

VERGLEICHENDE FLUORESZENZOPTISCHE UND LIQUORCYTOLOGISCHE
UNTERSUCHUNGEN AN VERSUCHSTIEREN NACH INTRACEREBRALER
MUMPSVIRUSAPPLIKATION; EIN BEITRAG ZUR CHARAKTERISIERUNG
VON MUMPSIMPFSTÄMMEN

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
vorgelegt der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
des Wissenschaftlichen Rates
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Biol. Angelika Lebhardt

Dekan:

Prof. Dr. rer. nat. habil Dieter Kreysig

Gutachter: 1. MR Prof. Dr. sc. med. G. Starke
2. OMR Prof. Dr. med. habil H.-W. Ocklitz
3. Prof. Dr. sc. nat. H. A. Rosenthal

Berlin im September 1984

1	Einleitung	1
2	Das Krankheitsbild des Mumps und seine Diagnostik	4
2.1	Definition "Mumps"	4
2.2	Ätiologie	4
2.3	Das klinische Bild des Mumps	4
2.4	Beteiligung des Zentralnervensystems	5
2.5	Zellzahl und Differentialzellbild des Liquor cerebrospinalis bei einer natürlichen Mumpsmeningitis	5
2.6	Diagnostik	6
3	Material und Methoden	8
3.1	Virusmaterial	8
3.2	Versuchsverlauf und Versuchstiere	8
3.2.1	Liquorproben von Kindern mit einer Mumpsmeningitis	8
3.2.2	Affen	8
3.2.3	Minischweinferkel	9
3.2.4	Katzen	9
3.2.5	Präparation des Liquor cerebrospinalis	9
3.3	Die indirekte Immunfluoreszenztechnik	9
3.3.1	Immunsereen	10
3.4	Statistische Versuchsauswertung	10
4	Ergebnisse	13
4.1	Immunfluoreszenzoptischer Nachweis des Mumpsvirus bei Kindern mit einer Mumpsmeningitis	13
4.2	Ergebnisse der Liquordiagnostik bei mumpsinfizierten Affen	14
4.2.1	Zellzahldynamik und Morphologie der Zellen des Liquor cerebrospinalis bei Versuchsaaffen	14
4.2.2	Immunfluoreszenzoptischer Nachweis des Mumpsantigens in den Liquorzellen	17
4.3	Ergebnisse der Liquordiagnostik bei mupsinfizierten Minischweinen und Katzen	17
4.3.1	Zellzahldynamik im Liquor cerebrospinalis	17
4.3.2	Morphologie der Liquorzellen	21
4.3.3	Immunfluoreszenzoptischer Nachweis des Mumpsantigens in den Liquorzellen	22
4.3.4	Kontrolltiere	23
5	Diskussion	26
6	Zusammenfassung	33
7	Literaturverzeichnis	35
8	Abbildungen	48

Abkürzungen

α	Irrtumswahrscheinlichkeit
DEAE	Diäthylaminoäthyl
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FAT	Fluoreszenz-Antikörper-Test
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
i. c.	intracerebral
IF	Immunfluoreszenz
K	Kontrolle
KBR	Komplementbindungsreaktion
L-3	Leningrad-3
p. i.	post infectionem
RIH	Radioimmunoassay
RNS	Ribonukleinsäure
SPF	spezifiziert pathogenfrei
SRHT	Single Radial Haemolysis Test
Va C	Variante C
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

Entzündliche Erkrankungen des ZNS und seiner Hüllen haben bei Mensch und Tier große Bedeutung. Beim Menschen ist die Erkrankung dieses zentralen Organsystems die Ursache oftmals schwerer klinischer Krankheitsbilder. Nicht selten gehen akute Entzündungen des Gehirns in langwierige chronische Leiden über, verbleiben lebenslange organische Restschäden, die von psychischen Störungen begleitet sein können.

Häufigste Ursache pathologischer Prozesse im ZNS einschließlich seiner Hüllen stellen neben Bakterien und Parasiten vor allem die Viren dar. Unter den zahlreichen Virusinfektionen bei denen mit einer Beteiligung des ZNS zu rechnen ist, spielen Vertreter der Paramyxoviridae eine besondere Rolle. Bei Tieren verursachen die zu dieser Familie gehörenden Viren der Hundestaupe, der Rinderpest und das Sendai Virus (82) entzündliche Veränderungen des Gehirns (Enzephalitis) und seiner Hüllen (Meningitis). Vertreter der Paramyxoviridae des Menschen mit deutlicher Tendenz zum Befall des ZNS (Neurotropismus) sind unter anderen das Masern- und das Mumpsvirus. Sie verursachen die nicht seltene Masernenzephalitis bzw. die Mumpsmeningitis des Kindes.

Neben dem bevorzugten Auftreten entzündlicher Reaktionen im eigentlichen Gehirnparenchym strahlen enzephalitische Prozesse immer auch auf die Hirnhäute aus, deren Mitbeteiligung unterschiedlich ausgeprägt ist. Bei einer Meningitis betreffen die morphologischen Veränderungen die der Gehirnoberfläche unmittelbar aufliegende, gefäßreiche und allen Vertiefungen und Windungen folgende Pia mater, die peripher folgende Arachnoidea und dass die Gehirnkammern auskleidende Ventrikel- bzw. Aqueduct-Ependym. Auch das im Bereich der Hirnventrikel von der Pia mater gebildete Adergeflecht (Plexus chorioideus) kann bei Entzündungen der Hirnhäute mitreagieren.

Ausdruck der entzündlichen Prozesse im Bereich der Meningen sind Veränderungen in der Zusammensetzung (Eiweiß, Zucker, Zellen) des Liquor cerebrospinalis, für dessen Bildung der Plexus chorioideus verantwortlich ist. Liquoruntersuchungen stellen somit eine wichtige paraklinische Methode zur Erfassung entzündlicher Prozesse des ZNS dar. Besondere Bedeutung kommt den zellulären Bestandteilen des Liquors zu. Höhe und Art der Zellvermehrung (Pleozytose) sind Hinweise für das Vorliegen eines erregerebedingten entzündlichen Prozesses. Liquoruntersuchungen können einen Beitrag zur Klärung der Ätiologie meningitischer und enzephalitischer Erscheinungen leisten, da die Veränderungen in der Zusammensetzung des Liquor cerebrospinalis teilweise für den Erreger charakteristisch sind. Virusbedingte entzündliche Vorgänge in den Hirnhäuten widerspiegeln somit gleichzeitig eventuell vorliegende neurotrope Eigenschaften des Virus. Die Liquoruntersuchung ist damit auch eine Methode zur Einschätzung von Viruseigenschaften.

Im kinderärztlichen Bereich sind Lumbalpunktionen zur diagnostischen Abklärung meningealer Entzündungsprozesse oft erforderlich. Für eine entzündliche Erkrankung des ZNS im Kindesalter ist Mumps die häufigste Ursache (41, 43, 86). Erreger dieser weitverbreiteten Erkrankung ist das zum Genus Paramyxovirus gehörende Mumpsvirus. Im Gegensatz zu anderen Vertretern dieser Gruppe befällt das Mumpsvirus bevorzugt die Meningen, den Plexus chorioideus und das Ventrikelsystem. Eine Mumpsenzephalitis im eigentlichen Sinn ist sehr selten (29, 39, 92, 107, 109, 122, 126).

Bei mumpserkrankten Kindern führten umfangreiche Liquoruntersuchungen der letzten Jahre (4, 40, 100) zu einer Neueinschätzung der Bedeutung der neurotrophen Eigenschaften des Mumpsvirus. Es gibt Hinweise dafür, dass einerseits sowohl die Zahl der Mumpserkrankungen zunimmt (18, 23), andererseits aber auch die Häufigkeit der ZNS-Beteiligung steigt. Während noch im Jahre 1952 (62) nur in 0,1 - 30% der Fälle eine Zellzahlerhöhung des Liquors bei

Mumps festgestellt wurde, fand sich 1971 (96) bei 50 - 70% eine Meningitis. In einer 10 Jahresstudie konnte OCKLITZ (1976) für den Raum der DDR bei 84,46% der an Mumps erkrankten Kinder erhöhte Liquorzellzahlen feststellen. Durch die regelhafte Beteiligung des ZNS bei Mumps (92) rückt die Bedeutung dieser häufigen Infektionskrankheit auch im Hinblick auf mögliche Spätschäden in ein neues Licht (4, 40, 51, 52, 100, 108, 122, 126, 132). Ob der Anstieg der Mumpsmeningitiden auf eine zunehmende Neurotropie des Erregers zurückzuführen ist, oder aber von der zunehmenden Häufigkeit der Durchführung einer Lumbalpunktion abhängt (9), bzw. von einer allgemeinen Verfeinerung diagnostischer Methoden, ist gegenwärtig noch umstritten.

Nicht zuletzt das neurotrope Verhalten des Mumpsvirus ist neben klinischen und sozial-ökonomischen Gründen mit ein Grund für die Einführung einer Mumpsschutzimpfung in verschiedenen Ländern. Als Impfstoff wird dabei eine Lebendvirusvakzine verwendet. Die Anwendung von Lebendimpfstoffen beim Menschen setzt entsprechende tierexperimentelle Sicherheitsprüfungen voraus, wie sie für eine Reihe von Lebendvirusimpfstoffen bereits festgelegt sind, z. B. für Poliomyelitis- (10, 137), für Masern- (138) und für Zeckenzephalitis-Impfstoffe (103). In den USA sind Vorschriften erarbeitet worden, die auch eine Prüfung des Mumpsimpfstoffes hinsichtlich seines neurotrophen Verhaltens vorsehen (19). Analoge nationale Vorschriften gelten auch für die UdSSR als einen potentiellen Impfstoffhersteller. In all diesen Prüfvorschriften werden die neuropathogenen Restpotenzen der Impfstoffe ausschließlich nach dem Auftreten enzephalitischer Veränderungen im Gehirnparenchym von Versuchstieren beurteilt. Für derartige Tests haben sich Primaten als besonders geeignet erwiesen. Die aus diesen Versuchen resultierenden Ergebnisse sind sehr aussagekräftig, da die stammesgeschichtliche Entwicklung der Primaten in der des Menschen gipfelt.

Nach klinischen Erfahrungen tritt als Folge einer Mumpserkrankung nur äußerst selten eine Enzephalitis auf. Das typische klinische Erscheinungsbild des Mumps ist neben der namensgebenden entzündlichen Schwellung der Ohrspeicheldrüse (Parotitis epidemica) durch die seröse Meningitis gekennzeichnet. Der geltenden Lehrmeinung zufolge gelangt das Mumpsvirus durch Tröpfcheninfektion in den Nasenrachenraum und vermehrt sich im Respirationsepithel der oberen Luftwege (Primärherd). Anschließend gelangt es im Verlauf einer Virämie in die Speicheldrüsen und in andere Organe (23, 91). Die Annahme, dass das Virus die Speicheldrüsen direkt über die Ausführungsgänge im Mund erreicht und hier die primäre Virusvermehrung erfolgt, wird gegenwärtig nicht mehr vertreten. Im Verlaufe der Virämie erreicht das Mumpsvirus das ZNS, überwindet die Blut-Liquor-Schranke und gelangt so in den subarachnoidalen Raum. Durch die hier fehlende bzw. verzögerte humorale Abwehr (Funktion der Blut-Liquor-Schranke) kann sich das Virus im Subarachnoidalraum gut vermehren und nach einer zusätzlichen Inkubationszeit zur Ausbildung einer Meningitis führen. Nach FREJDKOV (1972) ist dies eine Erklärung für das Auftreten von Mumpsmeningitiden, die erst 8 Tage oder gar 4 Wochen nach der Parotisschwellung manifest werden. Da bei einer natürlichen Erkrankung an Mumps nahezu regelhaft mit einer Pleozytose zu rechnen ist, ist die Frage einer Liquorzellvermehrung auch nach einer Impfung mit einem Lebendvirusimpfstoff von Interesse (90, 92). Die allgemeine Einbeziehung der Liquordiagnostik in die tierexperimentellen Untersuchungen ist daher sowohl für die Beurteilung der neuropathogenen Potenzen von Mumpsviren als auch für die Sicherheitsprüfung von Impfstoffen von besonderem Interesse, ihre spezifische Aussagekraft ist zu überprüfen.

Anliegen der vorliegenden Arbeit ist es, die Anwendung bzw. Eignung der Immunfluoreszenztechnik am Liquor cerebrospinalis bei mumpserkrankten Kindern als erregerspezifisches Verfahren zur ätiologischen Abklärung einer bestehenden Pleozytose zu überprüfen. Darüber hinaus bestand die Aufgabe, durch paraklinische Untersuchungen das Liquorverhalten im Ver-

laufe von Neuropathogenitätsstudien am Affen zu verfolgen und die Spezifität auftretender Veränderungen mittels der Immunfluoreszenztechnik zu belegen.

Mit den Tiermodellen Minischwein und Katze sollen schließlich einheimische Versuchstiere vorgestellt werden, die vergleichende tierexperimentelle Untersuchungen mit Mumpswildviren und attenuierten Mumpsviren zur Frage des Auftretens, des Verlaufs und der Spezifität einer Mumpsmeningitis sowie der Einschätzung neurotroper Eigenschaften von Mumpsviren erlauben.

2 Das Krankheitsbild des Mumps und seine Diagnostik

2.1 Definition "Mumps"

Mumps ist eine akute epidemisch oder endemisch verlaufende Infektionskrankheit des Kindes, die in unseren Breiten hauptsächlich im Winter und im Frühjahr auftritt (46, 67). Der Mensch ist das einzige Virusreservoir, mehr als 90% der Weltbevölkerung erkranken.

GERTH (1969) bezeichnet Mumps als akute, meist gutartige infektiöse Allgemeinerkrankung, bei der es in typischer Ausbildung zur schmerzhaften Schwellung einer oder beider Ohrspeicheldrüsen kommt. Eine entzündliche Beteiligung anderer drüsiger Organe und des ZNS ist möglich.

Kinder erkranken zwischen dem 2. und 14. Lebensjahr mit einem Häufigkeitsgipfel im 3. und 6. Lebensjahr und einer leichten Bevorzugung des männlichen Geschlechtes (46, 67).

2.2 Ätiologie

Die Virusätiologie des Mumps konnte 1934 durch JOHNSON und GOODPASTEUR nachgewiesen werden. Auf Grund seiner morphologischen Eigenschaften wird das Mumpsvirus in der Familie der Paramyxoviridae dem Genus Paramyxovirus zugeordnet (82). In dieser Familie sind RNS-Viren zusammengefaßt, deren Nukleokapsid eine helikale Symmetrie aufweist und von einer Hülle (Envelope) umgeben ist, die dem Viruspartikel eine sphärische Gestalt verleiht. Die Familie der Paramyxoviridae umfaßt drei Genera, die Paramyxoviren (Parainfluenza-, Mumps-, Newcastle disease Virus), die Morbilliviren (Masern-, Hundestaupe-, Rinderpestvirus) und die Pneumoviren (Pneumonia virus of mice, Respiratory syncytial virus) (82).

Die Lipoproteinmembran der Viruspartikel ist mit Spikes ausgestattet. In den Spikes sind die Oberflächenantigene Hämagglutinin und Neuraminidase lokalisiert. Diese beiden Oberflächenantigene sind für einige serologische Reaktionen bedeutungsvoll. Hämagglutinin und Neuraminidase befinden sich im Falle des Mumpsvirus an ein und demselben Spike (**Abb. 1**). Bei den Influenzaviren (Orthomyxoviridae) werden im Vergleich zum Mumpsvirus Hämagglutinin-tragende und Neuraminidase-tragende Spikes unterschieden. Das Masernvirus, ein Vertreter der Morbilliviren und das Respiratory syncytial virus, ein Pneumovirus, besitzen im Gegensatz zum Mumpsvirus keine Neuraminidase. Als ein weiteres Oberflächenprotein des Mumpsvirus wäre das Glykoprotein F zu nennen, das für die Zellfusion und die Hämolyse mit verantwortlich ist. Der Mechanismus der Hämolyse ist nicht völlig geklärt. Es handelt sich wahrscheinlich um gemeinsame Aktivitäten des Glykoprotein F und einiger Lipidkomponenten des viralen Envelope (68). Die Größe des Mumpsvirus ist sehr variabel, sie schwankt allgemein zwischen 110 und 360 nm, es gibt in Ausnahmefällen noch größere Viruspartikel. Bei erkrankten Personen kann das Virus aus dem Speichel, dem Blut, dem Liquor und dem Urin isoliert werden. Die Anzüchtung des Mumpsvirus ist im Brutei oder in der Zellkultur möglich. Im Verlaufe einer Mumpsvirusinfektion werden im infizierten Organismus komplementbindende, neutralisierende und hämagglutinationshemmende Antikörper gebildet (114).

2.3 Das klinische Bild des Mumps

Zwischen der initialen Aufnahme (Infektion) des Mumpsvirus durch den Organismus und dem Auftreten erster klinischer Krankheitssymptome liegt eine Inkubationszeit von 17 bis 21 (14 - 33) Tagen. Nach geringfügigen Prodromalerscheinungen, wie Kopf-, Hals-, Ohren- und Nackenschmerzen kommt es unter leichtem Fieber zur Schwellung einer Ohrspeicheldrüse. Nach wenigen Tagen, manchmal erst nach Wochen folgt die andere Seite. Die Drüsenschwellung klingt nach 5 bis 10 Tagen ab. Die Temperaturerhöhung dauert meist nicht länger als 3

bis 4 Tage. Neben der Ohrspeicheldrüse können auch andere Drüsen z. B.: Die Glandula submandibularis, die Glandula sublingualis und das Pankreas erkranken (48, 95, 99). Als weitere Organmanifestation des Mumps wäre die Orchitis (131), die selten auftretende Oophoritis (6) und die Myokarditis (14, 60) zu nennen. Der einzelne Organbefall braucht nicht immer klinisch in Erscheinung zu treten, er wird oft nur zufällig entdeckt. Läuft eine Erkrankung komplikationslos ab, fühlt sich der Patient schon nach kurzer Zeit (5 bis 10 Tage) wieder gesund (89). 30 bis 50% aller Mumpserkrankungen sollen inapparent verlaufen (66, 109, 122).

Als Folge der Auseinandersetzung des Organismus mit dem viralen Antigen treten Antikörper auf, deren Vorhandensein dem natürlich erkrankten Organismus eine lebenslange Immunität verleihen.

2.4 Beteiligung des Zentralnervensystems

Die häufigste und damit auch klinisch wichtigste Mumpskomplikation ist die Mumpsmeningitis bzw. Mumpsmeningoenzephalitis (18, 69, 86). Mit einer zentralnervösen Beteiligung bei einer Mumpserkrankung ist in über 80% aller Mumpsfälle zu rechnen (90). Die mumpsvirusbedingte Hirnhautentzündung wird somit nicht mehr als eine Komplikation der Parotitis epidemica sondern als Organmanifestation angesehen (77, 92). Die seröse Meningitis kann sogar unabhängig von der Parotitis in sehr unterschiedlicher Ausprägung ablaufen (61). Die Höhe der auftretenden Zellzahl ist dabei kein Kriterium für die Schwere der klinischen Erscheinungen (25, 33, 107). Die Krankheitssymptome der Meningitis klingen meist nach ein paar Tagen ab. Bei einem komplikationslosen Verlauf sind auch die Liquorwerte nach 3 Wochen wieder normal (6, 89, 115). Die Prognose ist in der Mehrzahl der Fälle günstig und völlige Genesung wird beobachtet. Nicht in jedem Fall verläuft die Mumpsmeningitis komplikationslos. So berichtet WILFERT (1969) über Meningitiden, bei denen eine Pleozytose über 5 Wochen nachweisbar war. HOFFMANN (1966) beobachtet psychische und vegetative Störungen, JUST (1968) Wesensveränderungen und Beeinträchtigungen der intellektuellen Fähigkeiten. Im Gegensatz zur Meningitis werden bei der seltenen enzephalitischen Verlaufsform des Mumps bleibende Restschäden sehr häufig beschrieben. Es werden EEG-Veränderungen mit Krampfneigung (51, 61, 100, 108), Hirnnervenausfälle, insbesondere des Hörnervs (4, 18, 39, 40, 122, 126, 127) und ein Hydrocephalus internus (52, 70, 119) beobachtet.

Das klinische Erscheinungsbild einer Enzephalitis ist deutlich von dem einer Meningitis zu trennen. Bei einer Mumpserkrankung werden Enzephalitiden - im Gegensatz zur Meningitis - nur äußerst selten beobachtet. OCKLITZ (1976) schlägt daher vor, nicht generell von der "Mumpsmeningoenzephalitis" zu sprechen, sondern zwischen der Mumpsmeningitis und Mumpsenzephalitis zu differenzieren.

