffen

Ralf Peter Pund, Katrin Nold und Elke Henrion

Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV), D-Berlin

Zusammenfassung

Ziel des Forschungsvorhabens ist es, die für die Impfstoffcharakter-Überprüfung notwendigen und gesetzlich vorgeschriebenen Letalchallengerversuche bei Fischen durch einen *in vitro* Test (Lymphozytentransformationstest, LTT) zu ersetzen.

Für die Entwicklung des LTT als *in vitro* Testsystem müssen folgende zwei Fragen beantwortet werden: Reagieren die Lymphozyten von geimpften Fischen anders als die von ungeimpften Fischen, wenn sie mit einem Antigen konfrontiert werden (antigener-mitogener Effekt)? Gibt es eine Korrelation zwischen der Reaktion der Zellen in der Zellkultur und den Ergebnissen der Letalchallengerversuche, d.h. korreliert eine hohe Reaktivität der Lymphozyten mit einem Schutz der Vakzine gegenüber Infektionen?

Für die Etablierung des LTT mussten als Vorbedingungen eine geeignete Blutentnahmetechnik und eine Separationsmethode gefunden werden, um die Lymphozyten aus dem Vollblut zu isolieren. Da die Stimulationsbereitschaft von Lymphozyten von einer Vielzahl von exogenen (kulturelle Versuchsbedingungen) Einflußgrößen beeinflusst wird, wurde überprüft, welche kulturellen Ansprüche Fischlymphozyten besitzen. Weiterhin wurde getestet, inwieweit der sog. MTT-Reduktionstest

(Mikrotetrazoliumtest) für die Sichtbarmachung und Quantifizierung der Zellproliferation geeignet ist.

Summary: Testing fish vaccines with an in vitro lymphocyte blastogenesis assay

Lethal-challenge experiments are provided by German law till now for testing fish vaccines. Finding an in vitro-assay which could replace this experiments was subject of our work. Two questions must have been answered to develop the lymphocyte blastogenesis assay: Do lymphocytes of immunised fish react the same way as lymphocytes of naive fish, being incubated with antigen and is there a coherence between the lymphocyte's in-vitro-response and the immune status of challenged fish.

Methods to take blood samples from anaesthetised fish and to obtain lymphocytes by centrifugation on gradients were worked out and the lymphocyte's demands on culture requirements were evaluated thoroughly because the ability to proliferate depends on many exogenous parameters. Proliferation was represented and measured by a tetrazolium based colorimetric assay (MTT).

Keywords: fish vaccines, cellular immune reactivity, lymphocyte proliferation, MTT

1 Einleitung und Fragestellung

Ziel des Forschungsvorhabens ist es, die für die Wirksamkeitsüberprüfung einzelner Impfstoffchargen notwendigen und gesetzlich vorgeschriebenen Letalchallengerversuche bei Fischen durch ein *in vitro* Testsystem zu ersetzen. Ein in der Säugerimmunologie angewandeter Test hierfür ist der sogenannte Lymphozytentransformationstest (LTT). Dieser Test dient der Überprüfung sowohl der mitogenen (unspezifisch, Primärkontakt) als auch der antigenen (spezifisch, Sekundärkontakt) Stimulierbarkeit von Lymphozyten. Die Sichtbarmachung und Quantifizierung der Lymphozytenproliferation kann durch den sogenannten MTT-Reduktionstest (Mikrotetrazoliumtest) erreicht werden (LTT-MTT). Mit dieser Methode wird die nur in lebenden Zellen stattfindende Reduktion des Tetrazoliumsalzes MTT durch mitochondriale Oxidoreduktasen in das blaue Formazan ausgenutzt, welches photometrisch bei 540-580 nm gemessen werden kann (Moosman, 1983; Weichert et al., 1991).

Aus der Literatur ist bekannt, daß die mitogen- und antigen-induzierte Reaktivität von Säuger- und Vogel-Lymphozyten von einer Vielzahl von exogenen und endogenen Einflußgrößen beeinflusst wird, d.h. von den kulturellen Versuchsbedingungen sowie vom Versuchstier selbst ausgehende Faktoren (immunologischer Status). Für Fischlymphozyten sind diese Einflußgrößen nicht bekannt.

