

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie der Freien Universität Berlin

Eine Modifikation der ABC-Methode (Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex) für den Nachweis von viralen Antigenen bei der Infektion der Katze durch ein Coronavirus (FIP) und der Infektion des Hundes durch das Parvovirus-Typ 2

J. WALTER, K. DOHSE und R. RUDOLPH

Adresse der Autoren: Institut für Veterinär-Pathologie der FU Berlin

Mit 5 Abbildungen

(Eingegangen am 29. November 1988)

Summary

A modification of the ABC-method (avidin-biotin-peroxidase complex) utilizing the proof of virale antigens of coronavirus infection of cats (FIP) and parvovirus type 2 infection of dogs

A modified ABC-method (avidin-biotin-peroxidase complex) is established to demonstrate viral antigens in paraffin sections of tissues of coronavirus (FIP) infected cats and parvovirus type 2 infected dogs using monoclonal antibodies. The pros and cons and potential sources of error are described and discussed.

Key words: Diagnostic immunohistochemistry, ABC-method, FIP, CPV-2

Einleitung

Die Virusdiagnostik am Paraffinschnitt eröffnet neue Möglichkeiten für die Ermittlung der Ätiologie und Erkennung von möglichen Erregerreservoirien. Voraussetzungen sind sensiblere Methode und zuverlässigere Lokalisierbarkeit im Vergleich zu der häufig verwendeten Immunfluoreszenz. Das Ziel unserer Untersuchung war es, einen immunhistochemischen Nachweis von Virusantigenen für die sogenannte Parvovirose der Hunde und für die Feline Infektiöse Polyserositis (FIP) der Katzen zu etablieren. Für dieses Vorhaben wurde die Avidin-Biotin-Technik gewählt. Die Gründe dafür waren, daß diese Technik zum einen an formalinfixierten Paraffinschnitten angewandt werden kann und damit häufig auch retrospektive Untersuchungen erlaubt, die Anfertigung von dünnen Schnitten und Dauerpräparaten möglich ist, die notwendigen Reagenzien kommerziell erhältlich sind und einen sensiblen sowie hochspezifischen Nachweis ermöglicht.

Literaturübersicht zur ABC-Methode

Hsu und Mitarbeiter (1981 a; 1981 b) etablierten die ABC-Methode für den Nachweis von Hypophysen- bzw. Polypeptid-Hormonen. Das Avidin-Biotin-System wurde von GUESDON und Mitarbeitern (1979) in die Immunhistochemie eingeführt. Grundlage ist die außergewöhnlich hohe Affinität zwischen Avidin — einem Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 68 kD, enthalten im Hühnereiweiß — und Biotin (Dissozia-

tionskonstante = 10^{-15} L/Mol). Biotin (Vitamin H; syn.: Coenzyme R), das besonders in Leber, Niere, Pankreas und Eigelb vorkommt, hat ein Mol.-Gew. von 244 D. Die Affinität von Avidin zu Biotin ist etwa um den Faktor 10^6 höher als die meisten Reaktionen zwischen Antikörpern und deren homologen Antigenen und führt zu einer nahezu irreversiblen Verbindung (GREEN, 1975). Ein Avidinmolekül kann vier Biotinmoleküle binden. Die Tatsache, daß die meisten Proteine mit Biotin konjugiert werden können, führt zu der Möglichkeit, makromolekulare Komplexe zwischen Avidin und biotinilierten Enzymen, wie der Meerrettich-Peroxidase, bilden zu können (GUESDON u. Mitarb., 1979; HEITZMANN u. RICHARDS, 1974; HSU u. Mitarb., 1981 a; 1981 b). Die Meerrettich-Peroxidase (HRP, horseradish peroxidase) katalysiert die Oxidation eines Elektronendonators in Anwesenheit ihres spezifischen Substrates H_2O_2 . Dabei entsteht zunächst ein Primärkomplex aus HRP und H_2O_2 . Die hämoprosthetische Gruppe der HRP wird oxidiert und das Peroxid zu Wasser reduziert. In einem zweiten, substratspezifischen Schritt erfolgt die Oxidation des Donators und schließlich die Dissoziation des Komplexes. Die Einführung von 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) als idealen Elektronen-Donator — DAB wird zu einem intensiv braunen, unlöslichen Polymer oxidiert (GRAHAM u. KARNOVSKY, 1966) — führte in Folge zur Etablierung HRP-gekoppelter Antikörper zum Nachweis von Antigenen (LEWIS u. Mitarb., 1983; STERNBERGER, 1979) (s. Abb. 1). Wie bei allen hochsensitiven immunhistochemischen Verfahren gilt es auch bei der ABC-Methode, unspezifische und falsch positive/negative Ergebnisse infolge endogener und/oder exogener Reaktionen zu vermeiden.

