

Abstammung, Eigenschaften und Verwendung des attenuierten Vaccinia-Stammes MVA

Zusammenfassung: Das MVA-Virus repräsentiert ein Labor-Virus, das sich durch zahlreiche biologische Marker von den bekannten Vaccinia-Stämmen wie auch von den anderen Viren der Orthopox-Gruppe sicher differenzieren läßt. Es kommt nicht in der Natur vor und besitzt für Mensch und Tiere bei fehlender Kontagiosität nur noch eine geringgradige Virulenz. Es kann ohne Gefahr sowohl parenteral wie auch lokal, insbesondere oral und intrakutan, appliziert werden. Nach lokaler Verabreichung induziert es sehr stark die Bildung von endogenem Interferon. Voraussetzung hierfür ist die Impfung mit hohen Virusdosen (über $10^{7.5}$ FHE-KID₅₀/ml).

Mit dem MVA-Virus steht ein Impfvirus zur Prophylaxe und Bekämpfung von Orthopox-Viruserkrankungen zur Verfügung, das in der Human- und Tiermedizin gleichermaßen ohne Schaden für den Impfling wie für die Umgebung verwendet werden kann. Es eignet sich auch für Inkubations- und Notimpfungen.

Einleitung

Das Vaccinia-Virus bildet zusammen mit dem Variola- und Alastrim-Virus und weiteren 8 Tierpocken-Spezies (Kuhpocken-, Büffelpocken-, Kaninchenpocken-, Pferdepocken-, Elefantenpocken-, Mäusepocken-, Affenpocken- und Kamelpockenvirus) eine sehr einheitliche Virusgruppe der Orthopoxviren, die zur Familie „Poxviridae“ gehört. Die Orthopoxviridae stimmen in ihren morphologischen und chemisch-physikalischen Eigenschaften weitgehend überein. Nach der üblichen Virusklassifizierung gehören sie zu dem gleichen Serotyp (21). Man kann mit jeder der 11 Virusarten gegen die heterologe Pockenerkrankung kreuzweise immunisieren, wobei die originären Menschen- und Tierpockenviren jeweils besser immunisieren. Eine Ausnahme macht das Vaccinia-Virus, das gegen all diese Erkrankungen gleichermaßen gut immunisiert.

Das Vaccinia-Virus besitzt auch das breiteste Wirtsspektrum. Es ist für Mensch und Tier infektiös. Unter den Säugetieren stecken sich besonders leicht Rinder, Schweine, Pferde, Esel, Schafe, Ziegen, Kaninchen, Affen, Büffel, Kamele, Elefanten und Zootiere an. Natürliche Infektionen sind möglich, jedoch selten. Üblicherweise erkranken die Tiere im Zusammenhang mit der Pockenschutzimpfung des Menschen. Die Infektionen können zu einer lokalen oder generalisierten Erkrankung führen. Die lokale Erkrankung dominiert. Generalisierte Vaccinapocken treten bevorzugt bei Pferden, Kamelen, Elefanten, Schweinen, Kaninchen und bei Jungtieren auf.

Die anderen Orthopoxviren verhalten sich demgegenüber relativ wirtsspezifisch. Variola- und Alastrimvirus

Summary: *Passage History, Properties and Applicability of the Attenuated Vaccinia Virus Strain MVA.* Vaccinia virus strain MVA is derived from Vaccinia virus strain Ankara through 530 continuous passages in cell cultures of chick embryo fibroblasts. Strain MVA can be differentiated from all known strains of vaccinia virus and other members of the orthopox group. It does not occur naturally, and is of low virulence for man and animals; local and parenteral application are innocuous. This particularly applies to oral and intracutaneous administration. Strain MVA strongly induces local endogenous interferon if applied to the mucous membranes in concentrations above $10^{7.5}$ CEF-ID₅₀.

It also induces clinical immunity against diseases caused by orthopox viruses, including experimental smallpox. Repeated revaccinations are innocuous and strongly enhance the immunizing effect.

Strain MVA primarily stimulates cellular immunity; antibody production is less prominent. Cellular defense is of primary importance in pox virus immunity.

erzeugen die Menschenpocken, die Tierpockenviren die jeweilige originäre Pockenerkrankung beim Rind, Affen, Kamel usw. Während das Variola- und Alastrimvirus vom Menschen unter natürlichen Bedingungen nicht auf Tiere übergeht (9), können die originären Tierpockenviren mit Ausnahme des Ektromelievirus durch intensiven direkten oder indirekten Kontakt auf den Menschen übertragen werden. Sie führen dann i. d. R. zu gutartigen Lokalerkrankungen. Bei hochempfindlichen Kindern und bei besonders disponierten Personen können sie darüber hinaus schwere Allgemeinerkrankungen auslösen. Unabhängig von der Verlaufsform sind sie aber durch ihre geringe bis fehlende Kontagiosität charakterisiert.

Gegen die Pockenerkrankungen bei Mensch und Tier kann man bisher wirksam nur mit Lebendvaccinen prophylaktisch immunisieren. Der für den spezifischen Schutz verantwortliche Mechanismus scheint sowohl auf der Bildung von Immunzellen als auch auf humoralen Abwehrfaktoren zu beruhen. Es wäre ideal, wenn wir für die aktive Immunisierung gegen alle durch Orthopockenviren hervorgerufenen Erkrankungen stets das gleiche Impfvirus benutzen könnten, ohne daß dadurch Mensch, Tier und Umwelt gefährdet würden. Die derzeit für die Pockenschutzimpfung des Menschen benutzten

In der Schriftleitung eingegangen: 3. Juni 1974

Prof. Dr. Dr. A. Mayr, Institut für Mikrobiologie und Infektionskrankheiten der Tiere der Universität, D-8000 München 22, Veterinärstr. 13; Dr. V. Hochstein-Mintzel, Prof. Dr. H. Stickl, Bayerische Landesimpfanstalt, D-8000 München, Am Neudeck 1.

Vaccinia-Stämme erfüllen diese Forderung nicht. Dies gilt auch für den von der WHO empfohlenen Stamm *Elstree* (vergleiche vorher).

