

Verhalten der antigenen und sonstigen biologischen Eigenschaften menschen- und tierpathogener Virusarten beim Behandeln mit salpetriger Säure

1. Mitt.: Verhalten des Poliomyelitis-Virus

VON HEINZ RESTLE, WALTER HENNESSEN UND WERNER SCHÄFER

Aus der Behringwerke AG, Marburg/Lahn (Wissensch. Leiter: Prof. Dr. H. E. SCHULTZE)
und dem Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen

(Z. Naturforsch. **17 b**, 228—233 [1962]; eingegangen am 28. September 1961)

Die Inaktivierung von Poliomyelitisvirus sämtlicher drei Typen durch salpetrige Säure geht unter den verschiedenen untersuchten Bedingungen über einen relativ großen Bereich von etwa 10^6 – 10^7 infektiösen Einheiten/ml exponentiell vor sich. Die danach übrigbleibenden verhältnismäßig wenigen infektiösen Einheiten werden wesentlich langsamer inaktiviert. Es wird also ähnlich wie bei der Inaktivierung mit Formaldehyd ein „tailing“-Effekt beobachtet. Wird bei Präparaten des Poliomyelitisvirus die Inaktivierung mit salpetriger Säure bis zu einem Stadium durchgeführt, in dem sie nach den staatlichen Prüfungsbedingungen „unschädlich“ sind, so büßen sie ihre virusspezifische, antigene Spezifität ein. Die Herstellung einer den staatlichen Prüfungsbedingungen entsprechenden Poliomyelitis-Vakzine mit Hilfe von HNO_2 ist deshalb nicht möglich.

Die von SCHÄFER und Mitarbb.¹ bei der Inaktivierung verschiedener Virusarten durch salpetrige Säure erhaltenen Ergebnisse regten uns an, einmal nachzuprüfen, ob sich dieses Inaktivierungsverfahren nicht für die Herstellung einer Poliomyelitis-Vakzine eignet, die den staatlichen Prüfungsvorschriften^{2,3} genügt. Im Zuge dieser Arbeiten wurde zunächst die Kinetik der Inaktivierung des Poliomyelitisvirus durch salpetrige Säure unter den verschiedensten Reaktionsbedingungen studiert und darauf das Verhalten der antigenen Eigenschaften der inaktivierten Präparate untersucht. Dabei war zu berücksichtigen, daß an die Poliomyelitis-Vakzine im Hinblick auf die Unschädlichkeit besonders hohe Anforderungen gestellt werden, durch die sie eine Sonderstellung gegenüber allen übrigen Virusimpfstoffen einnimmt. Die salpetrige Säure konnte nur dann als neues Inaktivierungsmittel für die Herstellung des Poliomyelitis-Impfstoffes in Frage kommen, wenn das unter ihrer Einwirkung gewonnene Produkt nicht nur unschädlich ist, sondern gleichzeitig die in den staatlichen Prüfungsbestimmungen^{2,3} weiterhin geforderte antigene

Wirksamkeit besitzt. Eine erfolgreich durchgeführte Unschädlichkeitsprüfung gibt die Gewähr dafür, daß die zu Beginn vorhandene Anzahl von aktiven Viruspartikeln unter kontrollierten Bedingungen definitionsgemäß inaktiviert wurde^{4,5}.

Material und Methoden

1. Virusmaterial

Die Versuche wurden mit den drei verschiedenen Poliomyelitistypen durchgeführt: verwendet wurden die Stämme Mahoney, MEF 1 und Saukett. Das Virus wurde in einschichtigen Affennieren-Zellkulturen⁶ in einem Medium, das 25% synthetisches Nährmedium für Gewebekulturen⁷, nachstehend als SN bezeichnet, 75% Hanksche Salzlösung⁸ und 0,16% Natriumbicarbonat (Festsubstanz) enthielt, meist ohne Antibiotikazusatz gezüchtet. Die Affennieren-Zellkulturen wurden in 0,5-proz. Lactalbuminhydrolysat unter Zusatz von 5% Kälberserum, 0,002% Phenolrot, 0,014% Natriumbicarbonat und 100 γ /ml Chloramphenicol oder 100 E/ml Penicillin und 100 γ /ml Streptomycin angezüchtet. Außerdem wurde dem Medium Neomycin in einer Konzentration von 100 γ /ml zugefügt. Die Virus-suspensionen wurden vor der Verwendung im Versuch durch Seitz-Schichten und Membranfilter ($1 \times \text{US}$, $2 \times 3/400$, $1 \times \text{M} 4$) filtriert.