2.5 Zellzahl und Differentialzellbild des Liquor cerebrospinalis bei einer natürlichen Mumpsmeningitis

Die mit einer Pleozytose einhergehende Mumpsmeningitis kann sehr unterschiedlich ausgeprägt sein. Die Zellzahlen variieren zwischen 6 und 2200 Zellen/mm³ (6 und 2200 x 10⁶ Zellen/l (4, 115). Als höchste Zellzahl fand ROHMANN (1969) 8000/3 Zellen (2667 x 10⁶ Zellen/l).

Die Pleozytose im Liquor, die den Ablauf einer Entzündung der Meningen belegt, ist bei Mumps im Vergleich zu anderen Virusmeningitiden durch hohe Zellzahlen gekennzeichnet. SCHMITZ (1982) fand bei Mumpsmeningitiden ein Überwiegen der Zellzahlen von über 500/3 Zellen (167 x 10⁶ Zellen/l). KRILLE (1975) konnte in 66% aller von ihm untersuchten Mumpsmeningitiden Zellzahlen über 1000/3 (333 x 10⁶ Zellen/l) beobachten. Bei anderen

Virusmeningitiden wurden diese Zellzahlen nur in 30% der Fälle erreicht. Er beschreibt die cytologischen Besonderheiten der Mumpsmeningitiden wie folgt:

- Ein buntes fast ausschließlich mononukleäres Zellbild in der Erstpunktion
- Das Fehlen oder der Nachweis von unter 10% neutrophiler Granulozyten pro Sediment der Erstpunktion
- Neutrophile Granulozyten sind im Zweitsediment nicht mehr nachweisbar.

Das Differentialzellbild des Liquors ist zu Beginn einer Mumpsmeningitis bei Kindern durch eine außerordentlich geringe und kurzzeitige akute, granulozytäre Phase gekennzeichnet. Nach Beobachtungen von KRILLE (1975) hält die granulozytäre Initialphase nur 24 Stunden an.

BANG (1943) und VAHLQUIST (1967) beschreiben schon im frühen Stadium der Mumpsmeningitis vorherrschend mononukleäre Zellbilder. AMMANN (1964) und SCHOLZ (1970) berichten von einem überwiegenden Anteil der monohistiozytären Zellform schon zu Beginn der Erkrankung. Auch KRILLE (1975) fand in den Erstsedimenten bei einer Mumpsmeningitis als dominierende Zellart Monohistiozyten. VON HAEBLER (1968), WILFERT (1969), JOHNSTONE (1972), AZIMI (1975), KOLLMORGEN (1979) und PELC (1981) beschreiben ein Überwiegen von lymphozytären Zellbildern. SCHOLZ (1970) berichtet von einer großen Anzahl lympho-monozytärer "Übergangsformen" aber kaum von typischen Lymphozyten.

2.6 Diagnostik

Die Diagnose des Mumps ist eindeutig, wenn die typische Schwellung der Ohrspeicheldrüse deutlich ausgeprägt ist. Treten bei diesen Patienten meningitische Symptome auf, liegt der Verdacht nahe, dass das Mumpsvirus dafür verantwortlich ist. Oft kommen aber Kinder mit dem Verdacht einer Meningitis in stationäre Behandlung, ohne dass es klinische Hinweise auf den Erreger gibt. In der Anamnese kann es Hinweise auf eine kurzzeitig zurückliegende Parotisschwellung oder auf einen Kontakt mit anderen Mumpserkrankten geben, diese können aber auch fehlen. Hier stellen die diagnostischen Labormethoden wichtige zusätzliche oder gar die einzigen diagnostischen Kriterien dar. Die Labordiagnose beruht auf dem indirekten oder direkten Erregernachweis. Von den indirekten Methoden ist die KBR für den routinemäßigen Mumpsnachweis am gebräuchlichsten. Bei der KBR (26) werden zwei Antigene unterschieden. Das V-Antigen oder Oberflächenantigen entspricht den Glykoprotein enthaltenen Strukturelementen des viralen Envelope. Das lösliche oder S-Antigen leitet sich vom helikalen Ribonukleoprotein ab. Reaktionen des S-Antigens sind spezifisch für den Virustyp und werden nicht durch Kreuzreaktionen anderer Paramyxoviridae gestört. Bei der Reaktion des V-Antigens mit seinen homologen Antikörpern werden Kreuzreaktionen mit Newcastle disease-, Parainfluenza-1- und Parainfluenza-2-Viren beobachtet (63). Antikörper gegen das S-Antigen sind schon im frühen Krankheitsstadium nachweisbar und bleiben dies für einige Monate. Antikörper gegen das V-Antigen treten später auf und bleiben länger nachweisbar (49). Serumproben der Patienten müssen im Abstand von 10 bis 14 Tagen der Antikörperbestimmung unterzogen werden. Durch den vierfachen Titeranstieg im Serum wird retrospektiv die Diagnose Mumpsmeningitis bestätigt. Neue Methoden für den Nachweis der Antikörper gegen Mumps wie der Single-Radial-Haemolysis-Test (SRHT) (98, 128) wurden erprobt und haben sich in der Praxis als empfindlich und zuverlässig erwiesen. Der Fluoreszenz-Antikörper-Test (FAT) (13) wurde erfolgreich für den Nachweis und die Titration von Mumpsantikörpern in humanen Serumproben eingesetzt. Im Vergleich zur Serumneutralisation erwies sich der FAT als die zuverlässigste Methode (8). In den letzten

Jahren wurden auf Grund des Vorhandenseins der Neuraminidase weitere serologische Nachweisverfahren wie beispielsweise der Lektin-Neuraminidasetest entwickelt (79). Methoden wie der Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (27, 88, 140) oder der Radioimmunoassay (RIA) (15, 34) haben noch keine breite Anwendung gefunden.

Viele diagnostische Tests wie die Hämagglutination, die Hämagglutinationshemmung, die Hämadsorption und die Hämadsorptionshemmung beruhen auf dem in den Spikes lokalisierten Hämagglutinin. Es ist für die Fähigkeit des Mumpsvirus verantwortlich, Erythrozyten von Hühnern und Meerschweinchen zu agglutinieren (75) bzw. zu hämolysieren (84). Diese Eigenschaft des Mumpsvirus kann diagnostisch sowohl indirekt als auch direkt verwertet werden.

Ein direkter Erregernachweis ist durch die Isolierung des Virus möglich. Die Anzucht des Erregers im bebrüteten Hühnerei bzw. in der Zellkultur ist aber sehr zeitaufwendig und wird daher nicht routinemäßig durchgeführt. Als technisch aufwendiges Verfahren steht die Elektronenmikroskopie für den direkten Nachweis des Erregers zur Verfügung.

Im Gegensatz dazu hat die Immunfluoreszenz im Rahmen der Virusschnelldiagnostik breite Anwendung gefunden. Ihre Eignung für den diagnostischen Nachweis des Mumpsantigens wird durch Arbeiten von LESSO (1965), FRANKOVA (1970) und LENNETTE (1975) bestätigt. Die Immunfluoreszenz ist ein schnelles, spezifisches und technisch weniger aufwendiges Verfahren zum Nachweis von viralen Antigenen. Sie ermöglicht als erregerspezifisches Nachweisverfahren einen schnellen und spezifischen Antigennachweis in den verschiedensten Untersuchungsmaterialien.

3 Material und Methoden

3.1 Virusmaterial

In den nachfolgenden Versuchen fanden folgende Mumpsvirusmaterialien Verwendung: Die Mumps-Lebendimpfstoffe Jeryl Lynn "Mumpsvax" (Behring, BRD) nach 3 Passagen auf SPF-Hühnerfibroblasten, "Leningrad-3" (Institut für Viruspräparate, Moskau, UdSSR), eine neuropathogene Variante C und drei Mumpswildvirusisolate. Die neuropathogene Variante C wurde durch Weiterpassagierung des Stammes Leningrad-3 (40 Passagen in Grenzverdünnungen auf verschiedenen Substraten) gewonnen. Wildvirus 1 und 2 wurden nach 4 Eipassagen und Wildvirus 3 nach 20 Eipassagen eingesetzt. Die Mumpswildvirusisolate konnten aus dem Speichel 5-jähriger Kinder mit Mumps ohne klinisch manifester ZNS-Beteiligung gewonnen werden. Die Mumpswildvirusisolate und die neuropathogene Variante C stellte freundlicherweise Frau Dr. G. Pollex, Institut für Angewandte Virologie, Berlin, zur Verfügung. Die Durchführung einer aktuellen Titerbestimmung diente der Einstellung des Antigengehaltes auf ca. 10^5 PFU/ml vor Versuchsbeginn. Den Versuchstieren wurde 0,5 bzw. 1 ml dieser Viruskonzentration intracerebral appliziert.

3.2 Versuchsverlauf und Versuchstiere

3.2.1 Liquorproben von Kindern mit einer Mumpsmeningitis

Für die Untersuchungen standen 57 Proben des Liquor cerebrospinalis von Kindern zur Verfügung, die mit dem Verdacht einer Mumpsmeningitis in stationäre Behandlung kamen. Die Kinder (35 Jungen und 22 Mädchen) waren im Alter von 1 bis 13 Jahren. Die Liquorproben wurden 3 bis 8 Tage nach der Parotisschwellung gewonnen und uns als Zellsediment nach dem Sedimentierkammer-Verfahren (106) zur Verfügung gestellt. Herr OA Dr. R. Noack, Institut für Infektionskrankheiten im Kindesalter im Städtischen Klinikum Berlin-Buch stellte freundlicherweise die Liquorproben zur Verfügung. Routinemäßig werden Serumpaare dieser Kinder einer Antikörperbestimmung mit Hilfe der Komplementbindungsreaktion zur Erhebung der Mumpsdiagnose unterzogen. Die Bestimmung der Mumpsantikörper wurde im Bezirks-Hygiene-Institut Berlin im Laborbereich Mikrobiologie Buch durchgeführt.

Für den indirekten Immunfluoreszenztest kamen die γ -Globulinfraktionen eines Anti-Mumps-Immunsersums vom Kaninchen bzw. Meerschweinchen zur Anwendung (siehe Abschn. 3. 3.).

3.2.2 Affen

Alle Liquoruntersuchungen (Zellzahl, Cytologie, Immunfluoreszenz) wurden als orientierende Untersuchungen parallel an den Affen durchgeführt, die für Neuropathogenitätsuntersuchungen intracerebral mit verschiedenen Mumpsmaterialien infiziert waren.

Bei den verwendeten Tieren handelte es sich um Grüne Meerkatzen (*Cercopithecus aetiops*), die der Tierhandel der Zoologica importierte. Vor Versuchsbeginn befanden sich die Tiere im Institut 1/4 Jahr in Quarantäne. Zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns waren sie klinisch gesund, ihr Körpergewicht lag zwischen 1,5 und 2,5 kg. Ausgewertet wurden jeweils 7 bis 10 Grüne Meerkatzen, die mit dem Mumps-Lebendimpfstoff "Leningrad-3" und einer durch Weiterpassagierung selektierten neuropathogenen Variante C intracerebral geimpft waren. Den Kontrolltieren wurde an Stelle des Mumpsantigens eine gepufferte Salzlösung nach Hanks injiziert. Die Applikation des Materials erfolgte langsam in beide Hemisphären (je 0,5 ml). Nach 3 bzw. 4wöchiger Versuchsdauer wurden die Tiere ausgeblutet. Die Impfung

und Entblutung erfolgten in tiefer Narkose, als Narkosemittel kam Ketanest (Pake-Davis, BRD) 0,7 ml intramuskulär zur Anwendung.

3.2.3 Minischweinferkel

Verwendung fanden Minischweinferkel der Rasse MINI-LEWE aus dem VE Gut Wendefeldt-Güldenhof, Kreis Gransee im Alter von 8 bis 10 Wochen, mit einem Gewicht von 6 - 8 kg. Sie wurden intracerebral mit 0,5 ml der Mumpsimpfstoffe Jeryl Lynn und Leningrad-3 bzw. mit den Wildisolaten 1, 2 und 3 geimpft. Die Applikation des Virusmaterials erfolgte langsam in die rechte Hemisphäre. Jeder Versuch umfaßte 20 Tiere, davon dienten vier als Kontaktkontrolle, die an Stelle des Mumpsantigens eine gepufferte Salzlösung nach Hanks injiziert bekamen. Jeweils zwei Tiere wurden nach 3, 7, 10, 13, 17, 21, 28 und 56 Tagen post infectionem getötet. Nach 21 und 28 Tagen wurde zusätzlich je ein Kontrolltier und nach 56 Tagen zwei Kontrolltiere getötet. Die Minischweine wurden mit Hexobarbital-Natrium AWD (VEB Arzneimittelwerk, DDR) intraperitoneal (50 mg/kg Körpergewicht) narkotisiert.

3.2.4 Katzen

Die Versuche an Katzen konnten mit jeweils 10 Tieren, die der staatliche Tierhandel lieferte, durchgeführt werden. Die Tiere variierten in Alter und Größe. Am Tiermodell Hauskatze wurden zwei Versuchsreihen mit den Mumpsviren Jeryl Lynn und Wildvirus1 durchgeführt. Die Katzen erhielten ebenfalls 0,5 ml Virusmaterial intracerebral in den Hypothalamus der rechten Hemisphäre injiziert. Den Kontrolltieren wurden 0,5 ml einer gepufferten Salzlösung nach Hanks appliziert. Die Tiere wurden 3, 7, 10, 21 und 28 Tage post infectionem getötet. Als Narkosemittel erhielten die Katzen rompun (Bayer, BRD) 0,1 ml intramuskulär und Ketanest (Prake-Davis, BRD) 0,5 ml intramuskulär.

3.2.5 Präparation des Liquor cerebrospinalis

Von jedem Versuchstier wurde eine Liquorprobe durch Subokzipitalpunktion aus der Cisterna cerebello medularis am Tag der Tötung gewonnen. Die Zellzahl wurde in der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer nach Färbung mit Eisessig/ Methylviolett bestimmt. Jeweils 0,5 ml des Liquors wurden eingesetzt, um drei Zellpräparate mit Hilfe des Sedimentierkammer-Verfahrens nach Sayk (106) herzustellen. Eine Zellpräparation, May-Grünwald-Giemsa gefärbt nach Pappenheim (42), diente der Zelldifferenzierung (110). Die beiden anderen Zellpräparationen wurden nach 10minütiger Fixierung in kaltem Aceton bis zur weiteren Untersuchung im Fluoreszenz-Antikörper-Test bei -20°C aufbewahrt.

3.3 Die indirekte Immunfluoreszenztechnik

Die Immunfluoreszenztechnik, die von COONS und KAPLAN (1950) entwickelt wurde, ist heute fester Bestandteil der virologischen Diagnostik. Das erste Virus an dem sie ihre neuentwickelte Methode erprobten, war das Mumpsvirus (21). Mit dieser Technik war es gelungen, die hohe Nachweisempfindlichkeit fluoreszenzmikroskopischer Methoden mit der strengen Spezifität serologischer Verfahren zu verbinden und damit auch die Lokalisation einer Antigen-Antikörper-Reaktion zu ermöglichen.

Bei den vorliegenden Untersuchungen erfolgte der Nachweis des Mumpsantigens in den Proben des Liquors mit der indirekten Immunfluoreszenztechnik.

In einem ersten Reaktionsschritt wurden die Präparate mit der γ -Globulinfraktion eines Anti-Mumps-Immunserums vom Kaninchen (HAH-Titer 1:512) überschichtet. Zur Anwendung kamen weiterhin die γ -Globulinfraktionen eines Anti-Mumps-Immunserums vom

Meerschweinchen (HAH-Titer 1:256) und eines humanen Rekonvaleszentenserums mit einem Mumpsantikörpertiter in der KBR von 1:320. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten bei 37°C in der feuchten Kammer. Anschließend wurden die Präparate dreimal 10 Minuten mit einer 0,01 M phosphatgepufferten Kochsalzlösung pH 7,2 gewaschen. Im zweiten Reaktionsschritt erfolgte eine erneute Inkubation mit einem FITC-markierten Konjugat, einem Anti-Kaninchen-Globulin, einem Anti-Meerschweinchen-Globulin bzw. einem Anti-Human-Globulin von der Ziege (Staatl. Inst. f. Immunpräparate und Nährmedien, DDR) für 30 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer. Das ungebundene Konjugat konnte anschließend durch dreimaliges Waschen für 10 Minuten im Puffer entfernt werden. Eine bessere Kontrastierung der spezifischen Fluoreszenz erzielte die Gegenfärbung der Präparate mit einer 0,01%igen Evansblau-Lösung (Reanal, Ungarn). Die mit gepuffertem Glycerin eingedeckten Präparate werden im Auflichtverfahren (HBO 202, Fluoval I, Carl Zeiss, Jena, DDR) mikroskopiert. An Kontrolluntersuchungen wurden durchgeführt:

1. Überschichten infizierter Präparate mit einem heterologen Immunsereum und
2. Überschichten nur mit dem FITC-markierten Konjugat.

3.3.1 Immunsereen

Für den erfolgreichen fluoreszenzoptischen Virusnachweis sind möglichst hochtitrige Antisereen zwingende Voraussetzung. Monospezifische Hyperimmunsereen wurden durch Immunisierung von Kaninchen und Meerschweinchen mit dem Mumpsvirus Stamm Enders hergestellt. Diese Tierspezies zeichnen sich durch eine gute humorale Immunantwort gegenüber dem Mumpsvirus aus und entsprechende FITC-markierte Anti-Spezies-Globulinsereen sind kommerziell erhältlich. Verschiedene Immunisierungsschemen mußten erprobt werden. Durch kurze Immunisierungszeiten konnten hohe Titer im Fluoreszenz-Antikörper-Test erzielt werden. Jedes dieser Seren mußte auf seine spezielle Eignung im Fluoreszenztest geprüft werden, da serologische Routinemethoden wie Agglutination und KBR zwar Hinweise auf die allgemeine Verwendbarkeit geben, jedoch nicht in jedem Falle einen sicheren Rückschluß auf das Verhalten im Fluoreszenz-Antikörper-Test geben. Der Serumprüfung dienten mumpsinfizierte Zellkulturen. Die γ -Globulinfraktion wurde mittels eines Ionenaustauschverfahrens an DEAE-Zellulose von Seren gewonnen, die sich im Zellkulturtest durch eine brillante cytoplasmatische, granuläre Fluoreszenz auszeichneten. Die Verwendung der γ -Globulinfraktion verhinderte weitgehend unspezifische Fluoreszenzerscheinungen.

3.4 Statistische Versuchsauswertung

Für die Auswahl eines geeigneten statistischen Prüfverfahrens zur Auswertung der Daten ist es erforderlich, die Form der Stichprobenverteilung zu bestimmen. Wichtige Kenngrößen einer Stichprobe sind der Mittelwert und die Varianz. Der Mittelwert ist einfach der Durchschnitt der Daten der Stichprobe, auch arithmetisches Mittel genannt.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Die Varianz ist der Mittelwert der quadratischen Abweichung der Stichprobendaten von \bar{x} .

$$s^2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

Damit ist die Varianz ein Maß für die Variabilität der Daten. Darüber hinaus kann durch die Berechnung von Schiefe und Wölbung der Häufigkeitsverteilung der Stichprobe etwas über die Form der Verteilung ausgesagt werden.

$$\text{Wölbung } W = \frac{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^4}{s^4}$$

$$\text{relative Schiefe } R = \frac{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^3}{\sqrt{s^6}}$$

Die relative Schiefe wird verwendet um festzustellen, ob eine Verteilung symmetrisch oder um den Mittelwert schief ist. Eine Verteilungsfunktion kann als symmetrisch betrachtet werden, wenn $-0,5 < \text{relative Schiefe} < +0,5$ ist.

Die Verteilung ist stark schief, wenn dieser Wert ± 1 übersteigt. Wie der Tabelle 1 zu entnehmen ist, ist die Verteilungsfunktion der Zellzahlen des Liquor cerebrospinalis der vorliegenden Versuche als stark schief anzusehen.

Die Wölbung verwendet man, um die Flachheit bzw. Steilheit einer Verteilungskurve zu interpretieren. Die Wölbung einer Normalverteilung liegt etwa bei 3. Bei Werten unter 3 wird die Kurve flacher, bei Werten über 3 steiler.

Die Angaben zur Wölbung und Schiefe der Verteilungskurve in Tab. 1 verdeutlichen, dass die Zellzahlen des Liquor cerebrospinalis, über die gesamte Versuchsdauer betrachtet, keiner Normalverteilung unterliegen. Damit kann der für die Prüfung von Mittelwerten bei einer normalverteilten Grundgesamtheit übliche t-Test nicht angewendet werden, der Übergang zu verteilungsfreien Prüfverfahren wird erforderlich. Hier bietet sich der WILCOXON- (Mann-Whitney-) Test an (118). Mit diesem Test wurden die Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Liquorzellzahlen für die verschiedenen Mumpsviren bei unterschiedlichen Irrtumswahrscheinlichkeiten geprüft.