Wir versuchten deshalb, das Vaccinia-Virus durch kontinuierliche Passagen in verschiedenen Zellsystemen unter Erhalt seiner immunologischen Eigenschaften so abzuschwächen, daß es obiger Forderung entspricht. Gleichzeitig sollte ein Impfvirus erhalten werden, mit dem man auch ohne Schaden parenteral oder oral immunisieren kann, das bei lokaler Anwendung eine rasche Bildung von endogenem Interferon induziert, keine Kontagiosität für Mensch und Tier besitzt, beim Tier unter natürlichen Verhältnissen nicht vorkommt und schließlich Inkubationsimpfungen ohne Gefahr erlaubt.

Die Attenuierung von Feldviren mit dem Ziele, Impfstämme für die Herstellung von Vaccinen zu erhalten, ist nicht neu. Zahlreiche bewährte Lebendvaccinen, die heute auf der ganzen Welt in der Human- und Tiermedizin in Gebrauch sind, gehen hierauf zurück. Über die Attenuierung von Vaccinia-Virus und seine Verwendung als Impfstoff beim Menschen liegen relativ wenig Erfahrungen vor, obwohl *Rivers und Mitarbeiter* bereits 1931 hierauf aufmerksam gemacht haben (23, 24, 26). Sie passierten das Vaccinia-Virus auf der Choriollantoismembran von Hühnerembryonen. *Kempe* führte 1968 diese Untersuchungen weiter und impfte mit einem derartigen "Ei-Virus" mit Erfolg Ekzempatienten (12). Eine Attenuierung von Vaccinia-Virus über Zellkulturen ist ebenfalls versucht worden (1, 3, 4, 13, 22, 23). In jedem Fall kam es zu Veränderungen bestimmter biologischer Eigenschaften des Vaccinia-Virus, die mit einer Virulenzabnahme für Versuchstiere parallel ging. Eine Zusammenstellung dieser Arbeiten erfolgte kürzlich (10).

1. Abstammung des MVA-Virus und Attenuierung

Das MVA-Virus geht auf den Dermovaccinia-Stamm CVA zurück. Er wurde in der Türkei (Impfanstalt Ankara) viele Jahre über Esel-Kalb-Esel-Passagen gehalten und diente dort als Grundlage für den Menschenpocken-Impfstoff. Als Ausgangsmaterial benutzte man die Pustelernten der jeweiligen Eselpassagen. 1953 ist er von uns gereinigt (fraktionierte Ultrazentrifugation) und zweimal über das Rind (kutane Flächenimpfung) passiert worden und kam dann in den Jahren 1954/55 in der Bundesrepublik als Pockenschutzimpfstoff in den öffentlichen Verkehr (8). Während dieser Zeit haben wir das CVA-Virus zusammen mit weiteren Dermo-, Neuro- und Hodenvaccinen des In- und Auslandes im Vergleich mit anderen Tierpockenviren biologisch und serologisch auf Unterschiede untersucht.

Zuerst überprüften wir das Verhalten der einzelnen Virusstämme im zehn Tage alten Hühnerembryo nach Beimpfung der Chorioallantoismembran (CAM) und im Kaninchen nach intrakutaner (i.cut.) und intravenöser (i.ven.) Impfung. Das CVA-Virus war im Ei sehr virulent und charakterisiert

1. durch flache, scharf konturierte Primär- und Sekundärherde, mit breiter, tiefer zentraler Nekrose,
2. 100 %iger 4+ Generalisierung,
3. Neigung zur Nebenpockenbildung,
4. starker Gefäßwirksamkeit ohne hämorrhagischen Einschlag,
5. 100 %iger Absterbequote bei relativ früher Generalisierung,
6. Hautpocken beim Hühnerembryo.

Im Kaninchen verhielt sich der CVA-Stamm umgekehrt. Er war relativ gewebefreundlich. Nach intrakutaner Impfung entwickelten sich gut abgesetzte Infiltrate ohne zentrale Nekrose, ohne Hämorrhagie, ohne Nebenpocken bei fehlender Generalisierung und rascher Rückbildung. Die intravenöse Applikation erzeugte kurzes Fieber (2 bis 3 Tage), ohne daß es an Haut und Schleimhäuten zu einer sichtbaren Generalisierung kam (6, 7).

In 3 bis 5 Tage alten Mäusen führte das CVA-Virus bei intraperitonealer Applikation zu einer generalisierten Pockenerkrankung, an deren Verlauf die Tiere eingingen. Auf zellulärer Ebene besaß das Virus ein sehr breites Wirtsspektrum, vermehrte sich mit hohen Titern und war für alle Zellkulturen lytisch (8, 22, 28).

Verschiedene Vaccinia-Stämme (Ei-Virus, Kultur-Virus) agglutinierten unabhängig von ihrem Infektiositätstiter gleiche Hühnerblutkörperchen unterschiedlich stark. Der Stamm CVA besaß eine gute hämagglutinierende Aktivität (16).

Bei der Anwendung am Menschen (Erstimpflinge) unterschied sich der Stamm CVA bezüglich der vaccinalen Lokal- und Allgemeinreaktionen nicht von anderen Dermovaccinia-Stämmen. Auch der Prozentsatz der verschiedenen postvaccinalen Komplikationen war gleich. Signifikant unterschiedlich war jedoch die Neigung des CVA-Virus zur Ausbildung von Nebenpocken und der späte Krustenabfall bei Impfblättern. Bei annähernd gleich großer Erstimpflingszahl wurden in den Jahren 1954/55 im Einzugsbereich der Impfanstalt München vom Stamm CVM in 13 Fällen, vom Stamm CVB in 50 Fällen und vom Stamm CVA dagegen in 781 Fällen Nebenpocken gemeldet (8). Diese Befunde waren der Anlaß, daß der Stamm CVA in den folgenden Jahren für die Herstellung von Pockenimpfstoff in der Impfanstalt München nicht mehr benutzt wurde.

Für unsere Attenuierungsversuche erschien uns der CVA-Stamm wegen seiner charakteristischen, biologischen "Marker" besonders geeignet: Gewebefreundliches Verhalten beim Kaninchen, rasche und starke Generalisierung im bebrüteten Hühnerrei, starke und breite, zentrale Nekrosebildung der Primär- und Sekundärherde auf der CAM bei verhältnismäßig geringer mesenchymaler Reaktion, Hautpocken beim Hühnerembryo, starke Virulenz für infantile Mäuse, breites Wirtsspektrum in Zellkulturen mit Lysis der befallenen Zellen, gute hämagglutinierende und immunisierende Aktivität und

schließlich beim Menschen Neigung zu Nebenpocken und spätem Krustenabfall der Impfpusteln.