¹ W. SCHÄFER, TH. ZIMMERMANN u. H. SCHUSTER, Z. Naturforsch. **14 b**, 632 [1959].

² Dritte Fassung der „Vorläufigen Vorschriften für die staatliche Prüfung von Impfstoffen gegen Kinderlähmung (Poliomyelitis)“. — Staats-Anzeiger für das Land Hessen, Nr. 12, 344 [1959].

³ Regulation of Biological Products, part 73. — Publ. Hlth. Serv. Publ. No. 437, revised June 1960.

⁴ O. BONIN u. P. IHM, Z. Immunitätsforsch. **114**, 423 [1957].

⁵ R. PRIGGE, O. GÜNTHER, O. BONIN, G. EISSNER, J. HALLERVORDEN u. J. W. SPAAR, Dtsch. med. Wschr. **81**, 325 u. 377 [1956].

⁶ J. S. YOUNGNER, J. Immunology **76**, 288 [1956].

⁷ J. E. SALK, J. S. YOUNGNER u. E. N. WARD, Amer. J. Hyg. **60**, 214 [1954].

⁸ T. H. WELLER, J. F. ENDERS, F. C. ROBBINS u. M. B. STODDARD, J. Immunology **69**, 645 [1952].

2. Behandlung mit salpetriger Säure

Die Behandlung wurde im Prinzip in der von SCHUSTER und SCHRAMM⁹ beschriebenen Weise durchgeführt. Um eine zu starke Verdünnung des Virusmaterials zu vermeiden, wählten wir die durch die Wasserlöslichkeit der verwendeten Salze gegebenen höchstmöglichen Konzentrationen: $\text{NaNO}_2/8\text{-m.}$, Acetatpuffer 2-m. (Endkonzentration im Versuch $0,25\text{-m.}$). Die Freisetzung der HNO_2 wurde durch Zugabe von 4 Tln. Phosphatpuffer ($0,5$ Tle. $\text{KH}_2\text{PO}_4/0,5\text{-m.}$ und $9,5$ Tle. $\text{Na}_2\text{HPO}_4/0,5\text{-m.}$) und 1 Tl. $\text{NaOH}/2,5\text{-n.}$, wodurch sich ein p_{H} von 7 einstellte, gestoppt. Der Virus-suspension wurde zuerst unter starkem Rühren das NaNO_2 zugesetzt und anschließend der p_{H} -Wert der Reaktionslösung mit Acetatpuffer eingestellt. Alle Versuche wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Angesetzt wurden Chargen von 200–5000 ml Virus-suspension. Durch Kontrollversuche wurde jeweils gezeigt, daß der verwendete Acetatpuffer keine inaktivierende Wirkung ausübte.

Vor der biologischen Prüfung wurden die Reaktionsgemische solange gegen Hank'sche Salzlösung p_{H} 7,2 dialysiert, bis ihre NaNO_2 -Konzentration unter $0,01\text{-m.}$ abgesunken war. Eine $0,01\text{-m.}$ NaNO_2 -Lösung war unter den von uns eingehaltenen Bedingungen für Affennieren-Gewebekulturen nicht mehr toxisch. Die Ermittlung der NaNO_2 -Konzentration erfolgte auf spektralphotometrischem Wege durch Messung der UV-Absorption bei $230\text{ m}\mu$.

3. Infektiositäts- und Neutralisationsteste

Die Bestimmung der Infektiosität der Poliomyelitis-Viruspräparate erfolgte mit Hilfe des Röhrchentestes; die Verdünnungsstufen wurden nach Potenzen von 10 mit $\text{SN}/0,16\%$ NaHCO_3 hergestellt. Jede Stufe wurde mit 6–10 Röhrchen besetzt und der Test 10 Tage nach dem Ansetzen abgeschlossen. Die ID_{50} wurde nach der von REED und MUENCH¹⁰ angegebenen Methode errechnet.

Im Neutralisationstest wurden Serumverdünnungen mit $\text{SN}/0,16\%$ Bicarbonat mit dem Faktor 4 hergestellt und diese gegen eine eingestellte Viruskonzentration von 100–1000 ID_{50}/ml titriert.

4. Komplementbindungs- und Agargel-diffusions-Teste

Die Komplementbindungs-Reaktion wurde quantitativ nach FULTON und DUMBELL¹¹ ausgeführt. Dabei wurde der Komplementverbrauch einer Antiserum-verdünnung von 1:5 für eine Antigenverdünnungsreihe bestimmt. Der Agargeldiffusions-Test wurde nach OUCHTERLONY¹² ausgeführt.