Aus diesem Grund müssen die die Stimulationsbereitschaft der Zellen beeinflussenden Größen als Voraussetzungen für eine Standardisierung und Optimierung des LTT als mögliche, zu etablierende Alternativmethode untersucht werden. Die Standardisierung und Optimierung dieses *in vitro* Tests (LTT-MTT) erfolgt durch die Überprüfung der mitogen- und antigen-induzierten Stimulation von Lymphozyten gegenüber bakteriellen Antigengemischen in Abhängigkeit von diesen unterschiedlichen Meßparametern stellt hierbei der Stimulationsindex dar (Garn, 1993). Im Anschluß daran muß die Korrelation zur tatsächlichen *in vivo* Protektion überprüft werden. Bei ausreichender Übereinstimmung steht dann zur Vakzineüberprüfung ein *in vitro* Test zur Verfü-

gung, der bei der Chargenüberprüfung den Letalchallengetest gänzlich ersetzen kann, bei der Zulassung zumindest partiell. Einmal etabliert, kann er sowohl für die Prüfung weiterer Vakzinen (z.B. Rotmaulseuche) als auch als Screeningtest für die Suche sowie Auswertung von Vakzinekandidaten modifiziert werden, ohne daß Fische getötet werden müssen.

Mit diesem Vorgehen können zum einen die Parameter der Güte der Methode - Objektivität und Reliabilität - ermittelt werden. Zum anderen wird ein normiertes Untersuchungsverfahren als Voraussetzung für eine Validierung im Rahmen von Ringversuchen bereitgestellt. Durch diese Überprüfung würde einerseits die Möglichkeit der Evaluierung gegeben, andererseits würde sie die Aufnahme der Alternativmethode als Prüfrichtlinie in das DAB ermöglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Gewinnung der Lymphozyten aus dem Vollblut

Die Blutentnahme erfolgte nach vorhergehender Betäubung mit Benzocain (50 mg/l Wasser) aus dem Ductus Cuvieri in sterilen heparinisierten Einmalspritzen bei Regenbogen- und Bachforellen mit einem Körpergewicht zwischen 200 und 400 g. Für die Abtrennung der Lymphozyten wurde das Vollblut zentrifugiert (10 Minuten bei 17° C und 500 x g) und die *buffy coat* abpipettiert. Die Zellen (Leukozyten, Thrombozyten, Resterythrozyten) wurden in 5 ml RPMI 1640 (*Gibco Life Technologies*, eingestellt auf 325 mosm/kg) suspendiert und auf die gleiche Menge Lymphozytentrennmedium® (*Gibco Life Technologies*, Dichte 1,077 g/ml) vorsichtig aufgeschichtet. Nach einer 45 minütigen Zentrifugation bei 500 x g und 17° C wurde die zwischen Medium und Lymphozytentrennmedium® liegende Leukozytenbande abpipettiert und 3 mal in 10 ml RPMI 1640-Medium (*Gibco Life Technologies*, eingestellt auf 325 mosm/kg) gewaschen.

2.2 Zellüberlebensraten in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen und Stimulation der Fischlymphozyten durch Mitogene

Die Zellen wurden nach dem letzten Waschgang in verschiedene Kulturmedien (OPTI-MEM 1, RPMI-1640, Leibovitz

15, AIM V, alle *Gibco Life Technologies*) suspendiert und in 96-well Mikrotiterplatten (Rundboden- sowie Flachbodenplatten, Corning) in unterschiedlicher Zellkonzentration in 100 µl Volumina einpipettiert. Die Inkubation der Zellen erfolgte im Begasungsbrutschrank bei 17° C und 95%-iger Luftfeuchtigkeit. Um fisch-physiologische pH-Werte in den Kulturmedien von 7,2 bis 7,4 zu erreichen, wurde in Abhängigkeit der Natriumbikarbonatkonzentration in den Medien eine CO₂-Konzentration von 3-5% gewählt.