1958 begannen wir mit den Attenuierungsversuchen durch fortlaufende Passierung des CVA-Virus (zellfreies Virus) mittels der Endverdünnungsmethode in verschiedenen, primären Zellkulturen (Röhrchen, die End-Virusverdünnungen enthielten). Nach 300 Passagen stellten wir durch Vergleichsuntersuchungen fest, daß sich das Virus in den Hühnerembryofibroblasten (FHE-)Kulturpassagen stärker verändert hatte als in den Zellkulturen aus Säugetierzellen (Kälber- und Schweinenieren-Kulturen). Folglich passierten wir das CVA-Virus in den FHE-Kulturen weiter. Für die Herstellung der Kulturen benutzten wir Eier aus einer gesundheitlich überwachten Geflügelfarm. Als Medium diente sterile Rinderamniotflüssigkeit (Technik bei Mayr und Kalcher, 1960 [17]). Die Virusernte erfolgte stets am Höhepunkt des cytopathischen Effektes. Von jedem Kulturansatz wurden nichtbeimpfte Kontrollkulturen auf ungewollte Viruskontaminationen überprüft. In Zweifelsfällen sind die entsprechenden Passagen verworfen worden. Nach der 360. Passage wurde das Virus mittels der Plaque-Methode klonisiert. Es sind hierfür drei aufeinanderfolgende Plaque-Passagen durchgeführt worden, wobei das Material der Isolierplaque jeweils in Verdünnungen in neuen Plaque-Schälchen autitriert wird und für die Weiterpassierung immer wieder Schälchen mit nur einer Plaque (Endverdünnungsmethode) verwendet werden (20).

1963 untersuchten wir die 370./371. Passage des FHE-Virus morphologisch, serologisch und biologisch im Vergleich zu dem CVA-Ausgangsvirus und anderen Dermo- und Ei-Vaccinia-Stämmen (22). Der typische Vaccinecharakter war vollkommen verschwunden. Das FHE-Passagevirus glich nur noch morphologisch dem Ausgangsvirus. Das auffälligste Merkmal war der Verlust bzw. die starke Verminderung seiner Virulenz für das Kaninchen, für die Babymaus und für bestimmte Zellkulturen. Auch im Hühnerembryo (CAM-Impfung) wies es keine typischen Vaccinia-Eigenschaften mehr auf. Anstelle von flachen Herden mit tiefer zentraler Nekrose (Ausgangsvirus) entstanden beim FHE-Virus kleine, kompakte Proliferationsknötchen ohne Nekrose. Die Virulenz (Gefäßschädigung, Mitbeteiligung der Umgebung, Absterberaten) war gegenüber den Kontrollen ebenfalls stark erniedrigt, während die Generalisierungstendenz erhalten blieb. Im Kreuzneutralisierungstest wurde es von spezifischen Vaccinia-Immunsereen neutralisiert. Seine hämagglutinierenden Aktivitäten waren erniedrigt. Die Kontrolle auf eine Kontamination mit Fremdviolen verlief negativ.

Seit dieser Zeit wird das CVA-FHE-Virus weiter in FHE-Kulturen passiert. Es hat inzwischen die 570. Kulturpassage erreicht und scheint genetisch einheitlich und stabil zu sein. Die letzten Passagen sind nochmals mittels der Plaque-Endverdünnungsmethode klonisiert worden. Die für die Plaque-Schälchen benutzten Eier stammten aus einem anerkannten leukosefreien Geflügelbestand.

Ab der 516. FHE-Passage erhielt das CVA-FHE-Virus nach seiner klinischen Überprüfung beim Menschen wegen der Stabilität seiner veränderten Eigenschaften und um Verwechslungen mit anderen attenuierten Vaccinia-Stämmen auszuschließen den Namen **MVA-Virus = Modifiziertes Vaccinia-Virus Ankara** (10, 27).

2. Eigenschaften des MVA-Virus

Das MVA-Virus gleicht morphologisch und strukturell dem allgemeinen Aufbau der Viren der Orthopox-Gruppe. Auch serologisch und immun-biologisch gehört es zu dem die Orthopox-Viren charakterisierenden Serotyp. Biologisch besitzt das MVA-Virus jedoch stabile Marker, die eine Differenzierung von den anderen Spezies der Orthopox-Viren ermöglichen.

Das MVA-Virus läßt sich von den anderen Vaccinia-Stämmen und den übrigen Spezies der Orthopox-Viren sicher differenzieren durch sein pathogenetisches Verhalten

1. im Hühnerembryo nach CAM-Beimpfung = *CHE-Marker*,
2. in verschiedenen Zellkulturen = *TC-Marker*,
3. im Kaninchen = *R-Marker*,
4. in der infantilen und erwachsenen Maus = *M-Marker*,
5. im Huhn = *F-Marker*,
6. im Affen = *MK-Marker*,
7. im Menschen = *H-Marker*.

Neben obigen Markern besitzt das MVA-Virus die Fähigkeit, besonders stark die Bildung von endogenem Interferon zu induzieren. Neben der Bildung von Interferon kommt es dabei zu einer starken Erhöhung der Phagozytoserate. Die Interferoninduktion ist bei Verabreichung großer Virusmengen (über $10^{7.5}$ FHE-KID₅₀/ml) stärker als bei Impfung mit niedrigen Dosen.

Die Bildung von endogenem Interferon wurde überprüft beim Kaninchen. Die Kaninchen erhielten 3mal im Abstand von Stunden je 0,2 ml MVA-Virus (Titer $10^{7.5}$ FHE-KID₅₀/ml) intranasal verabfolgt. Vor der Applikation und 6, 12, 24 und 48, 72, 96 Stunden danach wurde von den Tieren Blut genommen und das Serum (Ansäuerung über Nacht pH 2) auf Gehalt an Interferon ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mit dem Plaque-Hemmtest in RK-13-Zellkulturen nach den bekannten Verfahren. Als Testvirus diente Sindbis-Virus, Stamm AR 86, gezüchtet in den entsprechenden Zellkulturen. Die Virusgebrauchsdiagnose betrug 50—80 plaquebildende Einheiten. Die Interferonaktivität der Proben wurde in Interferoneinheiten pro ml gemessen (effektive Dosis 50 % = ED₅₀). Eine ED₅₀ ist der reziproke Wert der letzten Verdünnungsstufe des Untersuchungsmaterials, in der noch eine mindest 50 %ige Reduktion der Zahl der Plaques gegenüber den entsprechenden Kontrollen auftritt. Vor der Behandlung war das Serum der Tiere negativ. Bereits nach 6 Stunden traten im Schnitt

Seruminterferonwerte zwischen 16 bis 64 auf. Die Interferontiter (ED₅₀/ml) stiegen dann bis zum 3. Tag laufend an und erreichten Werte um 256. Am 4. Tag sanken die Titer wieder leicht ab.