5. Antigene Wirkungsprüfung

Die antigene Wirkungsprüfung wurde mittels des Hühnentestes nach TIMM und McLEAN¹³ und mittels des Meerschweinchentestes nach den staatlichen Prüfungsbestimmungen² durchgeführt. Von 12 unter den oben beschriebenen Bedingungen durchgeführten Versuchsansätzen wurden aus 24 Proben von 525 Hühnchen und 200 Meerschweinchen Antiseren gewonnen. Das Hühnchen- bzw. Meerschweinchenkollektiv, von dem nach Entbluten durch Mischung ein zu testendes Serum erhalten wurde, bestand aus ca. 15 Tieren. Diese Antiseren wurden im Neutralisationstest auf ihre Fähigkeit, aktives Virus zu neutralisieren, geprüft. Um methodische Fehler auszuschließen, wurde die Wirkungsprüfung des Antigens mit und ohne Adjuvans $[\text{Al}(\text{OH})_3]$, mit und ohne vorherige Dialyse, konzentriert und in verschiedenen Verdünnungen durchgeführt.

Ergebnisse

Kinetik der Inaktivierung des Poliomyelitisvirus durch salpetrige Säure unter verschiedenen Bedingungen

Wie schon SCHÄFER und Mitarbb.¹ mit Hilfe des Plaque-Testes gezeigt hatten, geht die Inaktivierung des Poliomyelitisvirus Typ III, (Stamm Leon 12 a 1 b) über einen relativ großen Bereich ($\sim 10^7$ plaquebildende Einheiten/ml) exponentiell vor sich. Die nunmehr durchgeführten Untersuchungen ergaben, daß dies auch für die übrigen Typen des Poliomyelitisvirus zutrifft, selbst dann, wenn man die Reaktionsbedingungen in verschiedener Richtung variiert (s. Abb. 1 und 2).

Mit der Änderung der NaNO_2 -Konzentration, des p_{H} -Wertes und der Temperatur ändert sich lediglich die Reaktionsgeschwindigkeit, nicht aber der exponentielle Verlauf der Kurve im geprüften Bereich. Der Einfluß der Temperatur scheint der Van't Hoff'schen Regel zu folgen (s. Abb. 3). Die gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wird durch die in Abb. 1 zusammengefaßten Experimente belegt. Die eine Inaktivierungskurve (NaNO_2 $0,1\text{-m.}/p_{\text{H}}$ $4,6/20^\circ\text{C}$) resultiert hier aus vier Versuchen, die zu verschiedenen Zeiten im Laufe eines Jahres

⁹ H. SCHUSTER u. W. SCHRAMM, Z. Naturforschg. **13b**, 697 [1958].

¹⁰ L. J. REED u. H. MUENCH, Amer. J. Hyg. **27**, No. 3, 493 [1938].

¹¹ F. FULTON u. K. R. DUMBELL, J. gen. Microbiol. **3**, 97 [1948].

¹² O. OUCHTERLONY, Acta pathol. microbiol. scand. **25**, 186 [1948].

¹³ E. A. TIMM, I. W. McLEAN JR. u. E. Z. ROPE, J. Immunology **80**, 407 [1958].

durchgeführt wurden. Vergleicht man die beschriebenen Ergebnisse mit den bei der Verwendung von Formaldehyd gewonnenen Erfahrungen, so ergibt sich ein bemerkenswerter Unterschied; beim Formaldehyd weicht schon in dem von SCHÄFER und Mit-

arb. ¹ geprüften Bereich die Inaktivierungskurve vom exponentiellen Verlauf ab ¹⁴⁻¹⁸.

Eine gewisse Parallele zum Verhalten gegenüber Formaldehyd wird aber beobachtet, wenn man beim Behandeln mit HNO_2 über den Schnittpunkt der Inaktivierungskurve mit der Abszisse hinausgeht und nach den letzten Spuren von aktivem Virus in großen Stichproben fahndet. Nach den staatlichen Prüfungsvorschriften für Poliomyelitis-Vakzine müssen noch 10^3 ml des Ansatzes frei von aktivem Virus sein. Dies war nach dem in Abb. 4 wiedergegebenen Versuch nicht nach $9\frac{1}{2}$ Stdn. der Fall, wie es nach der Extrapolation der Inaktivierungsgeraden zu erwarten war, sondern erst nach 22 Stunden. (Nach 20 Stdn. Inaktivierung konnte im Unschädlichkeitstest aktives Virus nachgewiesen werden, nach 22 Stdn. nicht mehr.) Bei der Inaktivierung durch Formaldehyd hat man dieses Phänomen als „tailing“-Effekt bezeichnet. Im Ansatz mit HNO_2 ist er, wie Abb. 5 zeigt, um so stärker ausgeprägt, je höher die Konzentration an salpetriger Säure ist.