Die mitogene Stimulation der Zellen erfolgte mit drei unterschiedlichen inaktivierten *Aeromonas salmonicida* Isolaten in einer Konzentration von 1x10⁸ Bakterien pro 100 µl Zellsuspension. Als Zellkontrolle dienten Zellen ohne Bakterienzusatz. Die Stimulationsversuche wurden bei 5,0 und 7,5x10⁶ Zellen/ml Kulturmedium durchgeführt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten, in der Regel am Tag 0 (Einsatz der Zellen in die Kulturplatten), Tag 2, 4, 6, 8, 10 und 12 wurde zu den einzelnen Kavitäten der Kulturplatten 10 µl einer MTT-Stammlösung (5 mg MTT/ml) hinzupipettiert und nochmals für 12 bis 16 Stunden inkubiert (17° C, 3 bis 5% CO₂). Die sich während dieses Zeitraums in den Zellen gebildeten Formazankristalle wurden durch Zugabe der Hansenschen Lysislösung (Hansen et al., 1989) und 10-stündiger Inkubation bei 45° C, aufgelöst. Die Extinktionsmessung erfolgte im ELISA-Reader bei 550 nm. Für die Berechnung der prozentualen Zellüberlebensraten (ÜR) wurde der Extinktionswert am Tag 0 100% gesetzt und alle anderen, zu den verschiedenen Zeitpunkten gemessenen Werte hierauf bezogen. Es wurden die UR sowohl der stimulierten als auch der nicht stimulierten Zellen (Zellkontrolle) berechnet.

Die Berechnung der Stimulationsindizes erfolgte nach der Gleichung (Extinktionswert stimulierte Zellen / Extinktionswert Zellkontrolle) - 1.

2.3 Mitogene

Für die mitogene Stimulation der Lymphozyten wurden drei *Aeromonas salmonicida* sp. *salmonicida*-Isolate aus der institutseigenen Stammsammlung verwendet. Sie unterschieden sich in ihrer Oberflächenstruktur hinsichtlich der LPS-Ausprägung sowie des Vorhandenseins eines Oberflächenproteins (siehe Tab. 2).

Tabelle 1: Überlebensraten der kultivierten Lymphozyten in Abhängigkeit von der Kulturplattenform und von der Herkunft der Zellen

Fischart (Form der Kulturplatten)	Zellkonzentration [x10 ⁶ /ml Medium]	T ₅₀ -Wert [Tag]
Regenbogenforellen (Flachboden)	2,5	8,0
	5,0	8,5
	7,5	10,0
Bachforellen (Flachboden)	2,5	11,0
	5,0	11,5
	7,5	12,5
Bachforellen (Rundboden)	2,5	12,0
	5,0	12,0
	7,5	20,0
Bachforellen (Flachboden)	2,5	8,0
	5,0	9,0
	7,5	11,0

Verwendung von Flach- und Rundboden-Mikrotiterplatten. Kultivierung der Lymphozyten in supplementiertem RPMI-1640-Medium. Die Überlebensrate wurde als T₅₀-Wert berechnet, d.h. denjenigen Zeitraum, nach dem 50 Prozent der Zellen untergegangen sind.

3 Ergebnisse

3.1 Überlebensraten der Bachforellenlymphozyten in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen

In Abhängigkeit vom gewählten Medium konnte eine unterschiedliche Zellüberlebensrate sowohl für die stimulierten Zellen als auch für die Zellkontrollen ermittelt werden. Beim OPTI-MEM 1- und RPMI 1640-Medium wurden die höchsten Überlebensraten berechnet, sie lagen zwischen 50 und 70% über einen Zeitraum von 10 Tagen. Mit verschiedenen Supplementierungen zu diesen Medien konnten die Zellüberlebensraten im OPTI-MEM 1-

Medium auf 90 - 100 % über einen Inkubationszeitraum von 10 bis 12 Tagen gesteigert werden. Hierbei zeigte sich, daß u.a. Medienzusätze von nicht-essentiellen und essentiellen Aminosäuren, Vitaminen, Fischplasma und ein Gemisch aus Insulin, Transferrin, Selen und Ethanolamin für das Überleben der Zellen notwendig waren.

In Abhängigkeit von der eingesetzten Zellkonzentration konnten unterschiedliche Zellüberlebensraten ermittelt werden. Mit Erhöhung der Lymphozyten-Konzentration in den Kulturplatten von 2,5 auf 7,5x10⁶/ml stieg die Zellviabilität in Abhängigkeit von der Herkunft der Zellen und bei Verwendung unterschiedlicher

Kulturplattenformen an. Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse für die Überlebensraten in Abhängigkeit von der Plattenform (Rundboden- und Flachbodenplatten) und von der Herkunft der Zellen (Regenbogen- und Bachforellen). Die Überlebensrate ist als T₅₀-Wert angegeben; er stellt denjenigen Zeitraum in Tagen dar, nachdem 50% der Zellen untergegangen sind.