Neben der Induktion von endogenem Interferon prüften wir die Bildung von Interferon in Hühnerembryofibroblasten-Zellkulturen nach Inkubierung mit UV-inaktiviertem, hochpassiertem Virus. Mit Hilfe von Vaccinia-Virus der hohen Zellkulturpassagen (428.—458. Passage) konnten nach UV-Inaktivierung gleicher Virusmengen bessere Interferone hergestellt werden als mit Virusstämmen der niedrigen Kulturpassagen (11. und 12. Passage). Interferone aus UV-inaktiviertem Virus der hohen Passage erreichten gegen Sindbis-Virus Werte bis 1024 ED₅₀/ml (Plaquetest mit 20—50 plaquebildenden Einheiten), während die Werte bei Verwendung von UV-inaktiviertem Virus der niedrigen Passage bei 64—128 lagen (17).

Die Erhöhung der Phagozytoserate wurde im Phagozytostest in der Maus (NMRI-Mäuse) geprüft. Das Verfahren basiert auf der Bestimmung der Ausscheidungsrate von Kohlepartikeln aus dem zirkulierenden Blut. Die Tiere wurden mit je 0,3 ml MVA-Virus (Titer 10^{7,5} FH_E-KID₅₀/ml) i.p. geimpft. 48 Stunden später führten wir den Test nach dem Verfahren *Buschmann*

und Mitarbeiter (2) durch. Der Phagozytoseindex K, der die Ausscheidungsgeschwindigkeit der Kohlepartikel aus dem Blut angibt, lag bei der Kontrollgruppe (30 Tiere) relativ konstant zwischen 0,029 548 und 0,031 089. Bei den Versuchstieren (3 Gruppen à 30 Tiere) erhöhte er sich signifikant auf 0,040 811 bis 0,043 212.

Einen Überblick über die verschiedenen, biologischen Marker des MVA-Virus vermitteln die Tabellen 1, 2 und 3.

Das MVA-Virus stellt ein artifizielles Laborprodukt dar, das biologisch mit keiner der bekannten, natürlich vorkommenden Orthopox-Viruspezies übereinstimmt und in der Natur nicht vorkommt. Es läßt sich von all diesen Virusarten gut differenzieren. Auf seine Abstammung von Vacciniavirus und seinen Vaccinia-Charakter weist der F-Marker hin. Kutan verabreicht erzeugt das MVA-Virus bei Junghühnern (Follikelmethode) eine milde Follikelreaktion (zirkumskripte Anschwellung der Follikel ohne Area), die für Vaccinia-Viren nach *Mayr* typisch ist (18). Bei nicht attenuierten Vacciniastämmen verläuft die lokale Follikelreaktion wesentlich stärker und tritt auch bei Küken auf.

Das empfänglichste Wirtssystem für das MVA-Virus stellt der Hühnerembryo nach Beimpfung der CAM dar. Im Hühnerembryo (CHE-Marker) ist das MVA-

Tabelle 1: CHE- und TC-Marker des MVA-Virus im Vergleich zum CVA-Dermovaccinia-Ausgangsvirus

Art	Marker		MVA-Virus	CVA-Ausgangsvirus
		Bezug		
<i>CHE</i> Beimpfung der CAM von 10 Tage alten Hühnerembryonen, 37° C Bebrütung, Bezugswert: 4. Tag p. inf.	<i>p</i> : Charakter der Primärherde		A: kleine, kompakte Proliferationsknötchen ohne zentrale Nekrose	A: flache Herde mit tiefer, breiter zentraler Nekrose
	<i>m</i> : %o-Satz der Absterbequoten		B: 40	B: 100
	<i>g</i> : %o-Satz der Generalisierung		B: 100	B: 100
	<i>qu</i> : Quantität der Generalisierung		B: + bis ++++	B: ++++
	<i>op</i> : andere Eigenschaften		∅	Nebenpocken, Hautpocken am Embryo
<i>TC</i> Beimpfung primärer Zellkulturen und Zell-Linien, Bezugswert: 10 ⁸ FHE-KID ₅₀ /0,1 ml	<i>fhe</i> : Hühnerembryofibroblasten		V: ++++ L: ++++ CPE: kleine Abkuglung mit granulärem Zerfall	V: ++++ L: ++++ CPE: schollige Degeneration, Zellverschmelzung, Lysis
	<i>pk</i> : Schweinenieren-Zellen		V: ++ L: (Plaque)	V: ++++ L: ++++
	<i>kk</i> : Kälbernieren-Zellen		V: ± L: O	V: ++++ L: ++++
	<i>kt</i> : Kälberhoden-Zellen		V: ± L: O	V: ++++ L: ++++
	<i>h</i> : HELA-Zellen		V: ± L: O	V: ++++ L: ++++

Anmerkung: A = 10—15 FHE-KID₅₀/0,1 ml V = Virusvermehrung CPE = Art des zytopathischen Effektes
 B = 10^{3,9} FHE-KID₅₀/0,1 ml L = Lysis der Zellkulturen

Tabelle 2: R-, M-, F-Marker des MVA-Virus im Vergleich zum CVA-Dermovaccinia-Ausgangsvirus (Bezugswert 10⁶·FHE-KID₅₀/ml)