Verhalten der antigenen Eigenschaften in Viruspräparaten, die durch HNO_2 inaktiviert wurden

Da für die Verwendung als Vakzine nur solche Viruspräparate in Frage kommen, die in einer Stichprobe von 1 l keine nachweisbaren infektiösen Teilchen mehr enthalten, wurden zunächst Virus-Proben auf ihre immunogene Wirkung geprüft, die die-

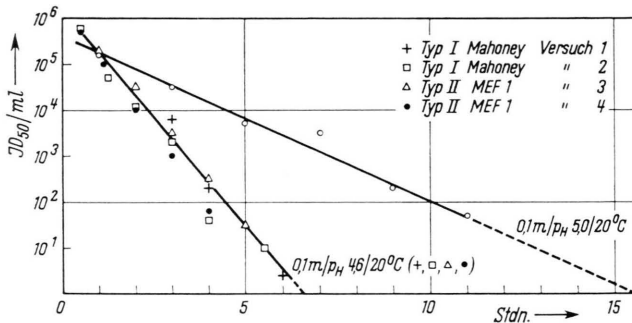


Abb. 1. Inaktivierung von Poliomyelitisvirus Typ I Mahoney bzw. Typ II MEF 1 durch NaNO_2 0,1-m. bei pH 4,6 (20°C) und Typ I Mahoney durch NaNO_2 0,1-m. bei pH 5 und 20°C .

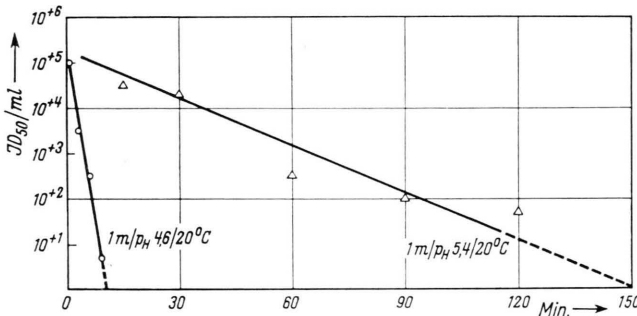


Abb. 2. Inaktivierung von Poliomyelitisvirus Typ I Mahoney durch NaNO_2 1-m. bei pH 4,6 und Typ III Saukett pH 5,4 bei 20°C .

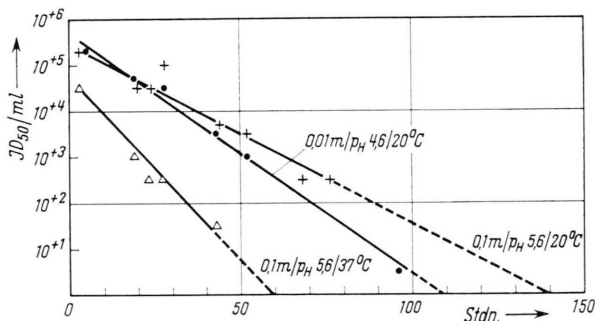


Abb. 3. Inaktivierung von Poliomyelitisvirus Typ III Saukett durch NaNO_2 0,1-m. bei pH 5,6, 20° und 37°C , und Typ I Mahoney bei pH 4,6 0,01-m. und 20°C .

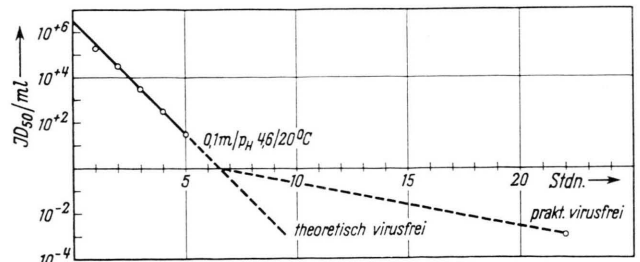


Abb. 4. Inaktivierung von Poliomyelitisvirus Typ I Mahoney durch NaNO_2 0,1-m. pH 4,6 und 20°C . Nach 6,5 Stdn. Inaktivierungsdauer kein meßbarer Virustiter vorhanden. Nach $9\frac{1}{2}$ Stdn. (theoretisch virusfrei) Virus im Unschädlichkeitstest nachweisbar, zwischen 20 und 22 Stdn. ist der Inaktivierungsansatz virusfrei (praktisch virusfrei), s. Text.