Tab. 1 Statistische Kenngröße der Verteilungsfunktion der Zellzahlen des Liquor cerebrospinalis der Minischweine nach i.c. Mumpsvirusapplikation über die gesamte Versuchsdauer

	Wild- virus 1	Wild- virus 2	Wild- virus 3	Jeryl Lynn	Lenin- grad-3
Anzahl der Werte n	13	15	4	13	21
Mittelwert	123	68,7	72,5	42,5	16,3
Varianz	21842	4886,6	4314,8	1502,9	186,2
Wölbung	5,1	7,9	2,3	5,4	5,3
relative Schiefe	1,7	2,2	1,1	1,8	1,6

4 Ergebnisse

4.1 Immunfluoreszenzoptischer Nachweis des Mumpsvirus bei Kindern mit einer Mumpsmeningitis

Unter den Infektionskrankheiten im Kindesalter sind die viralen Infektionen von besonderer Bedeutung, gegenwärtig die häufigste ist die Parotitis epidemica. Das Auftreten einer serösen Meningitis infolge einer Mumpsvirusinfektion des Kindes ist ein geläufiges Krankheitsbild. Die Diagnose des Mumps bei Patienten mit meningitischen Symptomen ist nicht immer eindeutig, wenn die typische Schwellung der Ohrspeicheldrüse fehlt, es keine Hinweise in der Anamnese auf eine zurückliegende Parotisschwellung oder einen Kontakt mit anderen Mumpserkrankten gibt.

Diagnostische Labormethoden liefern hier wichtige zusätzliche, oft die einzigen diagnostischen Kriterien. In der klinischen Praxis ist die spezifische ätiologische Diagnostik ausschließlich auf die Serologie begrenzt. Wie bereits im Abschnitt 2.6. besprochen, wird die Ätiologie einer Virusmeningitis durch die Serologie aber erst retrospektiv geklärt. Die ätiologische Abgrenzung der verschiedenen Virusmeningitiden untereinander durch Liquoruntersuchungen (Cytologie, Eiweiß, Zucker) ist ebenfalls nicht problemlos möglich. Um die spezifische Erregerdiagnostik bei Virusmeningitiden unklarer Ätiologie zu beschleunigen, bietet sich die Immunfluoreszenz als schnelles und erregerspezifisches Nachweisverfahren für die Untersuchung von Liquorsedimenten an. Die Ergebnisse einer Überprüfung der Anwendungsmöglichkeiten der Immunfluoreszenz an Liquorzellen zum spezifischen Antigennachweis bei natürlichen Mumpserkrankungen als diagnostische Methode werden im folgendem vorgestellt.

In 39/57 Proben (68%) wurde durch die Bestimmung der komplementbindenden Antikörper das Mumpsvirus als ätiologisches Agens für die Meningitis diagnostiziert. Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenztechnik konnte in 25/39 Proben (64%) das Mumpsantigen in den lymphomonozytären Liquorzellen bestätigt werden (**Abb. 2**). In 14 Proben (36%) konnte bei ebenfalls positiver Komplementbindungsreaktion das Mumpsvirusantigen mittels Immunfluoreszenz nicht nachgewiesen werden (falsch negative Befunde). Der immunfluoreszenzoptische Nachweis des Mumpsantigens fiel in 18/57 Proben (32%) negativ aus, bei hier gleichfalls negativer Serologie. Die Ergebnisse sind in Tab. 2 wiedergegeben. Mit den vorliegenden Befunden kann die Eignung der Immunfluoreszenz als diagnostische Schnellmethode zum spezifischen Nachweis des Mumpsantigens in den Liquorzellen natürlich erkrankter Kinder prinzipiell bestätigt werden. Für die falsch negativen Befunde werden Zeitfaktoren und eine Antigenmaskierung diskutiert. Im Folgenden werden die Anwendungsmöglichkeiten der Liquordiagnostik (Zellzahl und Cytologie) sowie der Immunfluoreszenz für den spezifischen Erregernachweis im Tierexperiment geprüft.

Tab. 2 Immunfluoreszenzoptischer Nachweis des Mumpsantigens in Liquorproben von Kindern mit einer Mumpsmeningitis

Liquor cerebrospinalis		Serum			
Zellzahl X 10 ⁶ /l	%Granulo- zyten	Immunflores- zenz		Mumpsantikörper (KBR)	
		positiv	negativ	positiv	negativ
84 – 1 290	1 – 50	25		25	
6 – 2 283	1 – 38		18		18
1 – 1 130	1 – 77		14	14	

Dem Internationalen Einheitensystem folgend werden die Zellzahlen im Liquor cerebrospinalis in Millionen pro Liter angegeben (76).

1130×10^6 Zellen/l = 3390/3 Zellen

4.2 Ergebnisse der Liquordiagnostik bei mumpsinfizierten Affen

Die neurotrope Eigenschaft des Mumpsvirus ist neben den klinischen und sozial-ökonomischen Gründen mit eine Ursache für die Immunisierung mit einer Mumps-Lebendvakzine. Für die Immunprophylaxe des Mumps haben sich Lebendimpfstoffe als geeignet erwiesen. Die Anwendung von Lebendimpfstoffen beim Menschen setzt tierexperimentelle Sicherheitsprüfungen voraus. Alle neuropathologischen Untersuchungen mit dem Mumpsvirus wurden bisher am Affen durchgeführt.

Die Versuchsanordnung und Auswertung bei allen Experimenten mit Affen unterlag einem vorgegebenen Ablaufplan zur Prüfung des neurotrophen Verhaltens von Mumpsviren mit üblicher histologischer Auswertung. Parallel zur histologisch orientierten Versuchsauswertung wurden Liquoruntersuchungen durchgeführt, die unter folgenden Gesichtspunkten ausgewertet wurden:

- Nachweis einer Pleozytose nach intracerebraler Infektion als Ausdruck einer Mumpsmeningitis beim Affen
- Nachweis einer Dynamik in den Liquorzellbefunden (Art und Zahl der Zellen)
- prinzipielle fluoreszenzoptische Nachweisbarkeit des Mumpsvirusantigens in den Liquorzellen der Versuchsaaffen

Da Mumps bei einer natürlichen Erkrankung nahezu regelhaft zu einer Pleozytose führt, könnte die Einbeziehung der Liquordiagnostik als paraklinische Untersuchungsmethode in die tierexperimentellen Untersuchungen zum neurotrophen Verhalten von Mumpsviren die histopathologischen Befunde ergänzen.

4.2.1 Zellzahldynamik und Morphologie der Zellen des Liquor cerebrospinalis bei Versuchsaaffen

Analog zur natürlich auftretenden Mumpsmeningitis bei Kindern war auch bei allen experimentell intracerebral infizierten Grünen Meerkatzen eine statistisch gesicherte Erhöhung der Liquorzellzahl als Ausdruck der entzündlichen Prozesse an den Meningen zu beobachten. Die Erhöhung der Liquorzellzahlen war bereits am 3. Tag p. i. hoch signifikant (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 0,01$). Innerhalb der ersten Woche deutet sich ein weiterer Anstieg der Liquorzell-

zahl an, der dann im Laufe der 2. bis 4. Woche allmählich wieder zurückging. Nach 4wöchiger Versuchsdauer bestehen bei weiterhin rückläufiger Tendenz noch statistisch gesicherte Unterschiede zu den Normalwerten (Tabelle 3, 4 u. 5). Die Liquorzellzahlen liegen bei Leningrad-3 21 und 28 Tage p. i. mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 0,05$ deutlich über den Normalwerten. Bei der neuropathogenen Variante C unterscheiden sich die Liquorzellzahlen nach 28tägiger Versuchsdauer ($\alpha = 0,01$) noch von den Normalwerten. Zwischen den Liquorzellzahlen bei Leningrad-3 und der Variante C bestehen 28 Tage nach der i. c. Virusapplikation Unterschiede. Die Zellzahlen bei der neuropathogenen Variante C sind höher als bei Leningrad-3 ($\alpha = 0,1$). Der Verlauf der Zellzahlkurve im Liquor bei experimentell infizierten Affen ähnelt damit dem Zellzahlverlauf bei natürlichen Mumpsmeningitiden des Kindes. Im Allgemeinen gehen auch beim Kind die Liquorzellzahlen nach anfänglich sehr hohen Werten im Verlauf der 3. bis 4. Woche zurück und erreichen in der 5. Woche Normalwerte (6, 89, 115).

Das Zellbild ist beim Affen durch lympho-monozytäre Zellen gekennzeichnet, wobei zu jedem Zeitpunkt des Versuchs ein Überwiegen der Monozyten zu beobachten ist. Neutrophile Granulozyten waren zu den von uns geprüften Zeiten nicht nachweisbar (Tabelle 6). Da die natürliche Mumpsmeningitis bei Kindern ebenfalls durch ein lympho-monozytäres Zellbild charakterisiert ist (89), besteht auch in diesem Punkt weitgehende Übereinstimmung zwischen der experimentellen Mumpsmeningitis des Affen und der natürlichen Mumpsmeningitis des Kindes.

Tab. 3 Liquorzellzahlen und der Nachweis des Mumpsantigens in Liquorzellen bei intracerebral mit Leningrad-3 infizierten Affen

Tage p. i.	Zellzahl $\times 10^6 / l$	Liquor cerebrospinalis	
		\bar{x}	Immunfluoreszenz
21	158		Ø
21	183		Ø
21	139	160	Ø
28	12		Ø
28	17		Ø
28	20		Ø
28	36	21,5	Ø

Mittelwertvergleiche mit dem WILCOXON-Test:

	\bar{x}_{L_3}	28 Tage	\bar{x}_{normal}
\bar{x}_{L_3} 21 Tage	138,5 ⁺		156 ⁺
$-\bar{x}_{L_3}$ 28 Tage			17,5 ⁺⁺

+ Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 0,05$

++ Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 0,01$

Tab. 4 Liquorzellzahlen und der Nachweis des Mumpsantigens in Liquorzellen bei intracerebral mit der Variante C infizierten Affen

Tage p. i.	Zellzahl x 10 ⁶ /l	Liquor cerebrospinalis	
		\bar{x}	Immunfluoreszenz
3	3018		+
6	3233		+
9	1867		Ø
13	240		Ø
17	433	1758,2	Ø
28	100		Ø
28	86		Ø
28	17		Ø
28	31		Ø
28	40	54,8	Ø

Mittelwertvergleiche mit dem WILCOXON-Test:

	$\bar{x}_{Va C 28 \text{ Tage}}$	\bar{x}_{normal}
$\bar{x}_{Va C 3-17 \text{ Tage}}$	1703,4 ⁺⁺	1754,2 ⁺⁺
$\bar{x}_{Va C 28 \text{ Tage}}$		50,8 ⁺⁺
	$\bar{x}_{L-3 28 \text{ Tage}}$	
$\bar{x}_{Va C 28 \text{ Tage}}$	33,3 ^o	

o Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 0,1$

++ Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 0,01$

Tab. 5 Liquorzellzahlen und der Nachweis des Mumpsantigens in Liquorzellen bei Kontrollaffen

Tage p. i.	Zellzahl x 10 ⁶ /l	Liquor cerebrospinalis	
		\bar{x}	Immunfluoreszenz
28	4		Ø
28	3		Ø
28	5		Ø
28	6		Ø
28	2	4	Ø

Tab. 6 Morphologie der Liquorzellen vom Affen nach intracerebraler Inokulation von Mumpsviren

Zellart	Leningrad-3 Wochen p. i.		Variante C Wochen p. i.		
	3	4	1	2	4
Monozyten	60%	76%	57%	53%	56%
Lymphozyten	32%	20%	31%	42%	39%
Lymphoidzellen	8%	4%	12%	5%	5%

4.2.2 Immunfluoreszenzoptischer Nachweis des Mumpsantigens in den Liquorzellen

Bei Affen konnte, in Übereinstimmung mit den Befunden beim Menschen, der Nachweis des Mumpsantigens in den lympho-monozytären Zellen des Liquors erbracht werden. Das Mumpsantigen wurde beim Affen nur innerhalb der ersten Versuchswoche in den Zellen nachgewiesen. In der zweiten bis vierten Woche nach Versuchsbeginn war dies nicht mehr möglich (Tabelle 3 u. 4). Der Nachweis des Mumpsantigens war durch eine hellgrüne, granuläre Fluoreszenz, die das gesamte Cytoplasma umfassen konnte gekennzeichnet. Häufig war die Fluoreszenz in der unmittelbaren Umgebung des Zellkerns besonders deutlich (**Abb. 3**).

An Gefrierschnitten des Gehirns konnte 6 und 9 Tage p. i. in den Ependymzellen eine für das Mumpsvirus typische hellgrüne, granuläre, cytoplasmatische Fluoreszenz gefunden werden. Durch den zeitlich begrenzten immunfluoreszenzoptischen Nachweis des Mumpsantigens in den Liquorzellen der experimentell infizierten Affen wird deutlich, dass der Nachweis einer positiven Mumpsfluoreszenz in den Liquorzellen einer zeitlichen Abhängigkeit unterliegt. Dies könnte auch die Ursache für falsch negative Befunde bei den an Mumps erkrankten Kindern sein.

Die hier vorgestellten Liquorbefunde bei experimentell infizierten Grünen Meerkatzen korrelieren gut mit den Beobachtungen bei natürlichen Mumpsmeningitiden der Kinder. Liquoruntersuchungen bei experimentell infizierten Versuchstieren stellen somit eine Erweiterung der bisher üblichen morphologischen Untersuchungstechnik dar. Es ist zu überprüfen, ob der immunfluoreszenzoptische Nachweis des Mumpsantigens in den Liquorzellen auch bei anderen Versuchstieren geeignet ist, neurotrophe Eigenschaften des Mumpsvirus zu charakterisieren. Systematische Untersuchungen zum Verlauf der Liquorpleozytose und zur immunfluoreszenzoptischen Nachweisbarkeit des Mumpsantigens in den Liquorzellen werden im Folgenden vorgestellt.

4.3 Ergebnisse der Liquordiagnostik bei mupsinfizierten Minischweinen und Katzen

4.3.1 Zellzahldynamik im Liquor cerebrospinalis

Minischweine und Katzen reagieren auf intracerebral injiziertes Mumpsvirus mit einer deutlichen Liquorpleozytose. Die Höhe der Zellzahl im Liquor ist bei Mumpswildvirusisolaten mit einer statistischen Sicherheit von 95% bedeutend größer als bei den Impfviren. Sie unterliegt starken individuellen Schwankungen, wie dies auch bei einer natürlichen Mumpserkrankung des Menschen der Fall ist. Es zeigte sich generell ein Anstieg der Liquorzellzahl in der ersten Woche. Bei Wildvirus1 ist nach der zweiten Versuchswoche ein statistisch gesicherter Abfall der Liquorzellzahlen zu beobachten. Wildvirus 2, Jeryl Lynn und Leningrad-3 zeigen eine ähnliche Tendenz, die sich aber auf einem so hohen Signifikanzniveau nicht sichern läßt. Nach

insgesamt achtwöchiger Versuchsdauer war der Rückgang der Zellzahl auf Normalwerte bei den Impfviren und den Wildviren noch immer nicht vollständig erreicht, die Werte liegen zwischen 11×10^6 und 29×10^6 Zellen/l (**Abb. 4** u. Tab. 7).

Die Pleozytose bei den Katzen war nicht so ausgeprägt wie bei den Minischweinen, d. h. die Liquorzellzahlen waren im Allgemeinen niedriger. Die Entwicklungstendenz der Zellzahlen entspricht aber den Ergebnissen beim Minischwein. Die Liquorzellzahlen sind bei Mumpswildvirus infizierten Katzen signifikant größer als bei den mit Jeryl Lynn infizierten Tieren. (**Abb. 5** u. Tab. 8).

Tab. 7 Entwicklung der Zellzahl im Liquor von Minischweinen nach i. c. Inokulation von Mumpsviren

Tage p. i.	Wildvirus 1		Wildvirus 2		Wildvirus 3		Jeryl Lynn		Leningrad-3	
	Zellzahl $\times 10^6 / l$	\bar{x}								
3	540		77		32		48		40	
			65				153		17	
7	288		24				39		13	
			21				15		15	
									23	
10	250		298		186		12		4	
	133								14	
									8	
13	56		105				89		5	
	17						22		9	
		214		98				54	30	19,7
17	123		103		30		41		2	
	25		20				12		28	
			21							
21	41		101				60		6	
	59		65						5	
28	28		31		42		10		6	
			77						4	
									21	
56	21		14				23		14	
	18	45	8	48,9			24	28,3	20	11,8
Gesamt		123		68,7		72,5		42,2		16,3
K 21	18		9				31		19	
K 28	13		24		51		35		3	
K 56	19		27				9		14	
	11		13						19	

Mittelwertvergleich mit dem WILCOON-Test:

	\bar{x} Wildv.2	\bar{x} J.Lynn	\bar{x} L-3
\bar{x} Wildv.1	54,3	60,8 +	106,7+++
\bar{x} Wildv.2		25,5	52,4 ++
\bar{x} J.Lynn			25,9 +
	\bar{x} Wildv.1 17-56 Tage		\bar{x} Wildv.2 17- 56 Tage
\bar{x} Wildv.1 3-13Tage	169 +		
\bar{x} Wildv.2 3-13 Tage			49,1
	\bar{x} J.Lynn 17-56 Tage		\bar{x} L-3 17-56 Tage
\bar{x} J.Lynn 3-13 Tage	15,7		
\bar{x} L-3 3-13 Tage			7,9

+ Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 0,05$

++ Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 0,01$

+++ Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 0,001$

Tab. 8 Entwicklung der Zellzahl im Liquor von Katzen nach i.c. Inokulation von Mumpsviren

Tage p. i.	Wildvirus 1		Jerry Lynn	
	Zellzahl $\times 10^6 / l$	\bar{x}	$\times 10^6 / l$	\bar{x}
3	10		8	
	30			
7	40			
10	45		7	
21	37		37	
	16		15	
	19	28,1		
28			14	16,2
K			3	

Mittelwertvergleiche mit dem WILCOXON-Test:

	\bar{x} J.Lynn
\bar{x} Wildv.1	11,9+

+ Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 0,05$

4.3.3 Immunfluoreszenzoptischer Nachweis des Mumpsantigens in den Liquorzellen

Mittels der indirekten Immunfluoreszenztechnik konnte das Mumpsantigen in den lympho-monozytären Zellen des Liquors der Versuchstiere nachgewiesen werden. Der spezifische Nachweis des Mumpsvirusantigens war durch eine leuchtende hellgrüne Fluoreszenz im Zytoplasma der Zellen gekennzeichnet. Die Fluoreszenz erstreckte sich über das gesamte Plasma und war oft in unmittelbarer Nähe des Zellkerns besonders intensiv. Häufig war aber auch eine granuläre Fluoreszenz im Plasma zu beobachten. Der Zellkern war in jedem Falle frei von jeglicher Fluoreszenzerscheinung.

Bei den Jeryl Lynn, Leningrad-3 und Wildvirus 3 infizierten Minischweinen konnte das Antigen bereits 3 Tage nach der Infektion nachgewiesen werden. Es blieb knapp 3 Wochen (bis 17 Tage p. i.) nachweisbar, wobei die Fluoreszenzintensität in der zweiten Woche ihr Maximum erreichte. Bei den mit Wildvirus1 und 2 infizierten Tieren wurde das Auftreten einer positiven Fluoreszenz erst 10 Tage nach der Infektion beobachtet, sie blieb aber auch hier bis zur dritten Woche (bis 21 Tage p. i.) nachweisbar. Übereinstimmend kann festgestellt werden, dass der fluoreszenzoptische Nachweis des viralen Mumpsantigens 28 Tage nach Versuchsbeginn nicht mehr möglich war (**Abb. 7, Abb. 8, Abb. 9** u. Tab. 10).