Die Überlebensraten der in Rundbodenplatten kultivierten Lymphozyten lagen, verglichen mit den Flachbodenplatten, höher. Besonders auffällig war dies bei einer Zelldichte von 7,5x10⁶/ml. Die T₅₀-Werte konnten hier von 11 auf 20 Tage gesteigert werden. Das supplementierte

Tabelle 2: Stimulation von Bachforellenlymphocyten in Abhängigkeit von verwendeten *Aeromonas salmonicida*-Isolat und der Zellkonzentration

Isolat Nr.	Stammsammlungs-Kennzeichen	LPS	A-Protein	Stimulationsindex SI	
				Zellkonzentration 5,0x10 ⁶ /ml	Zellkonzentration 7,5x10 ⁶ /ml
21	449-T	+	+	0,40	0,80
31	Tg 72/78R	-	+	0,70	0,80
52	MT 085 (Referenzstamm NCMB)	+	-	1,10	1,40

Die Isolate zeichnen sich durch unterschiedliche Oberflächenstruktur aus (LPS und A-Protein). Kultivierung der Lymphocyten in OPTI-MEM 1-Kulturmedien in Flachbodenkulturplatten bei 0,5 und 7,5x10⁶/ml Kulturmedium

RPMI 1640 Medium eignete sich besonders für die Bachforellenlymphozyten, die T_{50} -Werte lagen bei dieser Fischart höher (Tabelle 1).

3.2 Mitogene Stimulation der Fischlymphozyten

Tabelle 2 stellt die Ergebnisse der mitogenen Stimulation von Bachforellenlymphozyten dar. In Abhängigkeit vom verwendeten Bakterienisolat und der eingesetzten Zellkonzentration wurden unterschiedlich hohe Stimulationsindizes (SI) berechnet. Die höchste Zellstimulation mit 1,4 konnte mit dem Isolat 52 bei einer Zelleinsaat von $7,5 \times 10^6$ /ml Kulturmedium erzielt werden.

4 Diskussion

Die Ergebnisse zu den Überlebensversuchen der Lymphozyten zeigten, daß für OPTI-MEM und RPMI-1640 die höchsten Extinktionen nach 12-tägiger Inkubation bei optimal eingestellten CO_2 -Konzentrationen in der Inkubationsatmosphäre ermittelt wurden. Troutadaud et al. (1995) verwendeten eine 1:1 Mischung aus OPTI-MEM und RPMI-1640 (OPTI-1640). Sie stellte das beste Kulturmedium dar, da sie die mitogen-induzierte Lymphozytenproliferation am besten unterstützte. Zudem lieferte sie die konstantesten Ergebnisse im Vergleich zum Leibovitz-15 oder RPMI-1640-Medium alleine. Das OPTI-MEM 1 Medium enthält Insulin, Transferrin und bovines Albumin und eine gegenüber RPMI-1640 signifikant erhöhte Konzentration an essentiellen Aminosäuren. Diese Inhaltsstoffe stellen wichtige und essentielle Faktoren für das Wachstum von Säuger-Lymphozyten dar (Blaehr and Ladgefoged, 1988; Daly et al., 1995; Troutadaud et al., 1995).

Verschiedene Supplementierungen beeinflussen die Vitalität der Lymphozyten. Zum einen können Aminosäuren- oder Vitaminzusätze zu den Kulturmedien die Bikarbonatkonzentration absenken, so daß bei lang andauernder Kultivierung die Pufferkapazität nicht mehr ausreicht, das Medium in Bereichen physiologischer pH-Werte bei konstant gehaltenem CO_2 -Gehalt in der Bebrütungsatmosphäre aufrechtzuerhalten. Zum anderen sind essentielle Aminosäuren oder Vitaminzusätze für eine Ernährung der Zellen sowie Teilungsbereitschaft bei Stimulation mit Mi-

togenen notwendig (Kolb und Grün, 1995).

Die Aminosäurekonzentration der RPMI-1640-Medien sind den kulturellen Ansprüchen von humanen Lymphozyten angepaßt, der Aminosäuregehalt im Plasma ist bei Salmoniden jedoch etwa dreimal so hoch wie bei Säugetieren (Steffens, 1985). Unter der Voraussetzung, daß die Plasmakonzentrationen den Bedarf an diesen Aminosäuren für Zellen widerspiegeln, ist davon auszugehen, daß im RPMI-1640-Kulturmedium die essentiellen Aminosäuren unterdosiert sind und dieses somit kein adäquates Medium für Fischzellen darstellt. Steffens (1985) ist der Ansicht, daß die Aminosäurezusammensetzung des Fischproteins als guter Maßstab für den quantitativen Bedarf der Fische dienen kann.