¹⁴ S. GARD, Nova Acta Leopoldina **19**, Nr. 134, 133 [1957].

¹⁵ S. GARD, in: The Nature of Viruses, J. & A. Churchill Ltd., London 1957, S. 123.

¹⁶ I. W. McLEAN JR. u. A. R. TAYLOR, in: Progress in Medical Virology, vol. 1, S. 122, herausgeg. v. E. BERGER u. J. L.

MELNICK, S. Karger, Basel u. New York 1958.

¹⁷ M. BÖTTIGER, E. LYCKE, B. MELÉN u. G. WRANGE, Arch. Virusforsch. **8**, 259 [1958].

¹⁸ R. HAAS, L. KÖRNER, V. DOSTAL u. H. SCHWEINSBERG, Z. Hyg. **143**, 490 [1957].

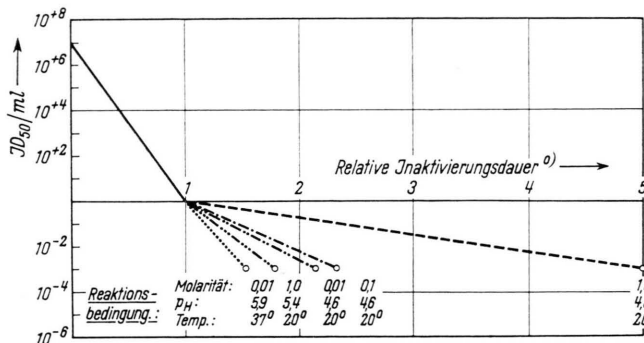


Abb. 5. Abhängigkeit des Zeitpunktes, an dem der Virusansatz gemäß den staatlichen Prüfungsbestimmungen virusfrei befunden wird, von den Reaktionsbedingungen. Die Zeitdauer des Abfalles von 10^7 auf 10^0 ID_{50}/ml wird als 100% festgesetzt.

ser Forderung entsprachen. Wie die in Tab. 1 zusammengefaßten Ergebnisse ausweisen, enthielten sie höchstens noch Spuren desjenigen Antigens, das die Bildung poliomyelitis-spezifischer, neutralisierender Antikörper induziert.

Inaktivierungsbedingungen			Hühnchenversuch		Meerschweinchenversuch	
1-m. $NaNO_2$	pH	Zeit	reziproker Serum-titer	vorgel. ID_{50}/ml	reziproker Serum-titer	vorgel. ID_{50}/ml
1,0	4,6	85'	< 4	152	—	—
1,0	4,6	90'	< 4	745	—	—
0,1	4,6	22h	< 4	832	< 4	330
0,1	4,6	24h	< 4	832	< 4	330
0,01	4,6	25Tg.	4	152	—	—
1,0	5,4	7h	< 4	264	< 4	1920
1,0	5,4	8h	< 4	264	< 4	1920

Tab. 1. Ergebnisse einiger Antigenitätsteste von Proben nach erfolgreicher Unschädlichkeitsprüfung.

Um in Erfahrung zu bringen, wodurch der beobachtete Antigenitätsverlust verursacht wird, wurde folgender Versuch angesetzt: Antigen-wirksames, formaldehyd-inaktiviertes Poliomyelitisvirus des Typ II wurde in verschiedenen Kombinationen mit den einzelnen Zusätzen versehen, die bei der HNO_2 -Behandlung verwendet wurden. Das Virus wurde bei $20^\circ C$ 22 Stdn. mit ihnen inkubiert, also über eine Zeitdauer behandelt, in der unter den Bedingungen $NaNO_2$ 0,1-m., pH 4,6 durch salpetrige Säure ein unschädliches Produkt gewonnen wird. Dieser Versuch, in Tab. 2 zusammengefaßt, zeigt, daß weder die Temperatur noch die für die $NaNO_2$ -Inaktivierung nötige Ionenkonzentration, in Form von NaCl (Endkonzentration im Versuch 17%), noch die Pufferart oder -Konzentration, noch $NaNO_2$

bei neutralem pH-Wert die vorhandene Antigenität beeinflusst. Ausschließlich die Reaktion von freier salpetriger Säure mit dem antigen wirksamen F-Virus während einer Zeitdauer, die bis zu einer erfolgreichen Unschädlichkeitsprüfung erforderlich ist, verändert die Antigenität so, daß ein von diesem Antigen gewonnenes Antiserum nicht mehr spezifisch gegen Poliomyelitisvirus wirkend angesprochen und gemessen werden kann.