Tab. 10 Fluoreszenzoptischer Nachweis der Mumpsvirusantigene in den Liquorzellen der Minischweine

Tage i . p.	Wild- virus 1	Wild- virus 2	Wild- virus 3	Jeryl Lynn	Lenin- grad-3
3	∅	∅	+	+	+
7	∅	∅	+	+	+
10	+	+	++	++	++
13	+	+	++	++	++
17	+	+	+	+	+
21	+	∅	∅	∅	∅
28	∅	∅	--	∅	∅
56	∅	∅	--	∅	∅

+	deutliche, spezifische Fluoreszenz
++	besonders kräftige, spezifische Fluoreszenz
∅	keine Fluoreszenz
--	keine Liquorproben

Der immunfluoreszenzoptische Nachweis des Mumpsantigens in den Liquorzellen der Katzen zeigte die gleiche Tendenz. Da die Subokzipitalpunktion bei den Katzen nicht immer erfolgreich verlief, läßt sich über das Ende der Nachweisbarkeit des Mumpsantigens bei den Jeryl Lynn infizierten Katzen keine Aussage machen. Die frühe Nachweisbarkeit des Impfstammes 3 Tage p. i. und der verzögerte Beginn der fluoreszenzoptischen Nachweisbarkeit des Wildvirus 1 7 Tage p. i. wird aber auch bei den Katzen deutlich. Die Nachweisbarkeit des Wildvirus 1 hält hier bis zum 13. Tag an (Tab. 9 u. Tab. 11).

Tab. 11 Fluoreszenzoptischer Nachweis der Mumpsvirusantigene in den Liquorzellen der Katzen

Tage i . p.	Wild- virus 1	Jeryl Lynn
3	∅	+
7	+	+
10	+	--
13	+	--
17	--	∅
21	∅	∅
28	--	∅

-
- + deutliche, spezifische Fluoreszenz
 - + + besonders kräftige, spezifische Fluoreszenz
 - ∅ keine Fluoreszenz
 - keine Liquorproben

4.3.4 Kontrolltiere

Interessante Resultate ergaben sich bei den Kontrolltieren, sie wurden als Kontaktkontrolle gemeinsam mit den Versuchstieren gehalten. Die Mehrzahl der Kontrolltiere (16 Tiere) zeigten 3, 4 und 8 Wochen nach Versuchsbeginn erhöhte Zellzahlen im Liquor. Es wurden mononukleäre Zellbilder mit einem überwiegendem Monozytenanteil gefunden. Die Häufigkeitsverteilung der Lymphozyten, Lymphoidzellen und eosinophilen Granulozyten entspricht ebenfalls den Befunden bei den Versuchstieren (Tab. 12).

Tab. 12 Morphologie der Liquorzellen vom Minischwein (Kontrolltiere)

Zellart	Wildvirus 1 Wochen p. i.			Wildvirus 2 Wochen p. i.		
	3	4	8	3	4	8
Monozyten	85%	80%	74%	87%	80%	64%
Lymphozyten	13%	13%	19%	13%	12%	25%
Lymphoidzellen	2%		7%		5%	7%
Eosinophile Granulozyten		6%			1%	1%
Plasmazellen		1%			2%	3%

Zellart	Jerry Lynn Wochen p. i.		Leningrad-3 Wochen p. i.		
	3	8	3	4	8
Monozyten	82%	76%	96%	89%	91%
Lymphozyten	15%	22%	4%	11%	6%
Lymphoidzellen	3%	1%			3%
Eosinophile		1%			

Ein fluoreszenzoptischer Virusnachweis war bei 3 Tieren möglich. Dabei handelt es sich um die Kontaktkontrollen, der mit Wildvirus infizierten Minischweine. Dieser Nachweis war unabhängig von der Höhe der Zellzahl (Tab. 13). Bei Kontaktkontrollen der mit Impfviren infizierten Minischweine konnte das Mumpsantigen nicht fluoreszenzoptisch in den Liquorzellen nachgewiesen werden.

Tab. 13 Liquorzellzahlen und der Nachweis des Mumpsantigens in den Liquorzellen des Minischweins (Kontaktkontrollen)

Tage p. i.	Wildvirus 1		Wildvirus 2		Wildvirus 3	
	Zellzahl x 10 ⁶ /l	IF	Zellzahl x 10 ⁶ /l	IF	Zellzahl x 10 ⁶ /l	IF
21	18	+	9	Ø		
28	13	Ø	24	+	51	+
56	19	Ø	27	Ø		
56	11	Ø	13	Ø		

Tage p. i.	Jeryl Lynn		Leningrad-3	
	Zellzahl x 10 ⁶ /l	IF	Zellzahl x 10 ⁶ /l	IF
21	31	Ø	19	Ø
28	35	Ø	3	Ø
56	9	Ø	14	Ø
56			19	Ø

+ deutliche, spezifische Fluoreszenz
Ø keine Fluoreszenz

5 Diskussion

Unter den Erkrankungen, die im Kindesalter häufig auftreten, spielen Infektionskrankheiten eine besondere Rolle. Durch die gezielten immunprophylaktischen Maßnahmen in unserem Land hat sich das Spektrum der Infektionskrankheiten im Kindesalter verändert. Erkrankungen wie beispielsweise Tuberkulose, Diphtherie, Keuchhusten, Poliomyelitis und Masern treten nicht mehr oder nur noch in geringem Umfang auf. Zu den heute noch weit verbreiteten viralen Infektionskrankheiten gehört der Mumps. Ebenfalls nicht selten sind Infektionen durch die Enteroviren bzw. virale Infektionen der Atemorgane.

Infektionskrankheiten sind oft die Ursache für entzündliche Prozesse im ZNS, die als Entzündung des Gehirnparenchyms (Enzephalitis) oder der Hirnhäute (Meningitis) mit entsprechenden klinischen Krankheitsbildern ausgeprägt sein können. Für diese pathologischen Prozesse im Gehirn einschließlich seiner Hüllen sind vor allem Bakterien (Meningokokken) und Viren verantwortlich.

Entzündliche Prozesse im Bereich der Hirnhäute widerspiegeln sich in Veränderungen vor allem der zellulären Zusammensetzung des Liquor cerebrospinalis, so dass den Liquoruntersuchungen eine besondere diagnostische Bedeutung zukommt. Durch die cytologische Beurteilung des Liquors lassen sich die bakteriellbedingten eitrigen von den virusbedingten serösen Meningitiden gut unterscheiden und schnell eine dem Krankheitsbild entsprechende Therapie einleiten. Die ätiologische Abgrenzung der verschiedenen Virusmeningitiden untereinander ist nicht problemlos möglich. Die Liquorveränderungen sind bei serösen Meningitiden uncharakteristisch, es ergeben sich keine besonderen Hinweise auf die Ätiologie der Erkrankung (94).

Gegenwärtig eine der häufigsten viralen Infektionskrankheiten im Kindesalter ist die Parotitis epidemica. Infolge einer Mumpsvirusinfektion des Kindes ist das Auftreten einer serösen Meningitis ein geläufiges Krankheitsbild, dessen Prognose als gut anzusehen ist. Da die Anzahl der Mumpserkrankungen zunimmt (41, 47, 86), ist auch mit einer Zunahme der Mumpsmeningitiden zu rechnen. Im Abschnitt 2.5. sind die cytologischen Veränderungen des Liquor cerebrospinalis bei einer Mumpsmeningitis ausführlich beschrieben. Diese Merkmale sind nicht geeignet eine Mumpsmeningitis mit großer Sicherheit von anderen Virusmeningitiden zu unterscheiden. Eiweiß- und Zuckergehalt stellen für die Mumpsmeningitis ebenfalls keine differentialdiagnostischen Kriterien dar. In der klinischen Praxis ist die spezifische ätiologische Diagnostik ausschließlich auf die Serologie begrenzt. An zeitlich (10 - 14 Tage) getrennten Serumproben des Patienten wird durch den Antikörperanstieg die Ätiologie der Virusmeningitis retrospektiv geklärt. Um die spezifische Erregerdiagnostik bei Virusmeningitiden unklarer Ätiologie zu beschleunigen, bietet sich die Immunfluoreszenz als schnelles und erregerspezifisches Nachweisverfahren für die Untersuchung von Liquorsedimenten an.

Ein Anliegen der Arbeit ist es, die Anwendungsmöglichkeiten der Immunfluoreszenztechnik an Liquorzellen zum spezifischen Antigennachweis bei natürlichen Mumpserkrankungen als diagnostische Methode zu überprüfen. Über die prinzipielle diagnostische Verwendung des fluoreszenzoptischen Nachweises des Mumpsantigens in menschlichen Liquorzellen wurde schon von SOMMERVILLE (1966), MÜLLER (1972), BOYD (1973) und MALTSEVA (1979) berichtet. Mit unseren Untersuchungen konnte bei 64% der Kinder mit einer Mumpsmeningitis das Mumpsantigen in den lympho-monozytären Zellen des Liquors innerhalb der ersten Woche nach der Parotisschwellung nachgewiesen werden. Liquorproben zu späteren Zeitpunkten der Meningitis standen uns nicht zur Verfügung. Mit diesen Befunden kann die Eignung der Immunfluoreszenz als diagnostische Schnellmethode zum spezifischen Nachweis des Mumpsantigens in den Liquorzellen natürlich erkrankter Kinder bestätigt werden. Dieser Nachweis des Mumpsantigens als ätiologisches Agens für eine Meningitis ist im Vergleich zu

serologischen Verfahren wesentlich schneller möglich. Die Durchführung des Erregernachweises in Liquorproben mit Hilfe der Immunfluoreszenz erlaubt innerhalb von 4 Stunden eine eindeutige Diagnose und ermöglicht eine klare Entscheidung über die erforderliche Therapie und die Maßnahmen zur Isolierung des Patienten. Die Anwendung der Immunfluoreszenz an Liquorzellen eröffnet auch die Möglichkeit des Aufbaues eines Screening-Verfahrens zur schnellen Klärung der Ätiologie aseptischer Meningitiden unter Umgehung der zeit- und kostenaufwendigen Verfahren wie der Anzüchtung und Typisierung der viralen Erreger bzw. des elektronenmikroskopischen Nachweises. Möglich wäre ein solches Screening-Verfahren für Meningitiden in Folge von Mumps-, Entero- und Herpesvirusinfektionen (80, 113).

Bei einer positiven KBR konnte in unserem Untersuchungsgut das Mumpsantigen mittels der Immunfluoreszenz in 36% der Fälle nicht nachgewiesen werden. Ein Teil dieser falsch negativen Befunde ist sicher noch durch eine weitere qualitative Verbesserung der verwendeten Seren zu vermeiden. Ursachen für einen negativen Befund in der Immunfluoreszenz können sein:

Das Fehlen des Antigens, eine zu geringe Zellzahl in der zu prüfenden Probe, die Probe wurde zu spät entnommen, so dass das Antigen nicht mehr vorhanden war oder aber das Antigen liegt vor, wird aber durch die Antikörper des Patienten maskiert und entzieht sich so dem fluoreszenzoptischen Nachweis (11). MALTSEVA (1979) berichtet von einem positiven fluoreszenzoptischen Nachweis des Mumpsantigens im Liquor innerhalb der ersten Woche der natürlichen Meningitis, nach 3 Wochen ist der Nachweis nicht mehr möglich. Daraus ergibt sich die Forderung, dass die Liquorproben für die Immunfluoreszenz zu einem möglichst frühen Zeitpunkt der Meningitis gewonnen werden sollten und die Präparation der Liquorsedimente sehr sorgfältig zu erfolgen hat. Um optimale Zellbilder zu erhalten, empfiehlt SAYK (1954) die Beachtung der Liquor/ Zeitregel. Bei einer Zellzahl von 200×10^6 Zellen/l sollte die Sedimentierzeit für 1ml Liquor 30 Minuten betragen.

Im Folgenden wird die Einbeziehung der Liquordiagnostik (Zellzahl, Cytologie, Immunfluoreszenz) als paraklinische Untersuchungsmethode bei der tierexperimentellen Beurteilung des neurotrophen Verhaltens von Mumpsviren im Tierversuch geprüft. Die gutbekannte neurotrophe Eigenschaft des Mumpsvirus (12, 22, 52, 58) ist neben den klinischen und sozial-ökonomischen Gründen ein Grund für die Immunisierung mit einer Mumps-Lebendvakzine in Ländern wie der UdSSR, Bulgarien, den USA, Japan und der BRD (45, 53, 78, 93, 120, 121, 125, 129, 130). Für die Immunprophylaxe des Mumps haben sich Lebendimpfstoffe als geeignet erwiesen. Die Anwendung von Lebendimpfstoffen beim Menschen setzt entsprechende tierexperimentelle Sicherheitsprüfungen voraus. Dabei ist die Frage nach der Unschädlichkeit einer Mumpsvakzination, insbesondere mit der Forderung verbunden die neurotrophen Eigenschaften, d. h. die Restneuropathogenität des Impfstammes zu charakterisieren. Es besteht die Notwendigkeit des Ausschlusses neuropathogener Eigenschaften eines Mumps-Lebendimpfstoffes vor seiner Anwendung. Bisher wurden alle neuropathologischen Untersuchungen mit dem Mumpsvirus am Affen durchgeführt. Das für Mumps charakteristische Bild histopathologischer Veränderungen im Zentralnervensystem des Affen nach intracerebraler Applikation verschiedener Mumpsvirusstämme unterschiedlicher Attenuierungsgrade ist von vielen Autoren beschrieben (16, 74, 104, 105, 139). LEVEIJBUK (1979) beweist die Spezifität der pathologischen Befunde mit Hilfe der Immunfluoreszenz. Das Mumpsantigen wurde hauptsächlich in den lateralen Ventrikeln meist in den Ependymzellen, in der subependymalen Zone und im Stroma des Plexus chorioideus nachgewiesen. Über den immunfluoreszenzoptischen Nachweis des Mumpsantigens bei infizierten Affen in der Parotis sowie im Rückenmark, in der Medulla und wahrscheinlich auch im Groß- und Kleinhirn berichtete auch schon CHU (1951).

In all diesen Arbeiten werden die neuropathogenen Restpotenzen der Impfstoffe nach dem Auftreten histopathologischer Veränderungen im ZNS beurteilt. Der Frage der Mumpsmeningitis und der mit ihr einhergehenden Pleozytose wurde bei diesen Untersuchungen bisher noch keine Beachtung geschenkt. Da Mumps bei einer natürlichen Erkrankung nahezu regelhaft zu einer Pleozytose führt, kann die Einbeziehung der Liquordiagnostik als paraklinische Untersuchungsmethode in die tierexperimentellen Untersuchungen zum neurotrophen Verhalten von attenuierten Mumpsviren und Mumpswildviren die histopathologischen Befunde ergänzen. Bei unseren experimentell infizierten Affen konnte durch die Bestimmung der Zellzahl im Liquor eine statistisch gesicherte ($\alpha = 0,05$) Pleozytose als Ausdruck der entzündlichen Prozesse an den Meningen festgestellt werden. Schon 3 Tage nach Versuchsbeginn war die Zellzahlerhöhung im Liquor deutlich ausgeprägt. Die meningeale Reizung durch das Mumpsvirus war bei den Grünen Meerkatzen nach 4 Wochen noch nicht vollständig abgeklungen. Die Zellzahlen unterscheiden sich noch signifikant von den Normalwerten, zeigten jedoch eine rückläufige Tendenz. Bei Affen, die mit der neuropathogenen Variante C infiziert waren, sind die Liquorzellzahlen auch 28 Tage p. i. signifikant ($\alpha = 0,1$) höher als bei den Leningrad-3 infizierten Tieren zu diesem Zeitpunkt. Die Entwicklung der Zellzahl im Liquor bei experimentell infizierten Affen ähnelt damit dem Verlauf der Pleozytose bei natürlichen Mumpsmeningitiden der Kinder. Im Allgemeinen wird bei Kindern jedoch davon ausgegangen, dass sich die Zellzahl im Liquor nach 4 Wochen wieder normalisiert hat (89, 115).

Das Differentialzellbild des Liquor cerebrospinalis bei den Affen war genau wie bei den natürlichen Mumpsmeningitiden der Kinder durch lympho-monozytäre Zellen gekennzeichnet, so dass auch in diesem Punkt weitgehende Übereinstimmung zwischen der experimentellen Mumpsmeningitis des Affen und der natürlichen Mumpsmeningitis des Kindes besteht.

Die frühe (3 Tage p. i.) fluoreszenzoptische Nachweisbarkeit des Mumpsvirus in den Liquorzellen des Affen korreliert gut mit den Befunden von HERNDON (1974). Er fand bei natürlichen Mumpsinfektionen des Menschen Paramyxovirus-ähnliche Nukleokapside in den Ependymzellen, in den Zellen des Plexus chorioideus und in den Lymphozyten der Liquorsedimente. Virale Einschlüsse und Nukleokapsid-ähnliche Strukturen waren in den polymorphkernigen Zellen wie auch bei den intracerebral infizierten Affen nicht zu beobachten. Der Nachweis des Mumpsantigens in den Liquorzellen experimentell infizierter Affen stimmt mit den fluoreszenzoptischen Befunden der von uns untersuchten natürlichen Mumpsmeningitiden überein. Der fluoreszenzoptische Nachweis des Mumpsantigens in den Liquorzellen bestätigt die Spezifität der Liquorveränderungen. Die Liquorbefunde bei den experimentell infizierten Grünen Meerkatzen sind mit den Beobachtungen bei natürlichen Mumpsmeningitiden vergleichbar. Liquoruntersuchungen bei experimentell infizierten Versuchstieren können somit eine Erweiterung der bisher üblichen ausschließlich morphologischen Untersuchungstechnik darstellen.

Die Frage nach der Häufigkeit einer Liquorzellvermehrung im Gefolge einer Mumpserkrankung, die Klärung des Verlaufs der Liquorpleozytose bei einer Mumpsinfektion mit Viren vom Wildtyp sowie die neuropathogenen Eigenschaften des Erregers erfordern umfangreiche vergleichende tierexperimentelle Arbeiten. Für die Bearbeitung von Fragen, die das neuropathogene Verhalten von Mumpsviren betreffen, sind bisher ausschließlich Affen verwendet worden. In Zukunft sind diese Tiere den vorgeschriebenen tierexperimentellen Sicherheitsprüfungen für mögliche Impfstoffkandidaten vorzubehalten. Probleme bei der Beschaffung von Affen in ausreichendem Umfang, die dafür erforderlichen finanziellen Mittel und die aufwendige Haltung der Tiere dürften die weitere Ausdehnung der Verwendung dieses Tiermodells begrenzen. Es war daher erforderlich, sich nach einem Tiermodell umzusehen, mit dem diesen Fragen bei vertretbarem Aufwand an Kosten und Haltung nachgegangen werden kann. In der Literatur wird keine Tierart beschrieben, die natürlich an Mumps erkrankt und alle Symptome

des klassischen Mumps einschließlich einer Meningitis entwickelt. Für bestimmte Fragestellungen müssen also geeignete Tiermodelle gesucht werden. So wird z. B. die Immunogenitätsbestimmung von Mumpsvirusstämmen an Meerschweinchen durchgeführt. Die Untersuchungen der neuropathogenen Eigenschaften des Mumpsvirus konzentrierten sich bisher neben den Affen auf syrische Goldhamster. Als Ergebnis dieser Versuche sind zwar Unterschiede bei den einzelnen speziell neuroadaptierten Mumpsvirusstämmen in der hydrozephalogenen Wirkung zu beobachten, Unterschiede im Attenuierungsgrad ließen sich jedoch nicht feststellen (28, 55, 57, 81, 133, 134, 135, 136).

In den vergangenen Jahren hat das Schwein als Versuchstier in zunehmendem Maße an Bedeutung gewonnen. Bei der experimentellen Bearbeitung von Stoffwechsel- und Herz-Kreislaufkrankungen (24) sowie in der virologischen Forschung wurden Schweine zur Abklärung der Pathogenese von Infektionen mit hämagglutinierenden Enzephalomyelitiden (Coronaviren) eingesetzt (2, 3). GOGOLIN (1981) berichtet über erste Erfahrungen bei der Verwendung des Schweines für Neuropathogenitätsbestimmungen von Mumpsimpfstoffen, Ergebnisse, die wir anhand von vergleichenden Untersuchungen verschiedener Tiermodelle ebenfalls erhielten (71). Neben dem Tiermodell Minischwein erwies sich auf Grund charakteristischer morphologischer und cytologischer Veränderungen auch die Katze als ein geeignetes Tiermodell. Mit den beiden einheimischen Tiermodellen Minischwein und Katze wurde versucht, die Frage des Verlaufs und der Dauer einer experimentellen Mumpsmeningitis unter Verwendung klassischer Impf- und Mumpswildvirusstämme zu bearbeiten. In diesem Zusammenhang interessierten die Veränderungen des Liquor cerebrospinalis, insbesondere hinsichtlich der Zellzahl, der Cytologie und der immunfluoreszenzoptischen Nachweisbarkeit des Erregers.