Art	Marker		MVA-Virus	CVA-Ausgangsvirus
		Bezug		
R Kaninchen, weiße Dtsch. Riesen, 6 Monate alt	<i>iv</i> intravenös	1,0 ml	G ϕ	G ϕ
	<i>ik</i> intrakutan	0,1 ml	P ϕ	P + + + +
	<i>k</i> kutan, Skarifikations- methode,	0,05 ml	P ϕ	P + + + +
M infantile (1—3 Tage alt) und erwachsene Maus (12—15 g)	<i>ip</i> infantile Maus, intrapitoneal,	0,1 ml	M ϕ	M 80
	<i>ic</i> infantile Maus, intrazerebral,	0,05 ml	M ϕ	M 100
	<i>ica</i> erwachsene Maus, intrazerebral,	0,1 ml	M ϕ	M 100
F Küken und Junghühner	<i>k</i> kutane Follikelimpf.	0,05 ml	Küken: P ϕ Huhn: P +	Küken: P + + + Huhn: P + + + +

Anmerkungen: G = %o-Satz der Generalisierung

P = Stärke der Primärreaktion an der Impfstelle
M = %o-Satz der Todesfälle

Virus charakterisiert durch kleine, kompakte oftmals kommaförmig ausgezogene Proliferationsknötchen (Primärherde und Sekundärherde) mit einem schmalen Trübungssaum ohne zentrale Nekrose. Die Virulenz für den Hühnerembryo hat es entsprechend seiner laufenden Passierung in FHE-Kulturen nicht verloren, jedoch

merklich verringert. Bis zum 4. Tag p. inf., dem Zeitpunkt, an dem das CVA-Ausgangsvirus zu 100 % bei einer Absterbequote von 100 % generalisiert, sind beim MVA-Virus nur 40 % der Embryonen bei einer Generalisierungsquote von 100 % abgestorben. Der Zeitpunkt bis zur Generalisierung verlängerte sich um 20

Tabelle 3: MK- und H-Marker des MVA-Virus im Vergleich zum CVA-Dermovaccinia-Ausgangsvirus (Bezugswert: 10⁶·FHE-KID₅₀/ml)

Art	Marker		MVA-Virus	CVA-Ausgangsvirus
		Bezug		
MK Affen, <i>Macacus irus</i> , unbestimmtes Alter	<i>ik</i> 0,2 ml		P ϕ	P + + + +
	<i>k</i> 0,05 ml		P ϕ	P + + + +
	<i>b</i> buccal,	0,1 ml	P ϕ	P + + + +
	<i>ith</i> intrathalamisch,	0,1 ml	MB ϕ	MB 100
H Mensch, Erstimpfling	<i>ik</i> 0,2 ml		P + Rötung, schwache Infiltration bis 20 mm	P + + + + starke Reaktion mit Pustel- bildung und Nekrosen
	<i>i.m.</i> intramuskular,	0,2 ml	P ϕ	nicht untersucht
	<i>k</i> Schnittimpfung		P ϕ	P + + + + starke normale Erstimpfreaktion

Anmerkungen: siehe Tabelle 2

MB = %o-Satz der Erkrankungen

bis 24 Stunden. Die Quantität der Generalisierung ist von der Impfvirus-Menge abhängig. Bei Impfdosen unter 10^2 KID₅₀ beträgt sie +, bei einer Animpfmenge über 1000 dagegen +++. Seine Fähigkeit, Nebenpocken und Hautpocken am Embryo zu erzeugen, hat es verloren. In den Abb. 1 und 2 sind die unterschiedlichen Chorioallantoismembran-Bilder der Primär- und Sekundärherde zwischen dem CVA-Ausgangsvirus (Abb. 1) und dem MVA-Virus (Abb. 2) wiedergegeben.

Auf zellulärer Ebene (CTC-Marker) ist das auffälligste Merkmal des MVA-Virus die starke Einengung des Wirtsspektrums. Voll virulent ist das MVA-Virus nur für Hühnerembryofibroblasten-Kulturen. Hier unterscheidet es sich vom CVA-Ausgangsvirus durch die Qualität des cytopathischen Effektes. Das CVA-Ausgangsvirus führt wie die anderen Vaccinia-Virusstämme über eine schollige Degeneration (flächige Ausbreitung der infizierten Zellen) mit Zellfusionen zu einer Lysis der infizierten Zellkulturen. Eine typische Abkugelungsphase fehlt (Abb. 3). Beim MVA-Virus kommt es dagegen zu einer Abkugelung (sehr kleine und unregelmäßige Kugeln) der infizierten Zellen, die dann granulär zerfallen, wobei der griselige Zelldetritus erhalten bleibt (Abb. 4). Im Plaque-Test ist dies besonders auffällig (vgl. Tabelle 1). Bei sehr dichten Kulturen kann der Zellrasen in seinem pathologisch veränderten Zustand (Abkugelungsphase) erhalten bleiben.

Auch im Kaninchen (R-Marker) und in der Maus (M-Marker) hat das MVA-Virus seinen Vaccinia-Charakter vollständig verloren. Beim Kaninchen führten kutane und intrakutane Impfungen zu keiner Primärreaktion an der Impfstelle und intravenös verabreicht kommt es zu keiner Generalisierung.

Bei der Maus ist das auffälligste Merkmal der Verlust der Neurovirulenz. Sowohl infantile (1—3 Tage alt)

wie erwachsene Mäuse (12—15 g) erkrankten nach i. zerebraler-Applikation nicht. Nach intraperitonealer Impfung 1—3 Tage alter Säuglingsmäuse fehlt die Generalisierung (vgl. Tabelle 2).

Kutan, intrakutan und buccal infizierte Macacus-Affen (MK-Marker) zeigen keine Primärreaktion. Intrathalisch infizierte Affen werden nicht krank, während mit dem Ausgangs-CVA-Virus und anderen Vaccinia-Viren, selbst mit dem Elstree-Stamm infizierte Affen, 100%ig erkranken (vgl. Tabelle 3). Der starke Verlust der Virulenz des MVA-Virus ist letztlich besonders auffällig beim Menschen (H-Marker). Die übliche kutane Schnitt- oder Punktimpfung verläuft bezüglich Primärreaktion an der Impfstelle negativ. Auch intramuskulär verabreichtes MVA-Virus erzeugt keine Lokalreaktion. Lediglich nach intrakutaner Applikation kommt es am Impfort zu einer schwachen, gut von der Umgebung abgesetzten Infiltratbildung bis zu 20 mm mit einer Rötung der Umgebung (Area). Die Reaktion bildet sich ohne Substanzverlust und Schorfbildung rasch zurück (vgl. Tabelle 3). Allgemeinreaktionen fehlen.