In einem weiteren Versuch wurde geprüft, wann der Antigenitätsverlust im Laufe der Inaktivierung

Reaktionsgemisch	pH	reziproker Serumtiter	vorgelegte ID_{50}/ml
F-Virus* + Puffer	4,6	406	504
F-Virus + Puffer + $NaNO_2$	4,6	< 16	504
F-Virus + $NaNO_2$	7,5	512	504
F-Virus + NaCl (17%)	7,5	512	504
F-Virus	7,5	512	504

Tab. 2. Vergleich der antigenen Wirksamkeit eines antigen-wirksamen, formaldehyd-inaktivierten Poliomyelitisvirus Typ II MEF 1 (F-Virus)* nach 22-stdg. Inaktivierung durch $NaNO_2$ 0,1-m. bei pH 4,6 und $20^\circ C$ und nach getrenntem Zusatz der für diese Inaktivierung notwendigen Einzelkomponenten (s. Text).

durch $NaNO_2$ in Erscheinung tritt. Die Versuchsbedingungen können aus Tab. 3 entnommen werden. Sie zeigt, daß in diesem Ansatz nach einer Inaktivierungszeit, die zwischen 60 und 85 Min. liegt, die antigene Wirksamkeit nahezu vollständig verloren geht. Das ist der Zeitraum, zu dem der Impfstoff unschädlich im Sinne der staatlich vorgeschriebenen Prüfungsbedingungen wird.

Inaktivierungsbedingungen			Hühnchenversuch		Meerschweinchenversuch	
1-m. $NaNO_2$	pH	Zeit [Min.]	reziproker Serum-titer	vorgel. ID_{50}/ml	reziproker Serum-titer	vorgel. ID_{50}/ml
1	4,6	10	34	1622	—	—
1	4,6	40	406	182	128	300
1	4,6	50	32	182	128	300
1	4,6	60	88	182	32	300
1	4,6	85	< 4	152	—	—
1	4,6	90	< 4	740	—	—
1	4,6	100	< 4	272	—	—
1	4,6	120	< 4	740	—	—

Tab. 3. Verhalten der Antigenität von Poliomyelitisvirus während der Inaktivierung mit $NaNO_2$ 1-m. pH 4,6. Die Proben ab 85 Min. Inaktivierungsdauer sind nach erfolgreicher durchgeführter Unschädlichkeitsprüfung definitionsgemäß virusfrei.

Inwieweit die vorher vorhandene antigene Wirksamkeit auf restliches, voll aktives Virus oder solches zurückzuführen ist, dessen Antigenität durch Teilreaktionen mit salpetriger Säure noch nicht vollständig geschädigt wurde, läßt sich zur Zeit noch nicht entscheiden.

Der Verlust an virusspezifischer antigener Aktivität kommt auch in der Komplementbindungs-Reaktion zum Ausdruck. In diesem Versuch wurde ein Antigen, das auf die übliche Weise durch Hitze inaktiviert worden war, mit identischen Antigenen verglichen, die verschieden lange Zeiten mit NaNO_2 0,1-m., p_{H} 4,6, behandelt wurden. Die in den NaNO_2 -Ansätzen eingetretene Verdünnung wurde bei der Auswertung in Rechnung gestellt. Verwendet wurde für diesen Versuch ein Poliomyelitisvirus Typ I Mahoney. Abb. 6 läßt erkennen, daß schon nach 8 Std. langer Einwirkung von HNO_2 ein sehr starker Verlust an poliomyelitis-spezifischem, komplement-bindenden Antigen zu verzeichnen ist.