Die von uns verwendeten Tierarten, Minischwein und Katze reagierten auf intracerebral injiziertes Mumpsvirus mit einer statistisch gesicherten Liquorpleozytose, Befunde, die sich auch beim Affen ergeben hatten. Die Höhe der Zellzahl unterlag bei den Tieren gleichfalls starken individuellen Schwankungen, wie dies auch bei natürlichen Mumpserkrankungen des Menschen der Fall ist (5, 97, 132). Der Verlauf der Pleozytose läßt eine allgemeine Dynamik erkennen. Alle Minischweine und Katzen reagieren auf intracerebral inokuliertes Mumpsvirus bereits in der ersten Woche mit einer statistisch belegten Liquorpleozytose. Bei Wildviren ist nach der zweiten Woche ein statistisch gesicherter Abfall der Liquorzellzahlen zu beobachten. Die Impfviren, Jeryl Lynn und Leningrad-3, zeigten eine ähnliche Tendenz, die aber auf dem hohen Signifikanzniveau von 95% nicht gesichert werden konnte. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den verwendeten Viren ergaben sich hinsichtlich der Höhe der Zellzahlen im Liquor der Versuchstiere. Mumpswildvirusisolate verursachen höhere Zellzahlen im Liquor als Impfviren. Die unterschiedliche Ausprägung der Liquorpleozytose bei Tieren, die mit Mumpsviren vom Wildtyp bzw. Impftyp infiziert waren, läßt Unterschiede in den neurotrophen Eigenschaften der Viren erkennen. Die Zellzahlerhöhung ist nach 4 Wochen rückläufig, erreicht aber noch nicht die Normalwerte. Da innerhalb des ursprünglich gewählten Versuchszeitraumes von 4 Wochen die Normalwerte nicht erreicht wurden, wurde bei den Minischweinversuchen die Versuchsdauer auf 8 Wochen ausgedehnt. Die Zellzahlen im Liquor waren zwar nach dieser Zeit gesunken, aber noch nicht auf dem normalen Niveau. Nach Angaben von FISCHER (1951) liegen die normalen Liquorzellwerte beim Schwein zwischen 1 und $14/3$ Zellen ($<5 \times 10^6$ Zellen/l).

Die bei den Versuchstieren über 8 Wochen anhaltende Liquorpleozytose ist möglicherweise experimentell bedingt. Den Tieren wurde intracerebral eine große Virusmenge appliziert, die eine anhaltendere meningeale Reizung auslöst. Dies ist bei einer natürlichen Infektion nicht der Fall. Es ist daher von Interesse, inwieweit das Mumpsvirusantigen auch zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion in den Liquorzellen noch nachweisbar ist.

Auch bei natürlichen Mumpsmeningitiden der Kinder ist die Liquorpleozytose bereits in den ersten Tagen deutlich ausgeprägt. Bei einigen Patienten konnte nach einer vorzeitigen Kontrollpunktion (5ter Behandlungstag) ein weiterer Anstieg der Zellzahl beobachtet werden (102). Allgemein wird davon ausgegangen, dass die Zellzahlen bei Kindern nach 3 - 4 Wochen wieder ihre Normalwerte erreichen (115, 117). WILFERT (1969) und AZMI (1975) berichten, dass die Pleozytose sogar 5 bzw. 14 Wochen anhalten kann. Bei Patienten liegt eine verlängerte Liquorpleozytose vor, wenn sie mehr als 5 Wochen andauert (123). Bei einer anhaltenden Pleozytose liegt die Vermutung nahe, dass auch die Virusinfektion über diesen Zeitraum andauert. Bevor wir uns in einem weiteren Abschnitt mit der fluoreszenzoptischen Nachweisbarkeit des Mumpsantigens in den Liquorzellen der Minischweine und Katzen beschäftigen, noch einige Ausführungen zum Differentialzellbild der Mumpsmeningitis.

Nach OLISCHER (1967) sind die Liquorveränderungen bei Virusmeningitiden meist uncharakteristisch, die Granulozytose der akuten Phase kann gelegentlich nur einige Stunden anhalten. Neutrophile Granulozyten werden sehr schnell lysiert, so dass der Übergang in die lymphozytäre Phase sehr schnell erfolgt (32). Das Differentialzellbild des Liquors bei einer natürlichen Mumpsmeningitis wurde im Abschnitt 2. 5. ausführlich beschrieben. Die Zellbilder sind durch lympho-monozytäre Zellformen gekennzeichnet, wobei auch schon zu Beginn der Erkrankung monohistiozytäre Zellformen überwiegen. Bei allen Versuchstieren waren lymphomonozytäre Zellbilder zu beobachten. Während der gesamten Versuchsdauer überwog bei den Minischweinen der Monozytenanteil. Neutrophile Granulozyten fehlten in den ersten Liquorsedimenten völlig. Da die Minischweine frühestens nach 3 Tagen punktiert wurden, ist hierin die Ursache für das nicht Erfassen der Granulozytose zu suchen. Der vorherrschende Monozytenanteil in den Liquorsedimenten der Minischweine korreliert gut mit den Beobachtungen (1, 7, 65, 112, 122) bei natürlichen Mumpserkrankungen.

Die Erhöhung der Zellzahl im Liquor überhaupt und das Differentialzellbild des Liquors bei den Minischweinen und Katzen nach einer Mumpsvirusapplikation belegen die Übereinstimmung zwischen der abakteriellen Meningitis natürlich mumpserkrankter Kinder und der experimentellen Mumpsmeningitis der Versuchstiere. Die experimentellen Veränderungen des Liquor cerebrospinalis nach i. c. Mumpsvirusapplikation sind damit als charakteristisch für eine Mumpsmeningitis anzusehen. Die vorgestellten Befunde sprechen für die Eignung der Tiermodelle Minischwein und Katze für Arbeiten mit dem Mumpsvirus. Die Tiermodelle können für Untersuchungen zum Verlauf der Liquorpleozytose bei einer Mumpsmeningitis und zur Charakterisierung der neurotrophen Eigenschaften des Mumpsvirus eingesetzt werden.

Die Erregerspezifität der Liquorveränderungen konnte bei natürlichen Mumpsmeningitiden der Kinder und der experimentell infizierten Affen durch die Immunfluoreszenz bewiesen werden. Mit Hilfe fluoreszenzoptischer Untersuchungen der Liquorsedimente wird die Spezifität der Liquorveränderungen bei den Minischweinen und Katzen geprüft.

Der fluoreszenzoptische Nachweis des Mumpsantigens in Organen infizierter Tiere wurde schon häufig beschrieben. Danach ist das Mumpsantigen im Gehirn intracerebral infizierter Tiere 3 - 11 Tage p. i. (55) nachweisbar. HAYASAKI (1976), WOLINSKI (1976) und JOHNSON (1978) berichten über eine 22 - 50tägige Nachweisbarkeit bei intraperitonealer Infektion von Nagern mit neuroadaptierten Mumpsvirusstämmen. Bei den von uns mit Mumpsimpfstämmen infizierten Schweinen war der fluoreszenzoptische Nachweis des Mumpsantigens in den Liquorzellen vom 3. - 17. Tag p. i. möglich. Bei Mumpsviren vom Wildtyp konnte erst 7 Tage p. i. eine Fluoreszenz beobachtet werden, die dann bis zum 21. Tag anhielt. Die Ursache für diese späte Nachweisbarkeit der Mumpswildviren könnte in der noch sehr geringen Adaptation der Viren gesehen werden. Wildvirus 3 ist durch seine hohe Passagezahl schon gut adaptiert und verhält sich hinsichtlich der fluoreszenzoptischen Nachweisbarkeit (3. - 17. Tag p. i.) wie ein Impfvirus, hat aber seine neuropathogenen Eigenschaften noch nicht verloren, wie die

hohen Zellzahlen zeigen. Damit können die fluoreszenzoptischen Befunde beim Minischwein zur Beurteilung der neurotrophen Eigenschaften von Mumpsviren beitragen. Der immunfluoreszenzoptische Nachweis des Mumpsvirusantigens in den Liquorzellen ist darüber hinaus ein Beweis für die Erregerspezifität der Liquorveränderungen (Zellzahl, Cytologie) infolge der experimentellen intracerebralen Mumpsinfektion. Da die Tiermodelle Minischwein und Katze mit spezifischen Liquorbefunden auf intracerebral injiziertes Mumpsvirus reagieren, wie die Vergleiche mit den Versuchsaffen und den natürlichen Mumpsmeningitisfällen der Kinder zeigen, stellen sie eine Erweiterung der tierexperimentellen Basis dar.

Wie die fluoreszenzoptischen Befunde zeigen, besteht kein Zusammenhang zwischen der Höhe der Liquorzellzahlen und der fluoreszenzoptischen Nachweisbarkeit des Mumpsantigens in den Liquorzellen. Durch den immunfluoreszenzoptischen Nachweis des Mumpsantigens in den Liquorzellen der experimentell infizierten Tiere wird deutlich, dass dieser Nachweis nur zeitlich begrenzt möglich ist. Der Nachweis einer positiven Mumpsfluoreszenz in den Liquorzellen unterliegt einer zeitlichen Abhängigkeit. Gleiches war auch bei den Kindern mit einer natürlichen Mumpsmeningitis zu beobachten. Die fluoreszenzoptische Nachweisbarkeit eines Erregers ist von zahlreichen Faktoren abhängig, in erster Linie aber von der Virusvermehrung. Ein negativer immunfluoreszenzoptischer Befund kann also auch dadurch entstehen, dass das Antigen zwar vorhanden, die geringe Menge aber nicht nachweisbar ist, etwa zu Beginn der Erkrankung. Die Quantität der Virusvermehrung scheint jedoch mit der Gegenwart humoraler Antikörper in Beziehung zu stehen (81). Antikörper sind in der Lage das virale Antigen zu maskieren und es so dem fluoreszenzoptischen Nachweis zu entziehen (11). Es gibt zahlreiche Arbeiten, die über die Bildung mumpspezifischer Antikörper im Liquor bei einer Mumpsmeningitis berichten (36, 85, 124). MORISHIMA (1980) beobachtete das Maximum mumpspezifischer Antikörper schon 4 - 10 Tage nach Beginn der Meningitis im Liquor. Setzt die humorale Antikörpersynthese erst nach 2 Wochen ein (116) so korreliert dies gut mit der immunfluoreszenzoptischen Nachweisbarkeit des Mumpsantigens, die bis zum 17. bzw. 21. Tag p. i. möglich war. In diesem Zusammenhang sind auch Befunde der zellulären Immunität bei Mumpsmeningitiden von Interesse. FRYDEN (1978) und REUNANEN (1982) beschreiben speziell gegen Mumpsviren sensibilisierte Lymphozyten im Liquor von Patienten mit einer Mumpsmeningitis. Weiterhin ist der relative Anteil von T-Lymphozyten im Liquor bei Mumpsmeningitiden höher als im peripheren Blut. Hier ergeben sich Ansatzpunkte für weitere fluoreszenzoptische Untersuchungen am Liquor cerebrospinalis im Hinblick auf die humorale und zelluläre Immunabwehr im Liquor.

Ausgehend von den charakteristischen Liquorveränderungen bei den Versuchstieren und dem Nachweis der Erregerspezifität dieser Veränderungen durch die Immunfluoreszenz sollen nun die Resultate bei den Kontaktkontrollen betrachtet werden. Alle Kontrolltiere wiesen nach 3, 4 bzw. 8wöchiger Versuchsdauer erhöhte Zellzahlen im Liquor auf. Dies spricht für eine meningale Reizung obwohl den Tieren kein Virusmaterial appliziert wurde. Bei den Kontaktkontrollen der mit Wildviren infizierten Minischweine konnte das Mumpsvirusantigen immunfluoreszenzoptisch in den Liquorzellen nachgewiesen werden. Diese Befunde bestätigen die Erregerspezifität der Liquorpleozytose. Bei natürlichen Mumpsinfektionen des Menschen ist bekannt, dass das Mumpsvirus aus dem Speichel, dem Blut, dem Liquor und dem Urin isoliert werden kann. Möglicherweise waren Speichel und Urin der Versuchstiere auch die Infektionsquelle für die Kontaktkontrollen. Bei Kontaktkontrollen der mit Mumpsimpfviren infizierten Minischweine war das Mumpsvirusantigen in den Liquorzellen nicht nachweisbar. Die Erhöhung der Liquorzellzahl ist hier also nicht durch das Mumpsvirus bedingt. Eine gewisse Erhöhung der Zellzahl kann auch experimentell durch die intracerebrale Applikation einer Salzlösung nach Hanks bedingt sein. Um die Übertragung der Mumpsviren von den Versuchstieren auf die Kontaktkontrollen zu bestätigen oder auszuschließen, müßten Versuche zur Isolierung

des Mumpsvirus aus dem Speichel, dem Blut, dem Liquor und dem Urin durchgeführt werden. Bei der Weiterführung der hier vorgestellten Versuche müßte dieser Gesichtspunkt berücksichtigt werden.

6 Zusammenfassung

Eine der häufigsten viralen Infektionskrankheiten im Kindesalter ist gegenwärtig die Parotitis epidemica. Das Auftreten einer abakteriellen Meningitis bei Kindern als Folge einer Mumpsvirusinfektion ist ein geläufiges Krankheitsbild. Mit einer zentralnervösen Beteiligung ist in über 80% aller Mumpsfälle zu rechnen.

1. In Liquorproben von Kindern, die sich unter dem Verdacht einer abakteriellen Meningitis in stationärer Behandlung befanden, konnte das Mumpsantigen in 64% der durch die Serologie bestätigten Fälle als ätiologisches Agens immunfluoreszenzoptisch in den lymphomonocyitären Zellen nachgewiesen werden.

2. In 36% der durch die Serologie bestätigten Mumpsfälle war das Mumpsantigen mittels Immunfluoreszenz in den Liquorzellen nicht nachweisbar.

3. Die Immunfluoreszenztechnik ist ein geeignetes Verfahren zum spezifischen Nachweis des Mumpsvirusantigens in Liquorzellen und stellt damit eine Erweiterung der diagnostischen Möglichkeiten bei serösen Meningitiden des Kindes unklarer Ätiologie dar.

4. In Versuchsanordnungen zur Impfstoffsicherheitsprüfung von Mumpsviren reagieren intracerebral infizierte Affen mit einer statistisch gesicherten Erhöhung der Liquorzellzahl. Bei Affen, die mit der neuropathogenen Variante C infiziert waren, sind die Liquorzellzahlen auch 28 Tage p. i. signifikant höher als bei den Leningrad-3 infizierten Tieren zu diesem Zeitpunkt. Die Zellzahldynamik im Liquor der Affen zeigt eine große Übereinstimmung mit den entsprechenden Befunden der natürlichen Mumpsmeningitiden der Kinder.

5. Der immunfluoreszenzoptische Nachweis des Mumpsantigens in den Liquorzellen beweist die Spezifität der experimentellen Mumpsmeningitis bei Affen. Der Nachweis des viralen Antigens ist nur innerhalb der ersten Versuchswoche in den Liquorzellen möglich, nach 3 - 4wöchiger Versuchsdauer ist das Mumpsvirus im Liquor der Grünen Meerkatzen nicht mehr nachweisbar.

6. Das Mumpsvirus kann mit Hilfe der Immunfluoreszenz an Gefrierschnitten des Affengehirns in den Ependymzellen 6 und 9 Tage p. i. nachgewiesen werden.

7. Die Liquorbefunde bei experimentell intracerebral infizierten Affen sind mit den Befunden bei natürlichen Mumpsmeningitiden der Kinder vergleichbar.

8. Die Einbeziehung der Liquordiagnostik in die tierexperimentellen Sicherheitsprüfungen, wie sie vor der Anwendung von Lebendimpfstoffen beim Menschen Voraussetzung sind, ist für die Beurteilung der neuropathogenen Restpotenzen der Impfstoffe eine wesentliche Ergänzung.

9. Minischweine und Katzen reagieren auf intracerebral appliziertes Mumpsvirus mit charakteristischen liquorcytologischen Veränderungen, die mit den Befunden beim Affen korrelieren.

10. Minischweine und Katzen reagieren auf intracerebral inokuliertes Mumpsvirus bereits in der ersten Woche mit einer deutlichen Liquorpleozytose. Die Höhe der Zellzahlen im Liquor ist bei Mumpswildvirusisolaten ($\alpha=0,05$) bedeutend größer als bei den Impfviren. Bei Wildviren ist nach der zweiten Versuchswoche ein statistisch gesicherter Abfall der Liquorzellzahlen zu beobachten. Die Impfviren zeigten eine ähnliche Tendenz, die aber auf dem hohen Signifikanzniveau nicht gesichert werden konnte. Die Zellzahlerhöhung ist bei den genannten Viren nach 8 Wochen noch nicht auf die Normalwerte zurückgegangen.

11. Das Differentialzellbild des Liquors ist bei allen Tiermodellen durch lympho-monozytäre Zellen gekennzeichnet, wobei monozytäre Zellformen zu jedem Zeitpunkt der Infektion überwiegen.

12. Der immunfluoreszenzoptische Nachweis des Mumpsvirusantigens in den lympho-monozytären Zellelementen des Liquors der Minischweine und Katzen ist zeitlich begrenzt. Es ergaben sich Unterschiede zwischen Mumpsviren vom Wild- und Impftyp. Der Nachweis des viralen Antigens in den Liquorzellen war 4 Wochen p. i. nicht mehr möglich.

13. Der Verlauf der Pleozytose und des fluoreszenzoptischen Antigennachweises in den Liquorzellen sind geeignete Parameter für die Charakterisierung der neurotropen Eigenschaften des viralen Mumpsantigens.

14. Mit den Tiermodellen Minischwein und Katze stehen neben den Affen zwei einheimische Versuchstierarten für vergleichende Arbeiten zur Frage des Verlaufs der Mumpsmeningitis und der neurotropen Eigenschaften des Mumpsvirus zur Verfügung.

7 Literaturverzeichnis

1. Ammann, J.:
Das klinische Bild der zentralnervösen Mumpsviruserkrankung mit besonderer Berücksichtigung der Krankheitsfälle sine parotitide.
Helvetica paediatrica acta 19 (1964) 458-486
2. Andries, K. and M. B. Pensaert:
Virus isolation and immunofluorescence in different organs of pigs infected with Haemagglutinating Encephalomyelitis virus.
American journal of veterinary research 41 (1980) 215-218
3. Andries, K. and M. B. Pensaert:
Immunofluorescence studies on the pathogenesis of Haemagglutinating Encephalomyelitis virus infection in pigs after oronasal inoculation.
American journal of veterinary research 41 (1981) 1372-1378
4. Azimi, P. H., H. G. Cramblett and R. E. Haynes:
Mumps meningoencephalitis in children.
JAMA 207 (1969) 509-512
5. Azimi, P. H., S. Shaban, M. D. Hilty et al.:
Mumps meningoencephalitis prolonged abnormality of cerebrospinal fluid.
JAMA 234 (1975) 1161-1162
6. Bachmann, K. D., H. Ewerbeck, G. Joppich u. Mitarb.:
Pädiatrie in Praxis und Klinik.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York und Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1980, Bd. 2, 1231-1242
7. Bang, H. O. and J. Bang:
Involvement of the central nervous system in mumps.
Acta medica scandinavica 113 (1943) 487-494
8. Berger, R. and M. Just:
Comparison of five different tests for mumps antibodies.
Infection 8 (1980) 180-183
9. Bjorvatn, B. and S. Wolontis:
Mumps meningoencephalitis in Stockholm November 1964 - July 1971. I. Analysis of a hospitalized study group.
Questions of selection and representativity.
Scandinavian journal of infectious diseases 5 (1973) 253-260
10. Boulgert, L. R.:
The neurovirulence test for live poliomyelitis vaccine.
Journal of biological standardization 1 (1973) 119- 138
11. Boyd, J. F. and V. Vince-Ribaric:
The examination of CSF - cells by fluorescent antibody staining to detect mumps antigen.
Scandinavian journal of infectious diseases 5 (1973) 7-15

12. Bray, P. F.:
Mumps - A cause of hydrocephalus?
Pediatrics 49 (1972) 446-449
13. Brown, G. C., J. V. Baublis and Th. P. O'Leary:
Development and duration of mumps fluorescent antibodies in various immunoglobulin fractions of human serum.
Journal of immunology 107 (1970) 86-94
14. Brown, N. J. and S. J. Richmond:
Fatal mumps myocarditis in an 8-month-old child.
British medical journal 281 (1980) 356-357
15. Burkhardt, F., U. Schill and R. J. Andres:
A solid phase radioimmunoassay (MACRIA) for detection of mumps specific IgM antibodies.
Experientia 38 (1982) 1367
16. Buynak, E. B. and M. R. Hilleman:
Live attenuated mumps virus vaccine. I. Vaccine development.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 123 (1966) 768-775
17. Chu, T. -H., F. S. Cheever, A. H. Coons et al.:
Distribution of mumps virus in the experimentally infected monkey.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 76 (1951) 571-574
18. Chüden, H. G., W. Michtl und K. Stehr:
Hörstörungen bei endemischer Mumpserkrankung.
Laryngologie, Rhinologie, Otologie 57 (1978) 745-750
19. Code of federal regulations
21 Food and Drugs, parts 600 to 1299
Special edition of the Federal Register, Washington, 1977
20. Coons, A. H. and M. H. Kaplan:
Localization of antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody.
Journal of experimental medicine 91 (1950) 1-18
21. Coons, A. H., J. C. Snyder, F. S. Cheever et al.:
Localization of antigen in tissue cells. IV. Antigens of rickettsiae and mumps virus.
Journal of experimental medicine 91 (1950) 31 -38
22. Cucker, M. B.:
Meningity i encefality u detej
Moskva, Medecina, 1975, 128-129
23. Dietel, K., G. Starke, F. Hajduk u. Mitarb.:
2. Mitteilung:
Zur klinischen Problematik des Mumps.
Aus "Studien zur Mumpsimmunprophylaxe" von G. Starke, F. Hajduk, K. Dietel Das Deutsche Gesundheitswesen 27 (1972) 1402-1404