RPMI-1640 Medium ist ein häufig für die Kultivierung von Fischlymphozyten angewendetes Medium (DeLuca et al., 1983, Yui and Kaattari, 1987; Faisal und Huggett, 1993; Jones et al., 1993; LoPresto et al., 1995), jedoch wurden diesen Medien nur die gängigen Zusätze (l-Glutamin, Antibiotika, fötales Kälberserum, Hepes-Puffer) zugegeben. Erst in der neueren Literatur werden optimierte Medien für die Kultivierung verwendet, die mit essentiellen Aminosäuren angereichert sind (Gudmundsdottir et al., 1995).

Die eingesäte Zellanzahl beeinflusste die Vitalität der Bach- und Regenbogenforellenlymphozyten (Tabelle 1). Je höhere Zellzahlen gewählt wurden, desto länger überlebten die Lymphozyten, gemessen an den T_{50} -Werten. Es existieren in der Literatur nur indirekte Hinweise, die diesen Sachverhalt erklären können. Yachnin et al. (1972) postulierten die sog. Matrixhypothese: je höher die Leukozytenzahl im Kulturgefäß gewählt wird, desto besser stimulieren suboptimale Mitogenkonzentrationen die Zellen. Ein enger Zell-zu-Zell-Kontakt ist für das Ausmaß der mitogen-induzierten Antwort der Lymphozyten ausschlaggebend. In gewissen Grenzen bietet sich hier auch eine Erklärung für die bessere Überlebensrate bei Verwendung hoher Zellzahlen. Auf noch unbekanntem Wege, eventuell über eine gegenseitige Aktivierung oder Zytokinsekretion, beeinflusst der enge Zellkontakt die Überlebensrate der Lymphozyten bzw. Leukozyten. Vermutlich scheint hier auch der Grund für das bessere Abschneiden bei

Verwendung von Rundboden-Kulturplatten zu liegen. Mikroskopische Beobachtungen zeigten, daß nach etwa 1 bis 2 Tagen die Zellen in die Mitte der Rundbodenwells zusammenrutschten, so daß gegenüber der flachen Form bei gleicher Zellzahl der Zell-zu-Zell-Kontakt erhöht war.

Die Ergebnisse der Stimulationsversuche von Bachforellenlymphozyten mit inaktivierten Ganzzellpräparationen dreier *Aeromonas salmonicida* Isolate zeigten, daß die mitogene Zellaktivierung sowohl von der eingesetzten Zellkonzentration als auch von dem gewählten Bakterienisolat abhängig war (Tabelle 2). Die Isolate zeichneten sich durch eine unterschiedliche Oberflächenstruktur aus. Die höchsten mitogenen Stimulationsraten konnten für das *Aeromonas salmonicida*-Isolat 52 festgestellt werden, ein LPS-positives und A-Protein-negatives Bakterium. Hierbei war die Stimulationsbereitschaft der Lymphozyten stark von der verwendeten Zelldichte in den Kulturplatten abhängig.

Die derzeit laufenden Untersuchungen zeigen, daß eine von der mitogenen unterscheidbare antigene Stimulation der Lymphozyten nachgewiesen werden kann. Jedoch sind die bisher erzielten Ergebnisse noch nicht repräsentativ.

Literatur

- Blaehr, H. and Ladgefoged, J. (1988). Mitogen-induced lymphocyte transformation in four different serum-free media. *J. Immunol. Methods* 111, 125-129.
- Daly, J. G., Moore, A. R. and Olivier, G. (1995). A colorimetric assay for quantification of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) lymphocyte mitogenesis. *Fish & Shellfish Immunol.* 5, 265-273.
- DeLuca, D., Wilson, M. and Warr, G. W. (1983). Lymphocyte heterogeneity in the trout, *Salmo gairdneri*, defined with monoclonal antibodies to IgM. *Eur. J. Immunol.* 13, 546-551.
- Garn, H. (1993). *In vitro*-Untersuchungen zur Beeinflussbarkeit verschiedener Funktionen immunkompetenter Zellen durch die pharmakologisch wirksame Verbindung AWD 100-041. *Dissertation, Universität Leipzig*, 1993
- Garn, H., Krause, H., Enzmann, V. and Drößler, K. (1994). An improved MTT assay using the electron-coupling agent menadiolone. *J. Immunol. Methods* 168, 253-256.