Bezüglich Antigenstruktur und immunogener Eigenschaften hat sich das MVA-Virus nicht verändert. Es wird im gereinigten Zustand (durch fraktionierte Ultrazentrifugation) durch spezifische Vaccinia-Immunsereen, gleich welcher Herkunft, neutralisiert. Wegen seines starken Virulenzverlustes für Säugetiere wirkt es im Impfling aber nur dann aktiv immunogen, wenn es in hohen Konzentrationen (über $10^{7.5}$ FHE-KID₅₀) mehrmals verabreicht wird. In dieser Beziehung verhält sich das MVA-Virus ähnlich wie ein inaktiviertes Virus, aber mit dem einen Unterschied, daß es neben der Bildung von Antikörpern auch die Bildung von Immunzellen stimuliert, die für eine Pockenimmunität essentiell sind. Voraussetzung für einen Impferfolg ist eine gute Resorption

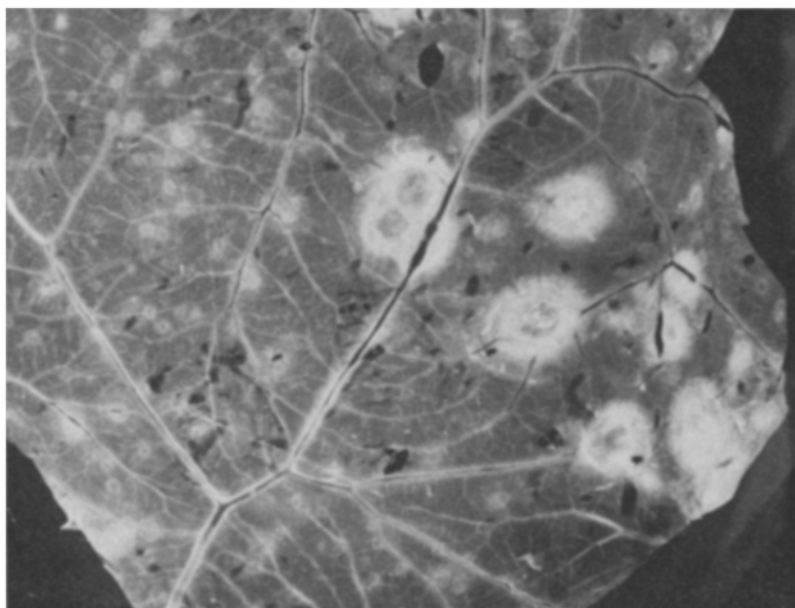


Abb. 1: Chorioallantoismembran — Bild der Primär- und Sekundärherde beim CVA-Ausgangsvirus: 4. Tag.

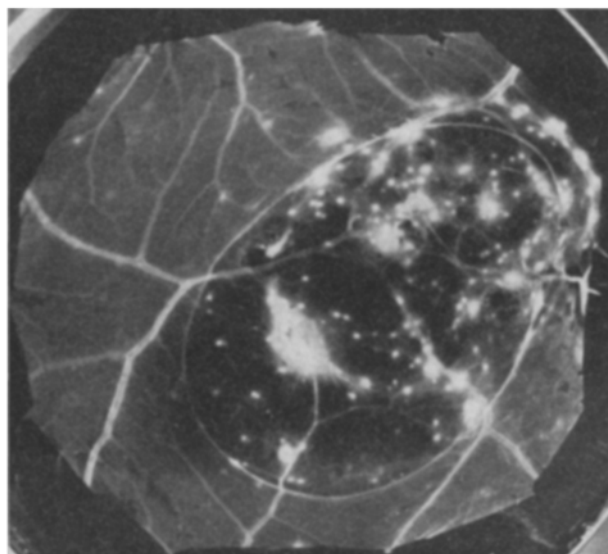


Abb. 2: Chorioallantoismembran — Bild der Primär- und Sekundärherde beim MVA-Virus: 4. Tag post inf.

des Virus. Eine parenterale, orale, intranasale oder intrakutane Applikation des MVA-Virus begünstigt den Immunisierungserfolg deshalb besser als eine kutane Verabreichung.

3. Anwendung des MVA-Virus

Das MVA-Virus eignet sich zur aktiven Immunprophylaxe gegen alle durch Orthopockenviren hervorgerufenen Erkrankungen bei Mensch und Tier. Wegen seiner geringen Virulenz und seiner starken und schnellen Induktion der Bildung von endogenem Interferon können mit dem MVA-Virus gefahrlos auch Notimpfungen durchgeführt werden. Das MVA-Virus besitzt keine

Kontagiosität. Geimpfte Menschen und Tiere können deshalb das Virus nicht auf empfängliche Individuen übertragen, gleichgültig welcher Applikationsmodus bei der Impfung benutzt wurde.

Die Unschädlichkeit des MVA-Virus für die gegenüber dem Menschen wesentlich sensibleren Haustiere wurde bewiesen bei neugeborenen keimfreien, gnotobiotisch gewonnenen Tieren und bei konventionell neugeborenen Tieren.

Für die Versuche mit Gnotobioten benutzten wir unter sterilen Kautelen durch Kaiserschnitt gewonnene Ferkel. Sie wurden sofort in ein Isolatorsystem gebracht und dort mit einem sterilen Futter ernährt. Von der Geburt an erhielten sie über einen Zeitraum von 10 Tagen täglich $10^{7,2}$ FHE-KID₅₀ MVA-Virus oral (über die Milch) verabreicht. Nichtbehandelte Kontrollen liefen unter den gleichen Bedingungen parallel. Die Tiere wurden gesundheitlich überwacht, die Gewichtszunahme vergleichend überprüft und nach 14 Tagen schrittweise konventionalisiert. Insgesamt sind 26 Ferkel auf diese Weise mit dem MVA-Virus belastet worden. Keines der Tiere erkrankte oder zeigte Abweichungen von der Norm. Die Gewichtszunahme war bei den MVA-geimpften Tieren geringgradig besser als bei den Kontrollen. Auch die Konventionalisierung überstanden die Impflinge gleich gut wie die Kontrolltiere. Die Entwicklung und Kondition war bei den Impflingen sogar besser als bei den unbehandelten Ferkel.