24. Dodds, W. J.:
The pig model for biomedical research.
Federation proceedings 41 (1982) 247-256
25. Ehrengut, W. und H. Wiechern:
Mumps und seine Folgen:
Schutzimpfung?
Die gelben Hefte 12 (1972) 83-93
26. Enders, J. F. and S. Cohen:
Detection of antibody by complementfixation in sera of man and monkey convalescent from mumps.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med 50 (1942) 180
27. Engel, S., V. Goldstein and I. Sarov:
Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to mumps virus.
Israel journal of medical sciences 16 (1980) 461-464
28. Ennis, F. A., H. E. Hopps, R. D. Douglas et al.:
Hydrocephalus in hamsters:
Induction by natural and attenuated mumps virus.
Journal of infectious diseases 119 (1969) 75-79
29. Fanconi, G. und W. Isler:
Die organischen Erkrankungen des Nervensystems. In:
Lehrbuch der Pädiatrie. Schwabe Verlag, Basel, 1967, 897 ff.
30. Fischer, K. und G. Starke:
Liquoruntersuchungen bei der Poliomyelitis der Schweine.
Experimentelle Veterinärmedizin 5 (1951) 38-46
31. Fraňková, V., J. Kolátorová and A. Nevařilová:
Application of the method of immunofluorescence for rapid diagnosis of mumps virus.
Journal of hygiene, epidemiology, microbiology and immunology 14 (1970) 19-25
32. Frejtkov, V. I., L. I. Zarnickaja, T. N. Prigoda et al.:
Citoliz v spinnomozgovoj židkosti i metody predochranenija ot nego.
Laboratornoe delo (1968) 4, 208
33. Frejtkov, V. I.:
O patogeneze seroznogo meningita i meningoencefalita, vyzvannyh virusom epidemičeskogo parotita u detej.
Žurnal nevropatologii i psichiatrii 72 (1972) 10, 14 66- 1470
34. Friedman, M. G.:
Salivary IgA antibodies to mumps virus during and after mumps.
Journal of infectious diseases 143 (1981) 617
35. Fryden, A., H. Link and E. Möller:
Demonstration of cerebrospinal fluid lymphocytes sensitized against virus antigens in mumps meningitis.
Acta neurologica scandinavica 57 (1978) 396-404

36. Fryden, A., H. Link and E. Norrby:
Cerebrospinal fluid and serum immunoglobulins and antibody titers in mumps meningitis and aseptic meningitis of other etiology.
Infection and immunity 21 (1978) 852-861
37. Gerth, H.J.:
Mumps. In:
Grumbach, A. u. W. Kikuth
Die Infektionskrankheiten des Menschen und ihre Erreger.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1969, 1421-1432
38. Gogolin, J.:
Untersuchungen zur Neuropathogenitätsbestimmung von Mumps-Impfstoffen an Zwergschweinen.
Zeitschrift für die gesamte Hygiene u. ihre Grenzgebiete 27 (1981) 239-241
39. Grundler, E.:
Parotitis epidemica (Mumps). In:
Opitz, H. u. F. Schmidt,
Handbuch der Kinderheilkunde. Bd. V
Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1963, 111-118
40. v. Haebler, A.:
Beitrag zur Epidemiologie und Klinik der Mumpsmeningoenzephalitis. Kinderärztliche Praxis 36 (1968) 337-346
41. Hajduk, F., G. Starke, K. Dietel u. Mitarb.:
1. Mitteilung:
Zur epidemiologischen Problematik des Mumps. Aus "Studien zur Mumpsimmunprophylaxe " von G. Starke, F. Hajduk u. K. Dietel.
Das Deutsche Gesundheitswesen 27. (1972) 1115-1119
42. Hallmann, L.:
Klinische Chemie und Mikrobiologie.
VEB Georg Thieme Verlag, Leipzig, 1958
43. Harasek, G.:
Mumpsmeningitis und Mumpsimpfung.
Wiener klinische Wochenschrift 90 (1978) 7-10
44. Hayashi, K., E. M. Ross and A. L. Nothins:
Persistence of mumps viral antigens in mouse brain.
Japan journal of experimental medicine 46 (1976) 197-200
45. Hayden, G. F., St. G. Preblud, W. A. Orenstein et al.:
Current status of mumps and mumps vaccine in the United States.
Pediatrics 62 (1978) 965-969
46. Heidel, G.:
Mupserkrankungen im Bezirk Karl -Marx-Stadt.
Das Deutsche Gesundheitswesen 26 (1971) 1085-1089

47. Heidel, G.:
Zur Häufigkeit der Mumpsmeningoenzephalitis bei Mumpsserkrankungen.
Das Deutsche Gesundheitswesen 26 (1971) 1180-1182
48. Helmke, K., A. Otten and W. Willems:
Islet cell antibodies in children with mumps infection.
Lancet II (1980) 8187, 211-212
49. Henle, G., S. Harris and W. Henle:
The reactivity of various human sera with mumps complement fixation antigens.
Journal of experimental medicine 88 (1948) 133-147
50. Herndon, R. M., R. T. Johnson, L. E. Davis et al.:
Ependymitis in mumps virus meningitis.
Archives of neurology 30 (1974) 475-479
51. Hoffmann, H., G. Schmidt:
Zur Frage der Restschäden nach Mumpsmeningoenzephalitis.
Das Deutsche Gesundheitswesen 21 (1966) 2034-2039
52. Hower, J., H. E. Clar und M. Düchting:
Aqueductverschluss nach Mumps-Meningitis.
Deutsche medizinische Wochenschrift 97 (1972) 43-44
53. Isomura, S., T. Ozaki and T. Morishima:
Studies on live attenuated mumps vaccine. II. Followup study on the efficacy of biken vaccine.
Biken journal 19 (1976) 115-118
54. Johnson, C. D., E. W. Goodpasteur:
The etiology of mumps.
American journal of hygiene 21(1935) 46-58
55. Johnson, K. P., R. T. Johnson:
Granular ependymitis. Occurrence in Myxovirus infected rodents and prevalence in man.
American journal of pathology 67 (1972) 511-521
56. Johnson, K. P.:
Viral infections of the hamster central nervous system.
Federation proceedings 37 (1978) 2074-2075
57. Johnson, R. T., K. P. Johnson:
Hydrocephalus following viral infection:
The pathology of aqueductal stenosis developing after experimental mumps virus infection.
Journal of neuropathology and experimental neurology 27 (1968) 591-606
58. Johnstone, J. A., CA. C. Ross and M. Dunn:
Meningitis and encephalitis associated with mumps infection:
A 10-year survey.
Archives of disease in childhood 47 (1972) 647-651

59. Just, L., H. Lehmann, H. J. Hoffmann u. Mitarb.:
Nachuntersuchungen über die Prognose der Mumpsmeningoenzephalitis an Hand einer
Epidemie im Jahre 1964.
Das Deutsche Gesundheitswesen 23 (1968) 1353-1356
60. Katzberg, B., H. Leupold:
Kardiale Beteiligung bei Mumpsinfektion.
Das Deutsche Gesundheitswesen 34 (1979) 360-383
61. Keller, D.:
Absenzen nach Mumpsmeningitis.
Kinderärztliche Praxis 42 (1974) 57-60
62. Kleinschmidt, H.:
Parotitis epidemica (Mumps). In:
v. Bergmann, G., W. Frey u. H. Schwegel, Handbuch Innere Medizin. Bd. I
Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1952, 330-342
63. Köhler, W., H. Mochmann:
Grundriß der medizinischen Mikrobiologie.
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1980, 505-506
64. Kollmorgen, I., Th. Wiechmann, M. Lafrenz u. Mitarb.:
Zur Frage der Mumpsmeningitis im Erwachsenenalter.
Das Deutsche Gesundheitswesen 34 (1979) 1280-1283
65. Krille, B.:
Die Bedeutung der Liquordiagnostik insbesondere der Liquorzytologie in der
Differentialdiagnostik der Mumpsmeningitis gegenüber anderen Virusmeningitiden.
Diplomarbeit, Humboldt -Universität, Bereich Charite, Berlin 1975
66. Krugmann, S.:
Measles und mumps immunization:
Benefit versus risk factors.
Development of biological standardization 43 (1979) 253-257
67. Kunze, E., A. Hässler und A. Daute:
Klinik, Therapie und Prognose der Mumpsinfektionen des Zentralnervensystems (MME).
Kinderärztliche Praxis 42 (1974) 91-106
68. Kurstak, E., Ch. Kurstak:
Comparative diagnosis of viral diseases. Bd. I
Academic Press, New York, San Francisco, London, 1977, 505-595
69. Lang, W.:
Mumpsprophylaxe.
Münchener medizinische Wochenschrift 118 (1976) 39, 9
70. Langenstein, J., E. Iffland, E. Blaschke u. Mitarb.:
Aqueductverschluss als Komplikation der Mumpsmeningoenzephalitis.
Klinische Pädiatrie 188 (1976) 445-448

71. Lehardt, A., M. Hilgenfeld u. D. Günther:
Vergleichende Untersuchungen an konventionellen Labortieren. S. 1 44, In:
Tezisy dokladov sovместnogo simpoziume učenyh SSSR i GDR poprobleme
"Profilaktika kori i parotita", Moskau 1981, Herausgeber Prof. V. F. Popov, Tarasevič-
Institut
72. Lennette, D. A., R. W. Emmons and E. H. Lennette:
Rapid diagnosis of mumps virus infections by immunofluorescence methods.
Journal of clinical microbiology 2 (1975) 81 -84
73. Leššo, J., M. Voškebova:
Diagnosis of mumps and parotitic meningitis by the fluorescent antibody technique.
Acta virologica 9 (1965) 282-283
74. Levenbuk, I. S., M. A. Nikolajeva and A. E. Chigirinski:
On the morphological evaluation of the neurovirulence safety of attenuated mumps virus
strains in monkeys.
Journal of biological standardization 7 (1979) 9- 19
75. Levens, J. H. and J. F. Enders:
The haemagglutination properties of amniotic fluid from embryonated eggs infected with
mumps virus.
Science 102 (1945) 117-120
76. Lippert, H.:
SI-Einheiten in der Medizin.
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1980, 31
77. Lobsin, W. S., S. W. Sitschko:
Rombovidnye éncefality i meningity pri épidemičnom parotite.
Žurnal nevropatologii i psichiatrii 75 (1975) 2, 178-183
78. Luthardt, T., A. Neufang:
Erfolgskontrollen der Mumpsimpfung bei 104 suszeptiblen Impflingen.
Monatsschrift für Kinderheilkunde 126 (1978) 246-247
79. Luther, P., H. Klamm und S. Weber:
Simple detection of mumps virus neuraminidase and anti-neuraminidase with the lectin
neuraminidasetest.
Acta virologica 27 (1983) 89-91
80. Maltseva, N., Z. Manovich, T. Seletskaya et al.:
Rapid diagnosis of viral neuroinfections by immunofluorescent and immunoperoxidase
technics.
Journal of neurology 220 (1979) 125-130
81. Margolis, G., L. Kilham and J. R. Baringer:
A new look at mumps encephalitis inclusion bodies and cytopathic effects.
Journal of neuropathology and experimental neurology 33 (1974) 13-28

82. Matthews, R. E. F.:
Classification and nomenclature of viruses.
Intervirology 17 (1982) 1-3, 104-105
83. McCharthy, M., B. Jubelt and D. B. Fay:
Comparativ studies of five strains of mumps virus in vitro and in neonatal hamsters:
Evaluation of growth, cytopathogenicity and neurovirulence.
Journal of medical virology 5 (1980) 1-15
84. Morgan, H. R., J. F. Enders and P. F. Wagley:
A haemolysin associated with the mumps virus.
Journal of experimental medicine 88 (1948) 503-514
85. Morishima, T., H. Miyazu, T. Ozaki et al.:
Local immunity in mumps meningitis.
American journal of diseases of children 134 (1980) 1060-1064
86. Müller, H., F. Hajduk, S. Dittmann und Mitareiter.:
Beitrag zur Epidemiologie des Mumps in der DDR.
Das Deutsche Gesundheitswesen 30 (1975) 1703-1709
87. Müller, W. K., J. Versteeg und L. van der Kuip:
Die Kombination von Liquorzellkulturen und Immunfluoreszenz als diagnostische
Methode.
Zeitschrift für Neurologie 202 (1972) 159-163
88. Nicolai-Scholten, M. E., R. Ziegelmaier, F. Behrens et al.:
The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for de termination of IgG and IgM
antibodies after infection with mumps virus.
Medical microbiology and immunology 168 (1980) 81-90
89. Ocklitz, H. W., H. Mochmann und B. Schneeweiß:
Infektologie Teil I.
VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1974, 171-175
90. Ocklit z, H. W., B. Schmitz:
Die Mumps-Meningitis - eine Murnpskomplikation?
Kinderärztliche Praxis 44 (1976) 145-156
91. Ocklitz, H. W.:
Mumps - nur eine Ohrspeicheldrüsen-Erkrankung?
Heilberufe 32 (1980) 343-344
92. Ocklitz, H. W.:
Immunisierung gegen Mumps?
Das Deutsche Gesundheitswesen 35 (1980) 361-364
93. Odiseev, H., Y. Rumenova:
Reaktogenity and immunogeneity of the Sofia 6 vaccine strain in low passages of cell-
culture obtained from guinea-pig kidneys.
Problems of infectious and parasitic diseases (Sofia) 5 (1978) 45-51

94. Olischer, R. M., J. Sayk:
Liquor -, insbesondere Zellbefunde bei Meningitiden.
Fortschritte der Neurologie, Psychiatrie und ihrer Grenzgebiete 35 (1967)453-478
95. Otten, A., K. Helmke, R. Brakhaus et al.:
Islet - cell antibodies in children with mumps infection.
European journal of pediatrics 133 (1980) 179
96. Palitzsch, D.:
Meningitiden. In: Systematik der praktischen Pädiatrie.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1971, 130-163
97. Peć, S., E. DeMaertelaere and R. Denolin-Reubens:
CSF cytology of acute viral meningitis and meningoencephalitis.
European neurology 20 (1981) 95-102
98. Pollex, G. und B. Nöbel:
Der Nachweis von Mumpsantikörpern im Single-Radial-Haemolysis-Test. S.148,
In: Tezisy dokladov sovместnogo simpoziume učenyh SSSR i GDR po probleme
"Profilaktika kori i parotita", Moskau 1981,
Herausgeber Prof. V. F. Popov, Tarasevič-Institut
99. Prince, G., A. B. Jenson, L. C. Billups et al.:
Infection of human pancreatic beta cell cultures with mumps virus.
Nature 271 (1978) 5641, 158-161
100. Radl, H.:
Die Bedeutung der Mumpsmeningitis.
Deutsche medizinische Wochenschrift 94(1969) 1599-1603
101. Reunanen, M., R. Salonen and A. Salmi:
Intrathecal immune responses in mumps meningitis patients.
Scandinavian journal of immunology 15 (1982) 419-426
102. Rohmann, E.:
Zum klinischen Bild der Mumpsmeningoencephalitis mit besonderer Berücksichtigung der
Therapie.
Kinderärztliche Praxis 37 (1969) 9 ff
103. Rozina, E. E.:
Eksperimentalnye virusnye infekcii.
Medicina, Moskva, 1972
104. Rozina, E. E., T. I. Kapcova, G. Andzaparidze et al.:
Sravnitelno morfoloĝično izsledvane na nevrovirolentnosta na vaksinalnite parotitni
štammov Leningrad-3 i Sofija-6.
Epidemiologija mikrobiologija i infekciozni (Sofija) 15 (1978) 3, 174-179
105. Sasaki, K., M. Hijashikara, K. Inoue et al.:
Studies on the development of a live attenuated mumps virus vaccine. I. Attenuation of
the Hoshino "Wild" strain of mumps virus.
Kitasato Archives of experimental medicine 49 (1976) 43-52

106. Sayk, J.:
Ergebnisse neuer liquor-cytologischer Untersuchungen mit dem Sedimentierkammer-Verfahren.
Ärztliche Wochenschrift 9 (1954) 1042-1046
107. Scheid, W.:
Virusmeningitiden und -enzephalitiden.
Deutsche medizinische Wochenschrift 85 (1960) 837-840
108. Schmidt, G., H. Hoffmann:
Klinische und EEG-Verlaufsuntersuchungen während und nach Mumpsmeningoenzephalitis.
Monatsschrift für Kinderheilkunde 114 (1966) 424-429
109. Schmidt, R. M.:
Der Liquor cerebrospinalis.
VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin 1968, 129 ff, 604 ff
110. Schmidt, R. M.:
Atlas der Liquorzytologie.
Johann Ambrosius Barth, Leipzig 1978
111. Schmitz, B.:
Die Bedeutung der Meningitis als Manifestation oder Komplikation bei Mumps im Kindesalter.
Dissertation (Dr. med.) Akademie für Ärztliche Fortbildung, Berlin 1982
112. Scholz, H.:
Klinisch-diagnostischer Wert liquorzytologischer Befunde bei Entzündungen der Meningen.
Wiener Zeitschrift für Nervenheilkunde und deren Grenzgebiete 28 (1970) 283-305
113. Sommerville, R. G.:
Rapid identification of neurotropic viruses by an immunofluorescent technique applied to cerebrospinal fluid cellular deposits.
Archiv für die gesamte Virusforschung 19 (1966) 63-69
114. Starke, G., P. Hlinak:
Grundriß der allgemeinen Virologie.
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1972
115. Starke, G., F. Hajduk und K. Dietel:
Studien zur Mumpsimmunprophylaxe. 7. Beitrag zum Verlauf und zur Therapie der Meningitis nach Mumpsinfektion - Klinische, elektroenzephalographische und psychologische Untersuchungen im Verlaufe einer Epidemie sowie Stellungnahme zur Mumpsimpfung.
Das Deutsche Gesundheitswesen 29 (1974) 1239-1244
116. Statz, A., D. Wenzel und K. Felgenhauer:
Blut - Liquor - Schranke und lokale Immunantwort im Verlauf von Meningitiden im Kindesalter.
Neuropädiatrie 10 (1979) 281-289

117. Statz, A., K. Felgenhauer:
Late elevation of CSF proteins in three cases of mumps meningoencephalitis.
Brain and development 4 (1982) 71-72
118. Storm, R.:
Wahrscheinlichkeitsrechnung, mathematische Statistik und statistische Qualitätskontrolle.
VEB Fachbuchverlag, Leipzig, 1975, 253-258
119. Timmons, G. D., K. P. Johnson:
Aqueductal stenosis and hydrocephalus after mumps encephalitis.
The New England journal of medicine 283 (1970) 1505-1507
120. Unanov, S. S., R. A. Bčkov, A. K. Alekseeva et al.:
Rezultaty i zučeniya živoj parotitnoj vakciny iz štamma L-3 proizvodstva moskovskogo naučno-issledovatel kogo instituta virusnych preparatov.
Reaktogennye i antigennye svojstva vakciny.
Voprosy virusologii 22 (1977) 1, 54-58
121. Unanov, S. S., R. A. Bčkov, A. K. Alekseeva et al.:
Rezultaty i zučeniya živoj parotitnoj vakciny iz štamma L-3 proizvodstva moskovskogo naučno-issledovatel kogo instituta virusnych preparatov.
Epidemiologičeskaja effektivnost vakciny.
Voprosy virusologii 22 (1977) 1, 59-61
122. Vahlquist, B.:
Die akuten Infektionskrankheiten. In:
Fanconi, G., A. Wallgren; Lehrbuch der Pädiatrie.
Schwabe - Verlag, Basel, 1967, 51 ff
123. Vandvik, B., E. Norrby, J. Steen-Johnsen et al.:
Mumps meningitis: Prolonged pleocytosis and occurrence of mumps virus specific oligoclonal IgG in the cerebrospinal fluid.
European neurology 17 (1978) 13-22
124. Vandvik, B., R. E. Nilsen, F. Vartdal et al.:
Mumps meningitis: Specific and non-specific antibody responses in the central nervous system.
Acta neurologica scandinavica 65 (1982) 468-487
125. Vesikari, T., F. E. André, E. Simoen et al.:
Evaluation in young children of the Urabe Am 9 strain of live attenuated mumps vaccine in comparison with the Jeryl Lynn strain.
Acta paediatrica scandinavica 72 (1983) 37-40
126. Vivell, O.:
Parotitis epidemica (Mumps). In: Keller, W. u. A. Wiskott,
Lehrbuch der Kinderheilkunde.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1969, 487 ff
127. Vivell, O.:
Mumps: Begleiterkrankungen und Impfschutz
Die gelben Hefte 19 (1979) 65-69