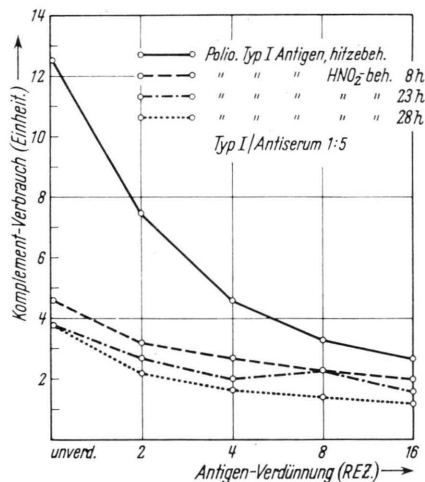


Abb. 6. Auswertung von Poliomyelitis-Antigenen nach unterschiedlich langer Behandlung mit Natriumnitrit (quantitative komplementbindende Reaktion nach FULTON und DUMBELL)¹¹.

Die antigene Komponente des Poliomyelitisvirus ist ein Protein. Durch Untersuchungen an einem anderen Eiweiß-Stoff konnte gezeigt werden, daß auch dieser unter der Einwirkung von salpetriger Säure seine ursprüngliche antigene Spezifität einbüßt. Verwendet wurde für diesen Versuch ein kristallisiertes Rinderalbumin, das mit einem spezifischen Antiserum im Geldiffusionstest nach OUCHTERLONY¹² geprüft wurde. Wie auf Abb. 7 deutlich zu erkennen ist, nimmt mit zunehmender Dauer der Einwirkung von HNO_2 die serologische Spezifität

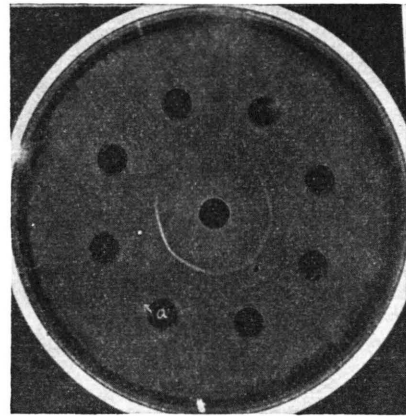


Abb. 7. Geldiffusionstest nach Ouchterlony, mit HNO_2 behandeltes Rinderalbumin und Rinderalbumin-Antiserum.

- a) 0,02% Rinderalbumin-Kontrolle, unbehandelt
- b) 0,02% Rinderalbumin-Kontrolle, unbehandelt
- c) 0,02% Rinderalbumin- NaNO_2 1-m./ p_{H} 4,6/1 h
- d) 0,02% Rinderalbumin- NaNO_2 1-m./ p_{H} 4,6/2 h
- e) 0,02% Rinderalbumin- NaNO_2 1-m./ p_{H} 4,6/3 h
- f) 0,02% Rinderalbumin- NaNO_2 0,1-m./ p_{H} 4,6/ 3 h
- g) 0,02% Rinderalbumin- NaNO_2 0,1-m./ p_{H} 4,6/20 h
- h) 0,02% Rinderalbumin- NaNO_2 0,1-m./ p_{H} 4,6/29 h

Im Zentralpunkt: Rinderalbumin-Antiserum.

des Albumins mehr und mehr ab. Wendet man dagegen eine Formaldehydbehandlung an, wie sie in analoger Weise zur Inaktivierung des Poliomyelitisvirus verwendet wird, so ist ein derartiger Effekt nicht zu beobachten (s. Abb. 8).

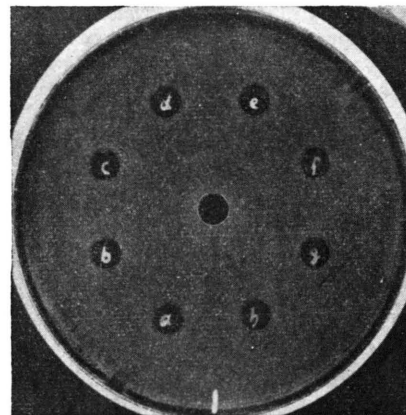


Abb. 8. Geldiffusionstest nach Ouchterlony, mit Formaldehyd behandeltes Rinderalbumin und Rinderalbumin-Antiserum.

- a) 0,02% Rinderalbumin-Kontrolle, unbehandelt
- b) 0,02% Rinderalbumin-Kontrolle, unbehandelt
- c) 0,02% Rinderalbumin- HCHO 1:4500/37°/ 72 h
- d) 0,02% Rinderalbumin- HCHO 1:4500/37°/144 h
- e) 0,02% Rinderalbumin- HCHO 1:4500/37°/216 h
- f) 0,02% Rinderalbumin-Blindwert 1:4500/37°/ 72 h
- g) 0,02% Rinderalbumin-Blindwert 1:4500/37°/144 h
- h) 0,02% Rinderalbumin-Blindwert 1:4500/37°/216 h

Im Zentralpunkt: Rinderalbumin-Antiserum.