Neben diesem Versuch haben wir konventionell neugeborene Kälber, Ferkel und Hunde mit dem MVA-Virus in gleicher Dosierung wie oben belastet. Die Kälber und Ferkel erhielten das Virus mehrere Tage (2- bis 10mal täglich) oral (über Futter oder per Schlundsonde), die Welpen wurden 1mal oral bzw. intraperitoneal geimpft. Alle Tiere verblieben während der Impfperiode im Mutterbestand, in dem zur Kontrolle auch nicht geimpfte



Abb. 3: Cytopathischer Effekt beim CVA-Ausgangsvirus in Hühnerembryofibroblastenkulturen: 2. Tag post inf.

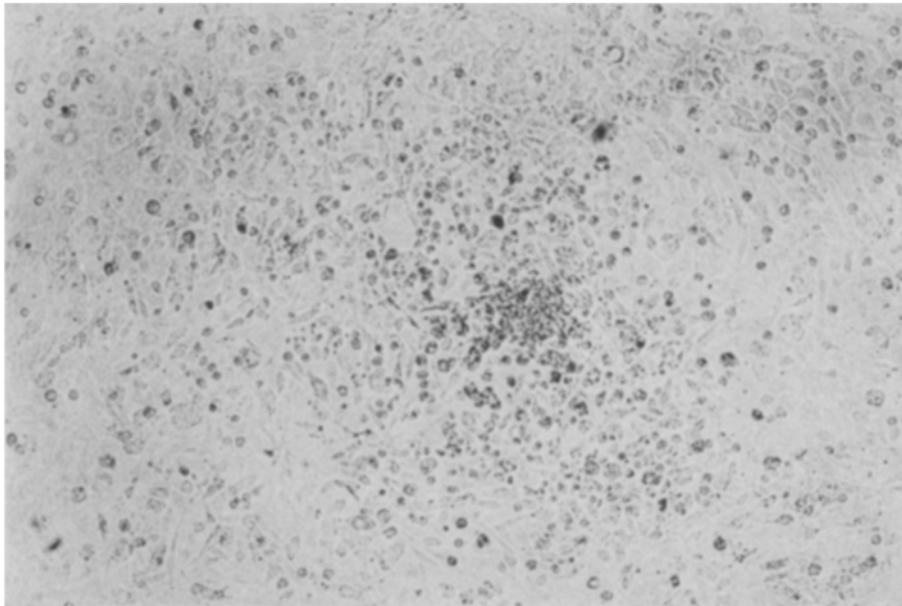


Abb. 4: Cytopathischer Effekt beim MVA-Virus im Hühner-embryofibroblastenkulturen: 2. Tag post inf.

Neugeborene lebten. Insgesamt sind 18 neugeborene Ferkel, 100 neugeborene Kälber und 10 neugeborene Welpen geimpft worden. Kein Tier erkrankte, Kontrolltiere wurden nicht gefährdet. Zusätzlich haben wir zwei 14 Tage alte Ferkel auch intravenös mit 5 ml MVA ($10^{5,0}$ KID₅₀/ml) geimpft. Die Tiere vertrugen die Dosis reaktionslos.

In der Tiermedizin haben wir den MVA-Impfstoff bisher für ganz unterschiedliche Zwecke eingesetzt. Mäusezuchten werden immer wieder durch Ektromelieenzootien bedroht. Wir impfen seit einem Jahr mehrere dieser Versuchstierzuchten (pro Zucht über 1000 Stammtiere) prophylaktisch mit MVA gegen die Mäusepocken. Geimpft werden alle Mutter- und Vatertiere im Alter über 3 Wochen. Die Impfung erfolgt intraperitoneal mit 0,2 ml Impfstoff. Der Impfstoff erhält $10^{7,5}$ FHE-KID₅₀/ml. Pro Jahr wird 1mal vacciniert. Impferkrankungen und Impfdurchbrüche über Ektromelie-Feldvirus-Einschleppungen traten nicht auf. Die Tiere entwickeln sich normal.

Besonders empfänglich für Vaccinia- und Kuhpockeninfektionen sind in Gefangenschaft gehaltene Elefanten. Sie erkranken generalisiert mit einer relativ hohen Letalitätsrate. Ein Pockenausbruch bei Zirkuselefanten (5) in der Gegend Stuttgarts, bei dem zwei Tiere generalisiert erkrankten, wovon der ältere Elefant starb, veranlaßte uns nach Charakterisierung des Erregers als Vaccinia-Virus (zwei Kontaktfälle bei Menschen) die restlichen acht Tiere, überwiegend Jungtiere, mit dem MVA-Virus schutzzuimpfen. Es handelte sich dabei zweifelsohne um eine Inkubationsimpfung bzw. Notimpfung. Pro Tier wurden 2 ml Impfstoff ($10^{7,0}$ FHE-KID₅₀/ml) subkutan am Ohrgrund appliziert. Die Tiere vertrugen die Impfung gut. Es traten weder Lokal- noch Allgemeinreaktionen auf. Kein Tier erkrankte in der Folgezeit an Pocken. Aufgrund dieser Erfahrungen sind in der Zwischenzeit

sechs Jungelefanten im Zoo von Gelsenkirchen und acht Elefanten im Berliner Zoo in gleicher Weise wie oben geimpft worden. Die Tiere in Berlin erhielten anstelle von 2 ml 5 ml subkutan. Alle Tiere überstanden die Impfung ohne Komplikationen. Bei einem Tier im Berliner Zoo entstand an der Impfstelle eine faustgroße Schwellung. Es wird ein Lokalabszeß durch Verunreinigung beim Impfstakt vermutet.

Neben obigen Indikationen haben wir noch acht Pferde, zehn Rinder und sechs Schafe subkutan mit MVA-Virus geimpft (2,0 ml, $10^{7,8}$ FHE-KID₅₀/ml). Kein Tier zeigte Lokal- oder Allgemeinreaktionen. Schließlich benutzten wir das MVA-Virus als biologischen Interferoninducer in sog. Problembeständen beim Kalb. In manchen Rinderzuchtbetrieben besteht ein Hospitalismus, der zu einer hohen Sterblichkeit der neugeborenen Kälber in den ersten Lebenswochen führt. Es handelt sich meistens um Mischinfektionen, an denen besonders *E. coli*, Pasteurellen, Staphylokokken und Entero-, Rhino-, Adeno- und REO-Viren beteiligt sind. Die 1—4 Tage alten Kälber erhielten oral über die Milch 5 ml MVA-Virus ($10^{7,5}$ FHE-KID₅₀/ml) 1- bis 2mal im Abstand von 24 Stunden verabreicht. Kein Tier zeigte postvaccinale Reaktionen. Die Mortalität und Morbidität konnte signifikant erniedrigt werden.