- Gudmundsdottir, S., Magnadottir, S. and Gudmundsdottir, B. K. (1995). Effects of antigens from *Aeromonas salmonicida* ssp. *achromogenes* on leucocytes from primed and unprimed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish & Shellfish Immunol.* 5, 495-504.
- Hansen, M. B., Nielsen, S. E. and Berg, K. (1989). Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth / cell kill. *J. Immunol. Methods* 119, 203-210.
- Jones, S. R. M., Stevenson, R. M. W. and Paterson W. D. (1993). Proliferation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) lymphocytes in response to the bacterial pathogen, *Yersinia ruckeri*. *Bull. Aquacult. Ass. Can.* 4, 93-95.
- Kolb, E. und Grün, E. (1995). Die Bedeutung des Vitamin E und des Selens für das Immunsystem des Rindes, insbesondere für die Eutergesundheit. *Der praktische Tierarzt* 9, 749-756.
- LoPresto, C. J., Schwarz, L. K. and Burnett, K. G. (1995). An in vitro culture system for peripheral blood leucocytes of a sciaenid fish. *Fish & Shellfish Immun.* 5, 97-107.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* 65, 55-63.
- Steffens, W. (1985). *Grundlagen der Fischernährung*. Jena: VEB Gustav Fischer Verlag.
- Troutadaud, D., Le Morvan, C. and Deschoux, P. (1995). A serum-reduced culture medium for carp lymphocyte in vitro mitogen-induced proliferation. *Fish & Shellfish Immunology* 5, 81-84.
- Weichert, H., Blechschmidt, I., Schröder, S. and Ambrosius, H. (1991). The MTT-assay as a rapid test for cell proliferation and cell killing: application to human peripheral blood lymphocytes. *Allerg. Immunol.* 37, 139-144.
- Yachnin, S., Lawrence, W. A. Baron, J. M. and Svenson, R. H. (1972). The potentiation of phythamagglutinin-induced lymphocyte transformation by cell-cell interaction; a matrix hypothesis. *Cellular Immunol.* 3, 569-589.
- Yui, M. A. and Kaattari, S. L. (1987). *Vibrio anguillarum* antigen stimulates mitogenesis and polyclonal activation of salmonid lymphocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 11, 539-549.

Korrespondenzadresse

Dr. Ralf Peter Pund
 Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV)
 Alt-Marienfelde 17-21
 D-12277 Berlin



Entwicklung eines ELISA-Systems zur Beurteilung von Furunkulose-Vakzinen

Ulrich Wagner, Dietlind Hädige, Ingolf Lachmann und Karl Drößler
 Institut für Zoologie, Universität D-Leipzig

Zusammenfassung

Als mögliche Alternativmethode zu Letalchallengeversuchen an Fischen wird ein sandwich-ELISA-System entwickelt, mit dem sich Antikörper(Ak)-Populationen mit potentiell unterschiedlichem protektiven Wert nachweisen lassen. Die Testspezifität wird über monoklonale Antikörper (mAk) gegen einzelne Antigene von *Aeromonas salmonicida*, dem Erreger der Furunkulose, festgelegt. Bei Anti-LPS- und Anti-A-Protein-Ak-Analysen von Seren des Atlantischen Lachses wurden mittels ELISA und Antigen-Bindungsassay vergleichbare Resultate erzielt. Diese, wie auch erste Studien an Forellenserren, wiesen auf die Potenz und Spezifität des ELISA-Systems für den selektiven Nachweis einzelner Ak-Populationen hin. Beim Einsatz von zwei A-Protein-spezifischen mAk wurden Hinweise gefunden, daß sich mit diesem Testsystem in den Fischseren zum Teil differente Ak-Populationen, gerichtet gegen den Virulenzfaktor A-Protein, erfassen lassen.

Summary: Development of an ELISA-system for the assessment of furunculosis vaccines

As an alternative method for challenge experiments in fish a sandwich-ELISA has been established for the detection of potentially protective antibody populations. Assay specificity depends on monoclonal antibodies (mAbs) directed against different antigens of *Aeromonas salmonicida*, the causative agent of furunculosis. Comparable levels of salmon antibodies against LPS and the A-layer protein were recorded by ELISA and antigen binding assay. These studies, together with the first analysis of trout sera refer to the specificity and suitability of the ELISA-system for monitoring of individual antibody populations. A study of different mAbs against the A-layer protein points to the possibility for detecting at least partially different antibody populations against this virulence factor.

Keywords: vaccination, furunculosis, ELISA, antibody response, A-layer protein