128. Warweg, U. und H.-J. Körting:
Bestimmung der Antikörper gegen Mumps mit dem SRH-Test im Vergleich zur KBR.
Das Deutsche Gesundheitswesen 34 (1979) 1700-1702
129. Weibel, R. E., E. B. Buynak, A. A. McLean et al.:
Long - term follow-up for immunity after monovalent or combined live measles, mumps,
and rubella virus vaccines.
Pediatrics 56 (1975) 380-387
130. Weibel, R. E., E. B. Buynak, A. A. McLean et al.:
Persistence of antibody after administration of monovalent and combined live attenuated
measles, mumps, and rubella virus vaccines.
Pediatrics 61 (1978) 5-11
131. Wiechmann, Th., I. Kollmorgen, M. Lafrenz u. Mitarb.:
Mumpsorchitis - Ergebnisse einer Nachuntersuchung.
Das Deutsche Gesundheitswesen 34 (1979) 1205-1208
132. Wilfert, C. M.:
Mumps meningoencephalitis with low cerebrospinal fluid glucose, prolonged pleocytosis
and elevation of protein.
The New England journal of medicine 280 (1969) 855-859
133. Wolinsky, J. S., J. R. Baringer, G. Margolis et al.:
Ultrastructure of mumps virus replication in newborn hamster central nervous system.
Laboratory investigation 31 (1974) 403-412
134. Wolinsky, J. S., T. Klassen and J. R. Baringer:
Persistence of neuroadapted mumps virus in brains of newborn hamster after
intraperitoneal inoculation.
Journal of infectious diseases 133 (1976) 260-267
135. Wolinsky, J. S.:
Mumps virus - induced hydrocephalus in hamsters. Ultrastructure of the chronic infection.
Laboratory investigation 37 (1977) 229-236
136. Wolinsky, J. B., W. G. Stroop:
Virulence and persistence of three prototype strains of mumps virus in newborn hamsters.
Archives of virology 57 (1978) 355-359
137. World Health Organization
Requirements for poliomyelitis vaccine (oral).
Technical report series. No. 237, Geneva, 1962
138. World Health Organization
Expert committee on biological standardization (18. report)
Technical report series No. 329, Geneva, 1966
139. Yuzepchuk, S. A., E. E. Rozinu, A. T. Kaptsova et al.:
Morphological differences in the central nervous system and organs of monkeys
inoculated intracerebrally with virulent and attenuated strains of mumps virus.
Acta virologica 19 (1975) 305-310

140. Halevy, B., I. Sarov:

Enzyme -linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of specific IgA antibodies to mumps virus.

Journal of clinical pathology 35 (1982) 1129-1133

8 Abbildungen

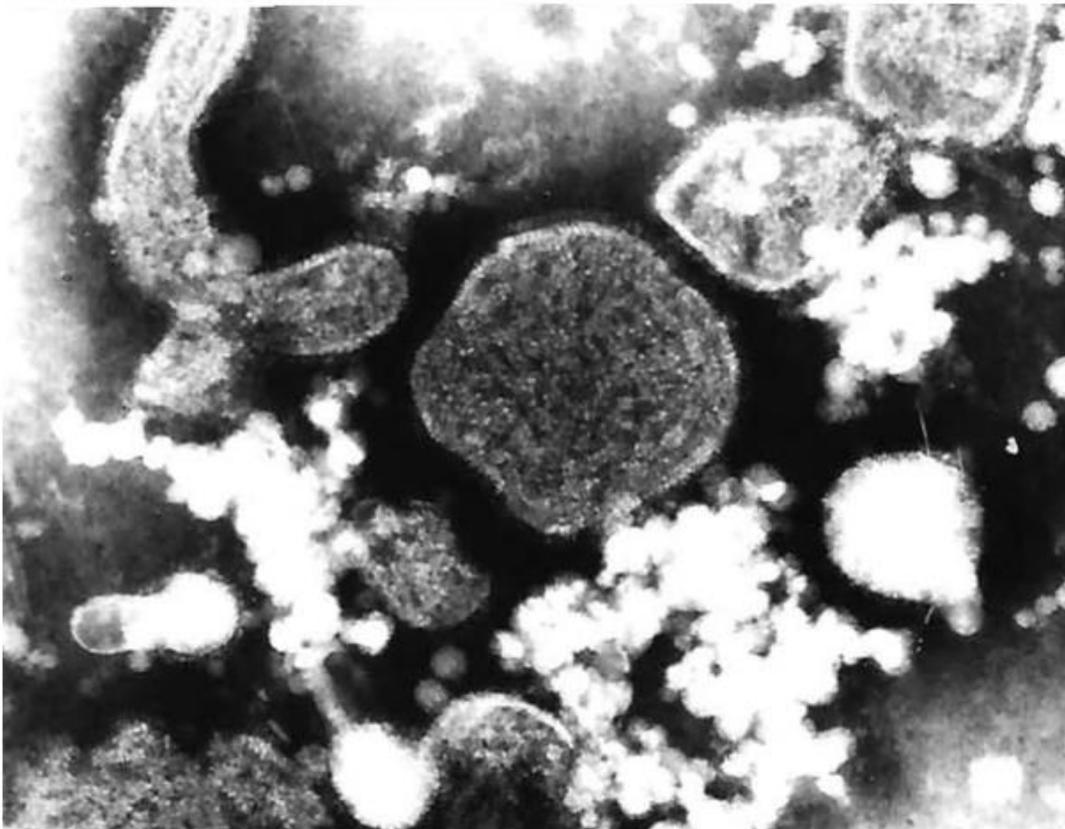
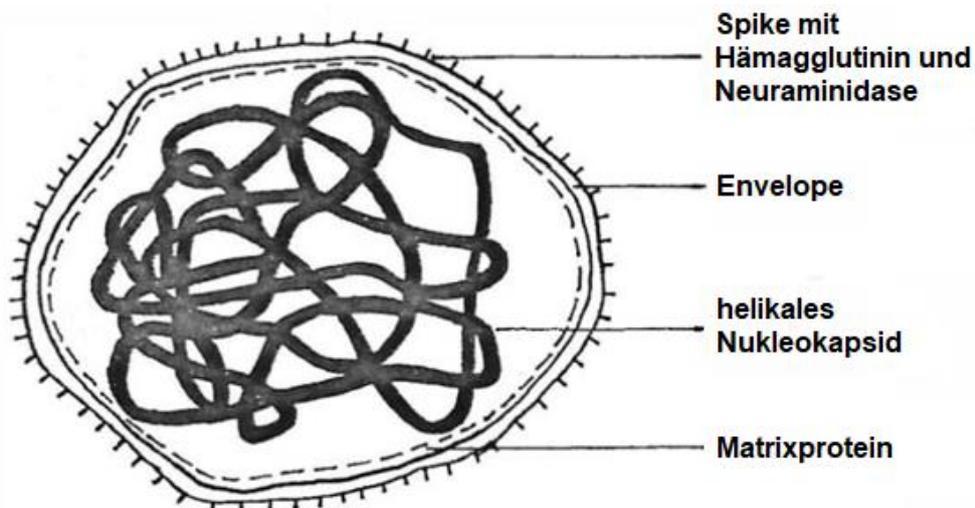


Abb. 1 Schematische Darstellung des Mumpsvirus und Elektronenmikroskopische Aufnahme, negativkontrastiert mit Phosphorwolframsäure Vergrößerung: 120 000 x. Die elektronen-mikroskopische Aufnahme stellte freundlicherweise Herr Dr. P. Schulze und Frau Ch. Liebe, Institut für Angewandte Virologie, Berlin, zur Verfügung.

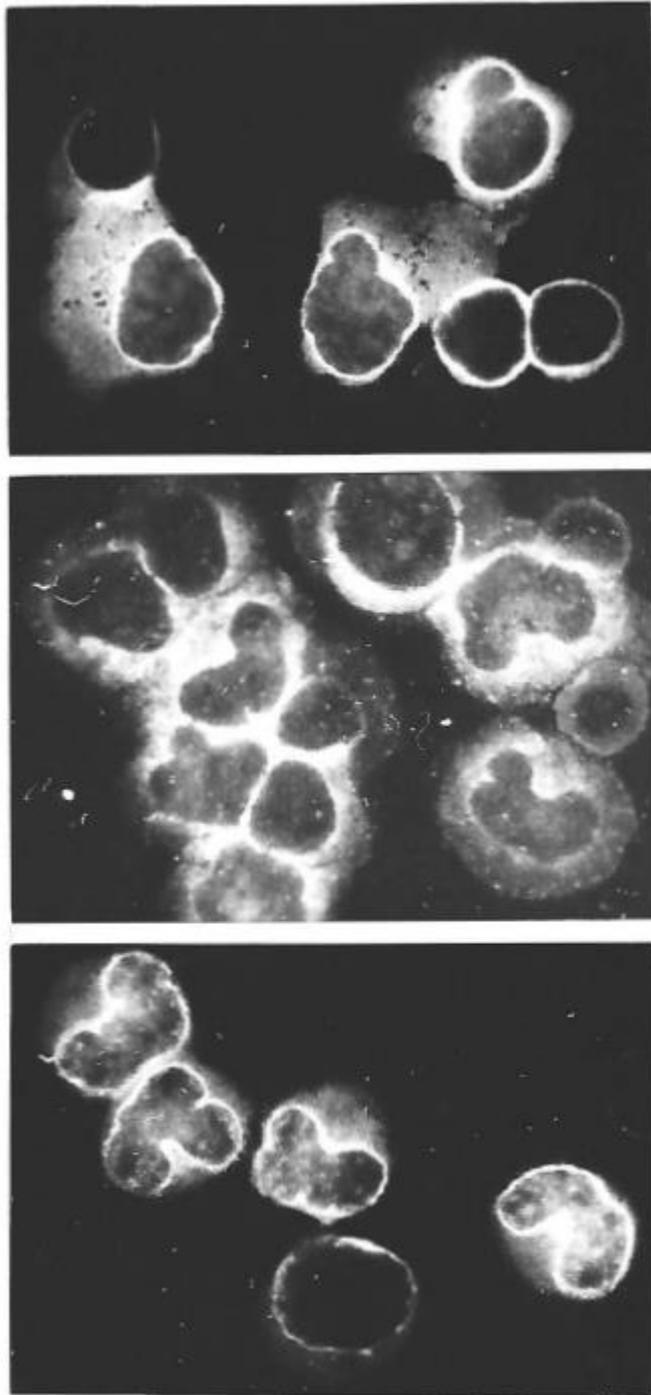


Abb. 2 Immunfluoreszenzoptischer Nachweis des Mumpsantigens in humanen Lymphozyten und Monozyten des Liquor cerebrospinalis Vergrößerung: 1350 x

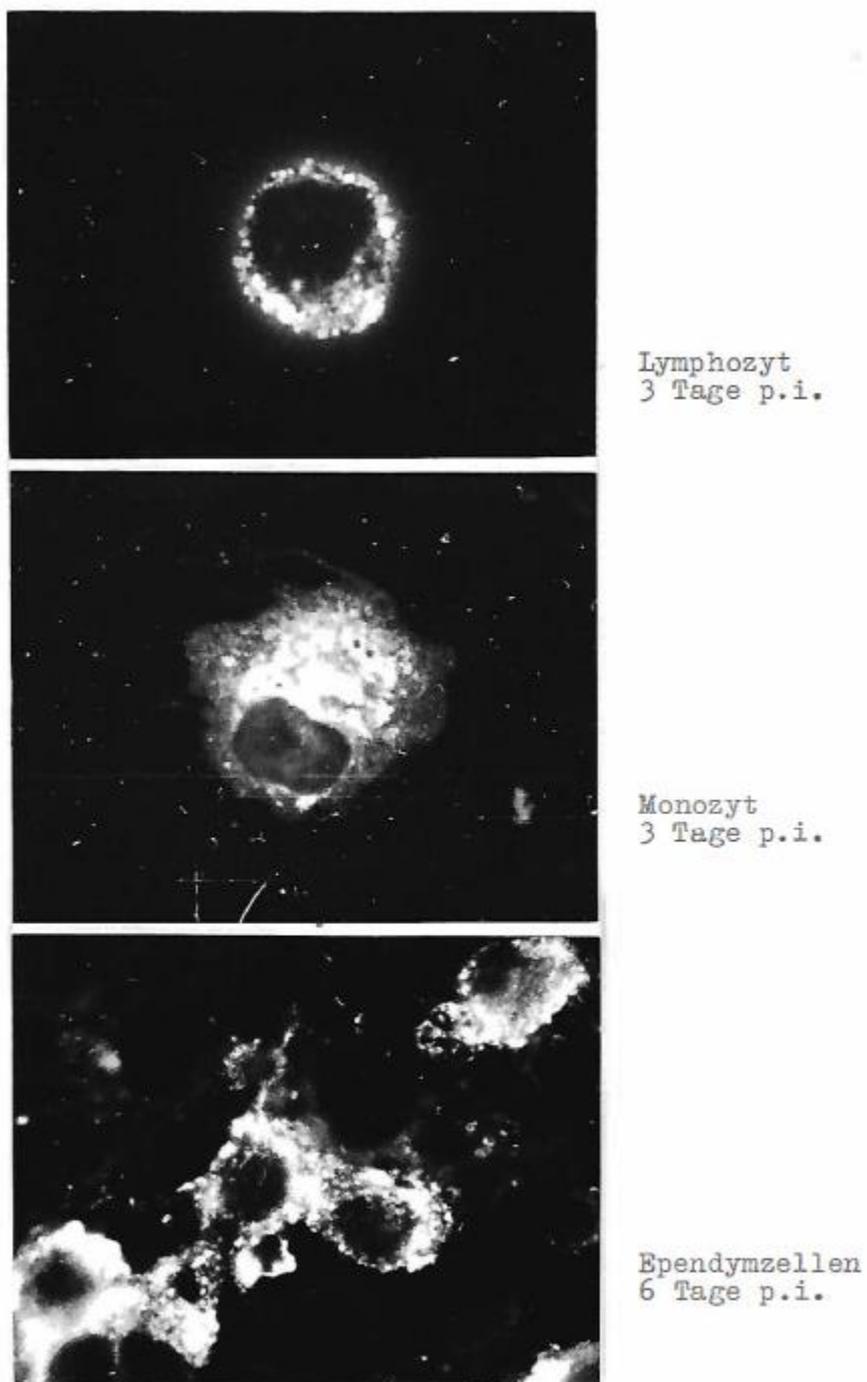


Abb. 3 Immunfluoreszenzoptischer Nachweis des Mumpsantigens in Liquorzellen experimentell infizierter Affen Vergrößerung: 1350 x



Abb. 4 Zellzahldynamik im Liquor mumpsinfizierter Minischweine

Zellzahldynamik im Liquor von Katzen

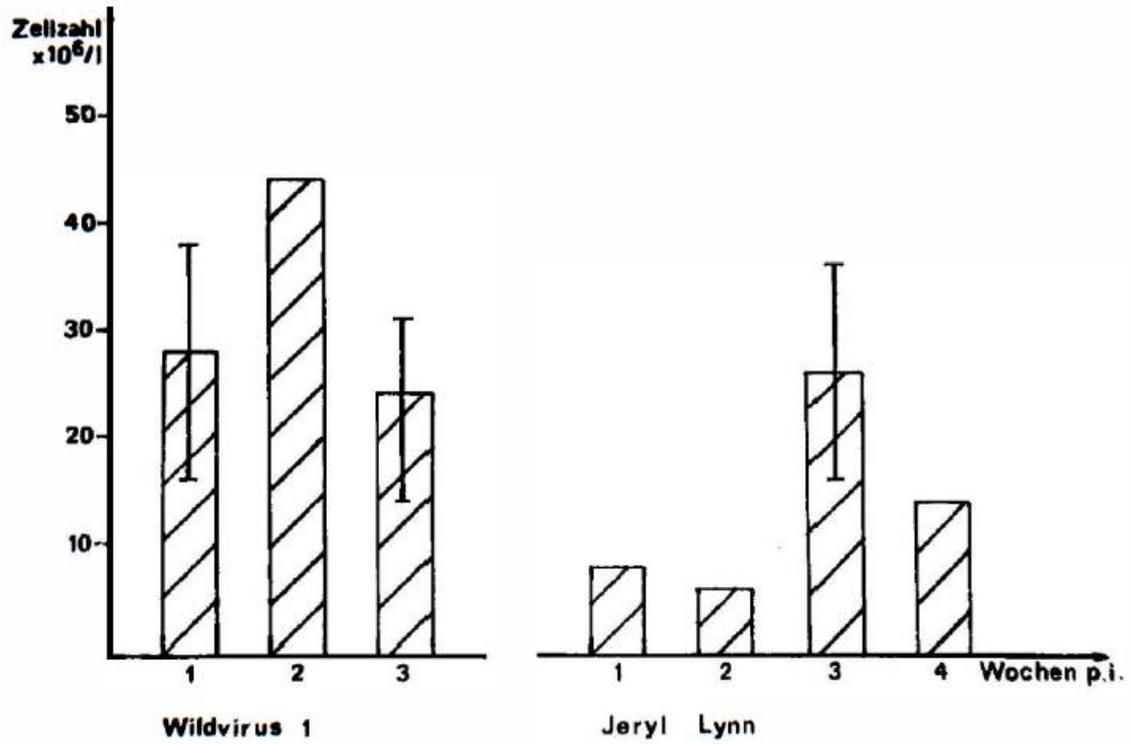
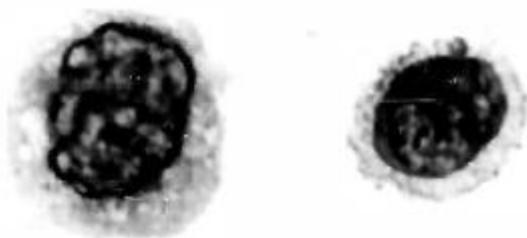


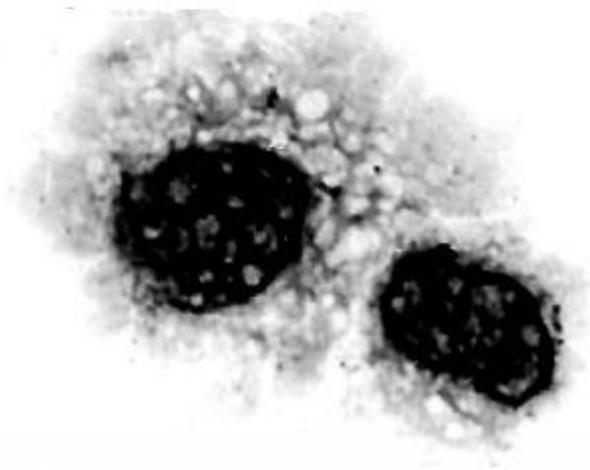
Abb. 5 Zellzahldynamik im Liquor mumpsinfizierter Katzen



Monozyten und
Lymphozyten
Vergrößerung: 350 x



Lymphozyten
Vergrößerung 1600 x



Monozyten
Vergrößerung: 1600 x

Abb. 6 Monozyten und Lymphozyten des Liquor cerebrospinalis mumpsinfizierter
Minischweine, May-Grünwald-Giemsa-Färbung