Diskussion

Nach dem gegenwärtigen Stand unserer Kenntnisse besteht das Poliomyelitisvirus aus Ribonucleinsäure, die das genetische Material des Virus repräsentiert, und Protein, das Träger der antigenen Wirksamkeit ist und außerdem beim Transport des genetischen Materials an und womöglich auch in die Wirtszelle eine Rolle spielt. Das hier untersuchte Inaktivierungsmittel, salpetrige Säure, greift an beiden Komponenten an. Wie aus den Untersuchungen von SCHÄFER und Mitarbb.¹ sowie von BOEYÉ¹⁹ hervorgeht, führen nicht nur die Veränderungen an der Virusnucleinsäure, sondern offensichtlich auch die am Virusprotein zum Verlust der Infektiosität. Es sind Hinweise dafür vorhanden, daß die entsprechenden Reaktionen am Virusprotein sogar erheblich schneller als an der Virus-Ribonucleinsäure ablaufen. Betrachtet man an Hand dieser Erkenntnisse unsere Resultate über den Verlauf der Inaktivierung des Poliomyelitisvirus durch HNO_2 , so drängt sich die Vermutung auf, daß der zunächst beobachtete, über etwa 7 logarithmische Einheiten laufende, relativ steile, geradlinige Abfall der Infektiosität in erster Linie auf Veränderungen an der Proteinhülle des Virus zurückzuführen ist, während die darauf folgende, wesentlich langsamere ablaufende Inaktivierung der wenigen restlichen infektiösen Einheiten wahrscheinlich in erster Linie auf der Reaktion der HNO_2 mit Virus-Ribonucleinsäure beruht. Womöglich handelt es sich bei den hier noch vorhandenen infektiösen Einheiten um Strukturen, bei denen das Virusprotein nicht mehr die übliche Rolle spielt. Eine gewisse Stütze findet diese hier unterbreitete Hypothese darin, daß nach den Ergebnissen von BOEYÉ¹⁹ das intakte Poliomyelitisvirus etwa 4-mal schneller inaktiviert wird als die freie Virus-Ribonucleinsäure, und daß andererseits die Reaktionsgeschwindigkeiten der von uns unterschiedenen 1. und 2. Phase um einen Wert ähnlicher Größenordnung (2- bis 5-mal) differieren.

Überrascht wurden wir durch die Feststellung, daß bei längerem Einwirken von salpetriger Säure auf das Virus dessen Protein seine spezifische Antigenität verliert. Versuche mit anderen Virusarten hatten vorher ergeben, daß ein merklicher Antigenverlust noch nicht eintritt, wenn man den Inaktivierungsprozeß bis zu einem Stadium treibt, in dem mit weniger eingehenden Prüfverfahren gerade keine infektiösen Teilchen mehr nachweisbar sind. Daß eine Änderung in der Antigenstruktur durch salpetrige Säure nicht nur bei den Virusproteinen, sondern auch bei solchen anderer Herkunft erfolgt, beweist das mit Rinderalbumin durchgeführte Experiment.

Es ist noch ungeklärt, welche chemischen Veränderungen der Virusproteinhülle bei der Reaktion mit salpetriger Säure den Verlust der Antigenität verursachen. Desaminierungen sowie möglicherweise Nitrierungen der aromatischen Aminosäuren sind die Folgen der Einwirkung von salpetriger Säure. Demnach stellen die reaktionsfähigen primären Aminogruppen und/oder die aromatischen Aminosäuren der Virusproteine die wesentlichen Faktoren ihrer antigenen Spezifität dar.

Auf Grund der in den beschriebenen Untersuchungen gesammelten Erfahrungen ist die salpetrige Säure nicht für die Herstellung einer den derzeitigen staatlichen Prüfungsbestimmungen genügenden Poliomyelitis-Vakzine geeignet. Es sei allerdings darauf hingewiesen, daß die Definition des Begriffes „unschädlich“ bei der Poliomyelitis-Vakzine besonders streng gefaßt ist und daß sie in dieser Beziehung eine Sonderstellung unter den Virusimpfstoffen einnimmt.

Herrn Prof. SCHRAMM und Herrn Prof. SCHULTZE sind wir für wertvolle Anregungen zu Dank verpflichtet. Für technische Hilfe danken wir Herrn A. EBERT.

¹⁹ A. BOEYÉ, *Virology* **9**, 691 [1959].