Über die Anwendung des MVA-Virus beim Menschen ist von uns gesondert berichtet worden (29).

References

1. Braunwald, J., Scherrer, R., Kirn, A.: Etude chez le lapin du pouvoir immunisant d'un mutant froid de virus vaccinal. *Path. et Microbiol.* (Basel) 28 (1964) 167.
2. Buschmann, H., Preuss, W.: Methoden und Erfahrungen bei der Prüfung von resistenzfördernden Präparaten. *Z. Immun. Forsch.* 136 (1968) 457.

3. Dunlap, R. C., Galasso, G. J., Sharp, D. G.: Vaccination response in rabbits related to quantity of vaccinia virus particles and passage level. *J. Immunol.* 100 (1968) 1335.
4. Ferrari, W., Gessa, G. L., Loddo, B., Schivo, M.: Decreased pathogenicity for rabbit skin of IDU-resistant vaccinia-virus. *Virology* 26 (1965) 154.
5. Gehring, H., Mahnel, H., Mayer, H.: Elefantepocken. *Zbl. Vet. Med., B.*, 19 (1971) 258.
6. Herrlich, A., Mayr, A.: Vergleichende experimentelle Arbeiten über die „Vaccine-Kuhpockenviren“. *Arch. Hyg.* 138 (1954) 479.
7. Herrlich, A., Mayr, A.: Die Differenzierung der Tierpockenviren im bebrüteten Hühnerei. *Arch. Hyg.* 139 (1955) 444.
8. Herrlich, A., Mayr, A.: Pockenimpfstoff aus Zungengewebe-kulturen vom Rind. *Arch. ges. Virusforsch.* 7 (1957) 284.
9. Herrlich, A., Mayr, A., Mahnel, H., Munz, E.: „Experimental studies on transformation of the variola virus into vaccinia virus“. *Arch. ges. Virusforsch.* 12 (1963) 579.
10. Hochstein-Mintzel, V., Huber, H. Ch., Stickl, H.: Virulenz und Immunogenität eines modifizierten Vaccinia-Virus. *Z. Immun. Forsch.* 144 (1972) 140.
11. John, T. J.: Properties of the CV 1 strain of vaccinia virus. II. Studies in eggs and mice. *Arch. ges. Virusforsch.* 26 (1969) 366.
12. Kempe, C. H.: Smallpox vaccination of eczema patients with attenuated live virus. *Yale J. Biol. Med.* 41 (1968) 1.
13. Kirn, A., Braunwald, J.: Selection par passages à basses températures d'un variant froid à virulence atténuée de virus vaccinal. *Ann. Inst. Pasteur* 106 (1974) 427.
14. Kitamura, T., Kitamura, Y., Tagaya, I.: Immunogenicity of an attenuated strain of vaccinia virus on rabbits and monkeys. *Nature* 215 (1967) 1187.
15. Mayr, A.: Tierexperimentelle Arbeiten über das hämagglutinierende Prinzip bei den Tierpockenviren. *Arch. ges. Virusforsch.* 6 (1956) 439.
16. Mayr, A.: Ein Beitrag zum Problem der qualitativen Differenzierung einzelner Vaccinevirusstämme. *Zbl. Bakt. Orig. I.*, 171 (1957) 7.
17. Mayr, A.: 1967: Gewinnung hochwertiger Interferone mit Hilfe von Pockenvirus-Stämmen, die in Zellkulturpassagen abgeschwächt wurden. *Zbl. Bakt. I.*, 202, 183.
18. Mayr, A.: Eine einfache und schnelle Methode zur Differenzierung zwischen Vaccine- und Kuhpockenvirus. *Zbl. Bakt. I. Orig.* 199 (1966) 144.
19. Mayr, A., Kalcher, K.: Vergleichende Studien über die Züchtung von Geflügelpockenviren in der Zellkultur. *Arch. ges. Virusforsch.* 10 (1960) 72.
20. Mayr, A., Kalcher, K.: Plaque-Bildung bei den Geflügel-pockenviren. *Arch. ges. Virusforsch.* 11 (1961) 307.
21. Mayr, A., Mahnel, H., Munz, E.: Systematisierung und Differenzierung der Pockenviren. *Zbl. Vet. Med., B.*, 19 (1972) 69.
22. Mayr, A., Munz, E.: Veränderungen von Vaccinevirus durch Dauerpassagen in Hühnerembryofibroblastenkulturen. *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.* 195 (1964) 24.
23. Nakamura, Y., Bolloni, A., Varaldi, V.: Ricerche sulla patogenicità e sul potere immunizante di un ceppo di virus vaccinicco resistente alla 5-iodo-2'dessosiuiridina. *Boll. Ist. sieroter. milan.* 46 (1967) 5—6.
24. Noorda, J. van der: Primary vaccination of adults with an attenuated strain of vaccinia virus. *Academisch Proefschrift, Amsterdam* 1964.
25. Rivers, T. H., Ward, S. M.: Further observation on the cultivation of vaccinia virus for Jennerian prophylaxis in man. *J. exp. Med.* 58 (1933) 635.
26. Rivers, T. M.: Cultivation of vaccinia virus for Jennerian prophylaxis in man. *J. exp. Med.* 54 (1931) 453.
27. Rivers, T. M., Ward, S. M.: Jennerian prophylaxis by means of intradermal injections of culture vaccine virus. *J. exp. Med.* 62 (1935) 549.
28. Rivers, T. M., Ward, S. M., Baird, R. D.: Amount and duration of immunity induced by intradermal inoculation of cultured vaccine virus. *J. exp. Med.* 69 (1939) 857.
29. Stickl, H., Hochstein-Mintzel, V., Mayr, A., Huber, H. Ch., Schäfer, H. und A. Holzner: MVA-Stufenimpfung gegen Pocken. Klinische Erprobung des attenuierten Pocken-Lebendimpfstoffes, Stamm MVA. *Dtsch. Med. Wschr.* 99 (1974) 2386.
30. Schwöbel, W., Mayr, A.: Die Züchtung des Vaccinevirus in Zungengewebe-kulturen vom Rind. *Zbl. Bakt. Orig. I.*, 167 (1956) 187.