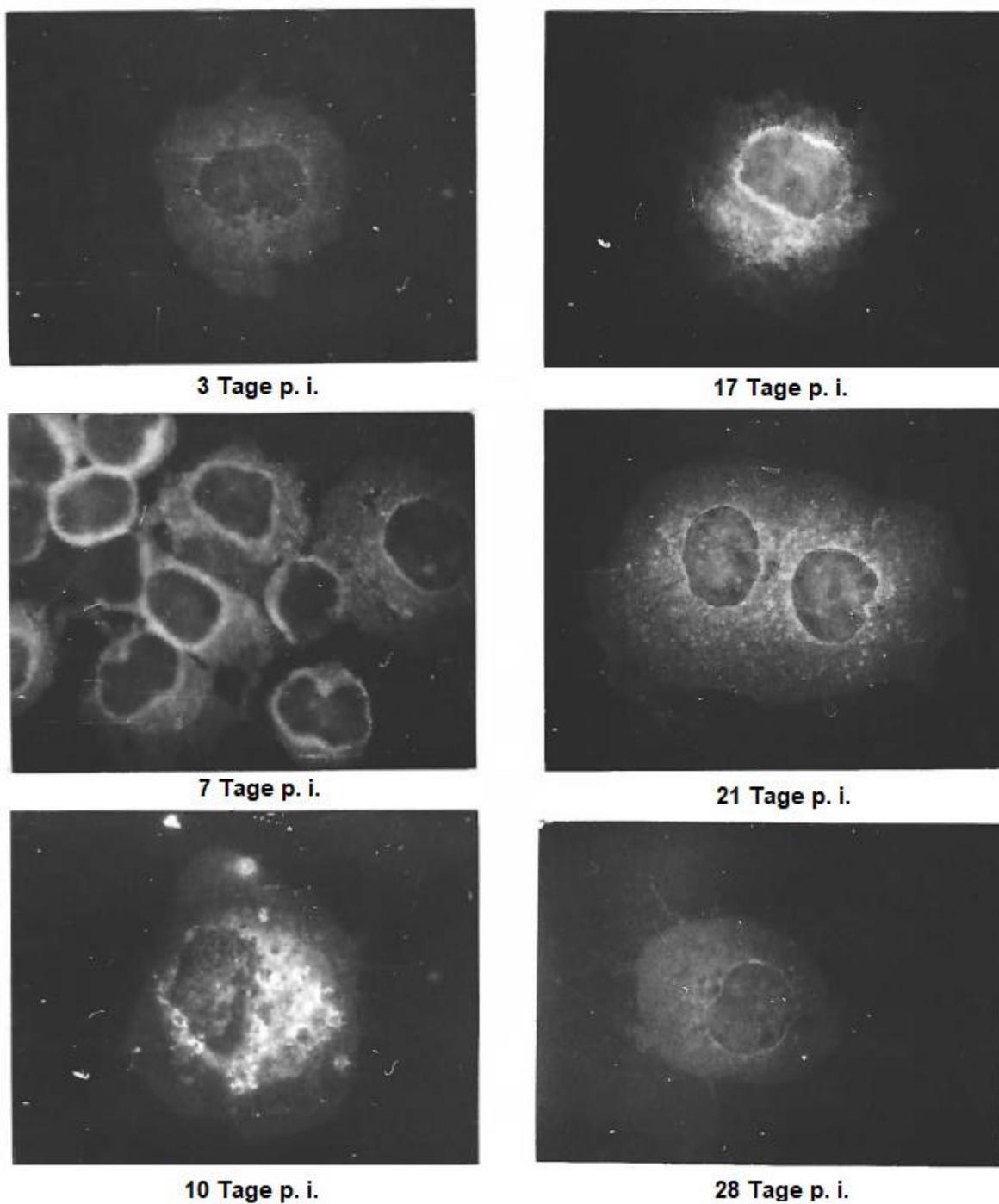


Abb. 7 Immunfluoreszenzoptischer Nachweis der Mumpswildviren 1 und 2 in Liquorzellen experimentell infizierter Minischweine Vergrößerung: 1350 x

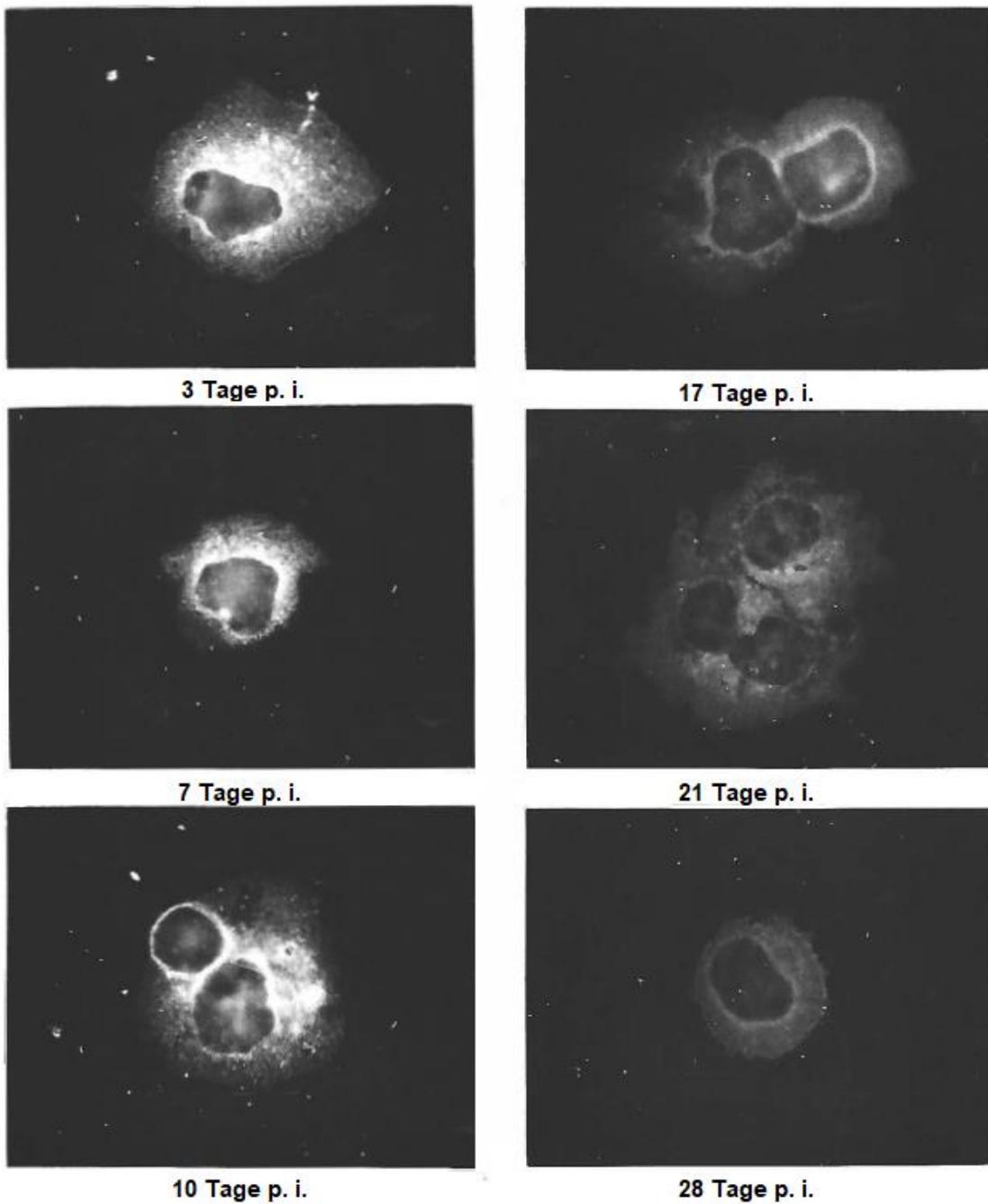


Abb. 8 Immunfluoreszenzoptischer Nachweis des Mumpswildvirus 3 in Liquorzellen experimentell infizierter Minischweine Vergrößerung: 1350 x

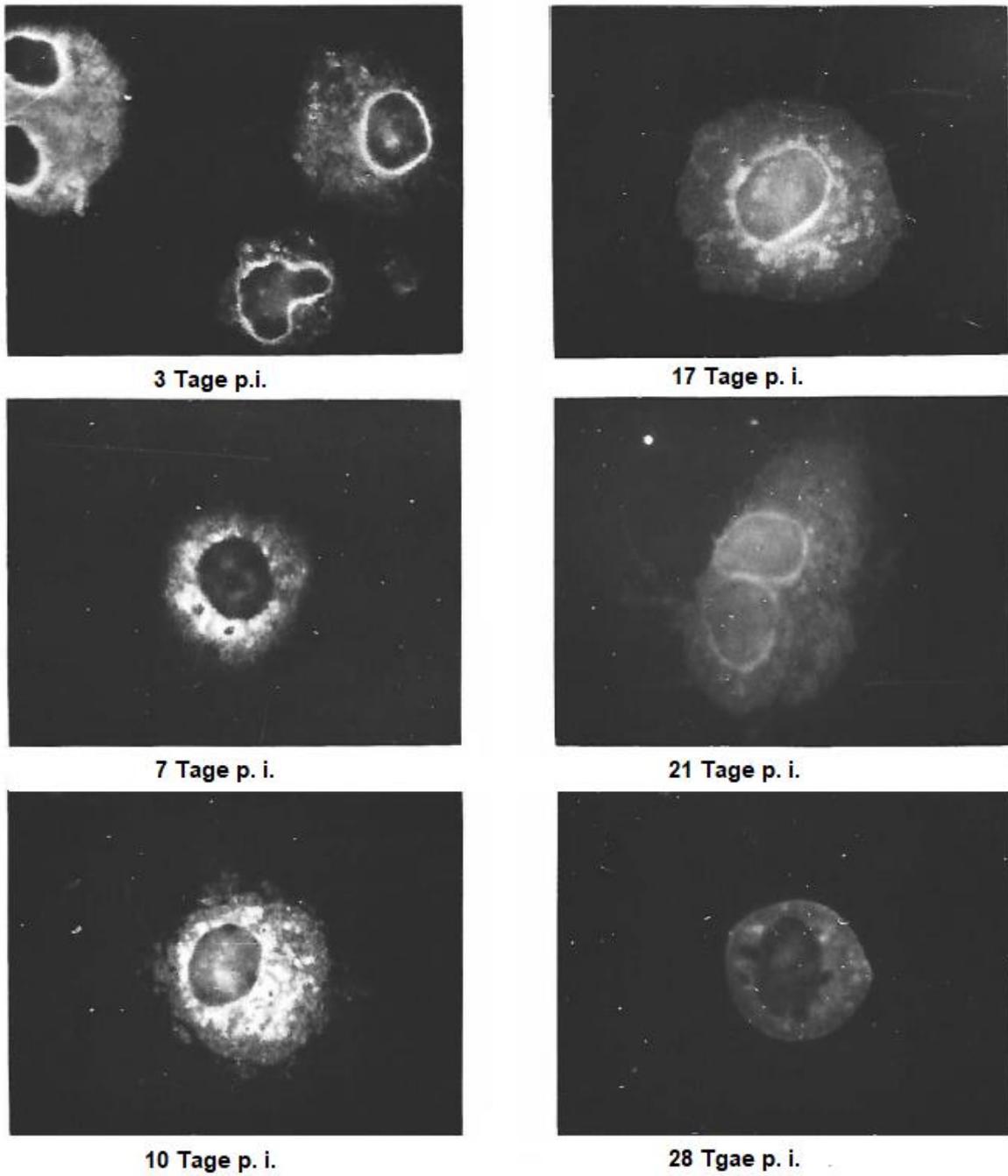


Abb. 9 Immunfluoreszenzoptischer Nachweis der Mumpsimpfviren in Liquorzellen experimentell infizierter Minischweine Vergrößerung: 1350 x

9 Thesen zur Dissertation

1. Bei den im Kindesalter auftretenden Erkrankungen spielen Infektionskrankheiten eine besondere Rolle. Sie sind oft die Ursache für entzündliche Prozesse im ZNS. Für diese pathologischen Prozesse im ZNS sind vor allem Viren verantwortlich. Unter den zahlreichen Virusinfektionen bei denen mit einer Beteiligung des ZNS zu rechnen ist, spielt das Mumpsvirus als Erreger meningealer Reizungen eine besondere Rolle.
2. Mumps ist gegenwärtig eine der häufigsten Infektionskrankheiten im Kindesalter. Mit einer zentralnervösen Beteiligung ist nahezu regelhaft zu rechnen. Entzündliche Prozesse im Bereich der Hirnhäute äußern sich in Veränderungen vor allem der zellulären Zusammensetzung des Liquor cerebrospinalis. Liquoruntersuchungen kommt also eine große differentialdiagnostische Bedeutung zu. Virusbedingte entzündliche Vorgänge in den Hirnhäuten widerspiegeln somit gleichzeitig eventuell vorliegende neurotrope Eigenschaften des Virus.
3. Durch die cytologische Beurteilung des Liquor cerebrospinalis lassen sich die bakteriell - bedingten eitrigen Meningitiden von den virusbedingten serösen Meningitiden gut unterscheiden. Die ätiologische Abgrenzung der verschiedenen Virusmeningitiden ist nicht problemlos möglich, da die Liquorveränderungen bei serösen Meningitiden für den speziellen Erreger nicht charakteristisch sind. Die spezifische Mumpsdiagnostik am Liquor bei natürlichen Mumpserkrankungen mit zentralnervöser Beteiligung wird durch das erregerspezifische Nachweisverfahren der Immunfluoreszenz erweitert.
4. In Liquorproben von Kindern, die sich unter dem Verdacht einer abakteriellen Meningitis in stationärer Behandlung befanden, konnte das Mumpsvirus fluoreszenzoptisch in den lympho-monozytären Zellen nachgewiesen werden. Der immunfluoreszenzoptische Nachweis des Mumpsantigens als ätiologisches Agens war in 64% der durch die Serologie bestätigten Mumpsfälle möglich. In 36% der durch die Serologie bestätigten Mumpsfälle war das Mumpsantigen mittels Immunfluoreszenz in den Liquorzellen nicht nachweisbar. In diesem Zusammenhang werden Zeitfaktoren und eine Antigenmaskierung diskutiert.
5. Die Immunfluoreszenztechnik ist ein geeignetes Verfahren zum spezifischen Nachweis des Mumpsvirusantigens in Liquorzellen und stellt damit eine Erweiterung der diagnostischen Möglichkeiten bei serösen Meningitiden unlarer Ätiologie des Kindes dar.
6. Die immunfluoreszenzoptische Nachweisbarkeit des Mumpsantigens in den Liquorzellen stellt gleichzeitig eine schnelle (4 Stunden) diagnostische Möglichkeit dar, die Ätiologie seröser Meningitiden abzuklären. Auf dieser Basis ist der Aufbau eines Screening-Verfahrens für verschiedene virale Erreger (Entero-, Herpesviren), die ebenfalls entzündliche Prozesse im ZNS verursachen können, möglich.
7. Die neurotrope Eigenschaft des Mumpsvirus ist neben den klinischen und sozial-ökonomischen Gründen mit ein Grund für das zunehmende Interesse an Maßnahmen zur spezifischen Mumpsimmuprophylaxe. Für die Immunprophylaxe des Mumps haben sich Lebendimpfstoffe als geeignet erwiesen, ihre Anwendung beim Menschen setzt entsprechende tierexperimentelle Sicherheitsprüfungen voraus. Diese Tests werden an Affen durchgeführt, bei denen das neurotrope Verhalten von Mumpsviren nach dem Auftreten enzephalitischer Prozesse im Gehirnparenchym beurteilt wird.
8. Die Liquordiagnostik wird als paraklinische Untersuchungsmethode in die tierexperimentellen Untersuchungen zum neurotrophen Verhalten von Mumpsviren einbezogen. Die

Liquordiagnostik und der immunfluoreszenzoptische Nachweis des Mumpsantigens in den Liquorzellen werden zunächst am Affen durchgeführt.

9. Die intracerebral mit dem Impfvirus "Leningrad-3" und der neuropathogenen Variante C infizierten Affen reagieren mit einer statistisch gesicherten Erhöhung der Liquorzellzahl, die nach 3 - 4wöchiger Versuchsdauer noch nicht auf die Normalwerte zurückgegangen ist. Bei Affen, die mit der neuropathogenen Variante C infiziert waren, sind die Liquorzellzahlen auch 28 Tage p. i. signifikant ($\alpha=0,1$) höher als bei den Leningrad-3 infizierten Tieren zu diesem Zeitpunkt.
10. Der fluoreszenzoptische Nachweis des Mumpsantigens ist innerhalb der ersten Versuchswoche in den Liquorzellen möglich. Nach 3 - 4wöchiger Versuchsdauer ist das Mumpsantigen im Liquor der Affen nicht mehr nachweisbar.
11. Das Mumpsvirus kann mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz an Gefrierschnitten des Affengehirns in den Ependymzellen 6 und 9 Tage p. i. nachgewiesen werden.
12. Die Liquorbefunde bei experimentell i. c. infizierten Affen sind mit den Befunden bei natürlichen Mumpsmeningitiden der Kinder vergleichbar und ergänzen die bisher übliche ausschließlich morphologische Untersuchungstechnik zum neurotrophen Verhalten von Mumpsviren.
13. Die Klärung des Verlaufs der Liquorpleozytose bei einer Mumpsinfektion mit Viren vom Wildtyp und mit Impfstämmen sowie die neuropathogenen Eigenschaften des Erregers erfordern umfangreiche vergleichende Untersuchungen. Da Affen für derartig umfassende Arbeiten aus vielfachen Gründen (Beschaffung, Kosten, Haltung) nicht in ausreichendem Maße zur Verfügung stehen, war es erforderlich, sich nach geeigneten einheimischen Tiermodellen für die Bearbeitung dieser Fragen umzusehen.
14. Die Tiermodelle Minischwein und Katze reagieren auf i. c. applizierte Mumpsimpfviren (Leningrad-3 und Jeryl Lynn) bzw. Mumpswildviren mit charakteristischen Veränderungen, die mit den Befunden beim Affen korrelieren.
15. Alle Minischweine und Katzen reagieren auf i. c. inokuliertes Mumpsvirus in der ersten Woche mit einer signifikanten Liquorpleozytose. Die Höhe der Zellzahlen im Liquor ist bei Mumpswildvirusisolaten ($\alpha=0,05$) bedeutend größer als bei den Impfviren. Bei Wildviren ist nach der zweiten Versuchswoche ein statistisch gesicherter Abfall der Liquorzellzahlen zu beobachten. Die Impfviren zeigten eine ähnliche Tendenz, die aber auf dem hohen Signifikanzniveau nicht gesichert werden konnte. Die Zellzahlerhöhung ist bei den genannten Viren nach 8 Wochen noch nicht auf die Normalwerte zurück gegangen.
16. Das Differentialzellbild des Liquors ist bei allen Tiermodellen durch lympho-monozytäre Zellelemente gekennzeichnet, wobei monozytäre Zellformen zu jedem Zeitpunkt der Infektion überwiegen.
17. In den lympho-monozytären Zellelementen des Liquors der Minischweine und Katzen konnten die Mumpsimpfviren bereits 3 Tage p. i. fluoreszenzoptisch nachgewiesen werden. Das Auftreten einer positiven Fluoreszenz bei Tieren, die mit Wildviren infiziert waren, konnte erst eine Woche später beobachtet werden. Der Nachweis des viralen Antigens in den Liquorzellen war 4 Wochen p. i. nicht mehr möglich.

18. Die Ursache für diese späte Nachweisbarkeit der Mumpswildviren könnte in der noch sehr geringen Adaptation der Viren gesehen werden. Wildvirus3 ist durch seine hohe Passagezahl schon gut adaptiert und verhält sich hinsichtlich der fluoreszenzoptischen Nachweisbarkeit (3 - 17 Tage p. i.) wie ein Impfvirus, hat aber seine neuropathogenen Eigenschaften noch nicht verloren, wie die hohen Zellzahlen zeigen.
19. Der Verlauf der Pleozytose und des fluoreszenzoptischen Antigenachweises in den Liquorzellen sind Parameter für die Charakterisierung des viralen Mumpsantigens. Mit den Tiermodellen Minischwein und Katze stehen neben dem Affen zwei einheimische Versuchstierarten für vergleichende Arbeiten zur Frage des Verlaufs der Mumpsmeningitis und der neurotropen Eigenschaften des Mumpsvirus zur Verfügung.
20. Der immunfluoreszenzoptische Nachweis des Mumpsantigens in den Liquorzellen infizierter Tiere ist ein weiterer Parameter zur Charakterisierung der neurotropen Eigenschaften des Mumpsvirus.

Danksagung

Herrn MR Prof. Dr. sc. med. Günther Starke möchte ich für die Förderung dieser Arbeit und seine kritische Beratung vielmals danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn VR Dr. med. vet. Martin Hilgenfeld für seine ständige Unterstützung, seine wertvollen Hinweise und Anregungen bei der Abfassung der Arbeit.

Herrn OA Dr. med. Rainer Noack danke ich für die Überlassung der humanen Liquorpräparate und Frau Dr. med. Gisela Pollex für die Bereitstellung der Virusmaterialien.

An dieser Stelle möchte ich auch Herrn Dipl.-Chem. Burkhard Schönmeier für die Präparation der Immunseren und Frau Doris Günther für ihre zuverlässige und gewissenhafte technische Unterstützung danken.