Endogene Peroxidasen können mit dem Peroxidase-Substrat reagieren und zu falsch positiven Ergebnissen führen. Viele Zellen verfügen über Peroxidase-Aktivitäten, wie z. B. Peroxisomen der Leberzellen, Mastzellen, weiße Blutzellen und durch das Hämoglobin auch die Erythrozyten (HEYDERMANN, 1979). Diese Peroxidasen können durch eine Behandlung mit 0,3%igem H_2O_2 in Methanol (STRAUS, 1971; STREEPKERK, 1972) eliminiert werden. Die exakte Einhaltung dieser Konzentration ist wichtig, da zu hohe Konzentrationen das Antigen zersetzen, zu niedrige die endogenen Peroxidasen nicht zerstören.

Um unspezifische Hintergrundreaktionen — meistens verursacht durch Bindung des Antiserums an Kollagen und Bindegewebe — zu vermeiden, muß vor der Inkubation des primären Antiserums der Schnitt mit einem Protein behandelt werden, das entsprechende Stellen im Schnitt zu blockieren vermag. Solch ein Protein kann verdünntes, nichtimmunes Serum von derselben Spezies wie der sekundäre Antikörper sein; dadurch wird eine Bindung des sekundären Antikörpers an das Blockserum vermieden; zusätzlich werden dadurch Fc-Rezeptoren auf Makrophagen blockiert. Das Blockserum wird im Überschuß zugegeben und nur abgekippt, damit eine dünne Lage das Gewebe überzieht, wenn der primäre Antikörper zugesetzt wird. Allerdings darf auch nicht zuviel Blockserum verbleiben, da sonst die Gefahr besteht, daß das primäre Antiserum verdünnt wird. Wichtig ist außerdem, daß im Blockserum keine Hämolyseprodukte vorhanden sind, die mit dem Peroxidase-Substrat zu reagieren vermögen (BOURNE, 1983; LEWIS u. Mitarb., 1983; MAYERSBACH, 1967; BURNS, 1975; RÄSÄNEN u. Mitarb., 1979; STERNBERGER, 1979).

Verunreinigtes und/oder falsch konzentriertes H_2O_2 , niedriger pH der Lösung, lange Lichteinwirkungen oder Überlagerung können die DAB- H_2O_2 -Lösung unwirksam werden lassen. Deshalb soll die Lösung erst kurz vor dem Gebrauch unter Lichtschutz hergestellt werden. Der End-pH der Lösung sollte bei 7,6 liegen. Dieser pH-Wert ist zwar nicht optimal für die H_2O_2 -Aktivität, aber er vermeidet eine spontane DAB-Oxidation (FRITZ u. Mitarb., 1985; GRAHAM u. KARNOVSKY, 1966; STERNBERGER, 1979). DAB wird als Kontaktkarzinogen betrachtet (HANKER u. Mitarb., 1977). WEISBURGER und Mitarbeiter (1978) relativieren dies. In einer Langzeit-Toxizitätsstudie weisen sie nach, daß bei männlichen Ratten nur bei extrem hohen Dosen gelegentlich hepatozelluläre Karzinome und nur bei männlichen Mäusen broncheoläre Adenome und Karzinome auftreten.

Weitere Quellen für unspezifische Reaktionen sind unvollständige Entparaffinierung, falsche Serumkonzentrationen — insbesondere zu niedrige Verdünnungsstufen, die zu sterischen Behinderungen der Antikörper-Antigen-Reaktionen führen können, unvoll-

ständige Waschungen und fehlerhafte Inkubationen. Aber auch das Hühnereiweiß-Avidin selbst kann zu unspezifischen Färbungen führen: Dadurch, daß sein isoelektrischer Punkt (IP) im alkalischen Bereich (IP bei ca. 10) liegt, vermag es Moleküle mit sauren Gruppen wie Nukleinsäuren oder Phospholipide zu binden, was zu unspezifischen Färbungen von Zellkernen und Zellmembranen führen kann (GREEN, 1975; HEGENESS, 1977; LUPPA, 1986). Falsch negative Färbeargebnisse können auftreten, wenn eine Beeinträchtigung oder Zerstörung antigener Determinanten vorliegt, was bei hohen Temperaturen über 60 °C und falscher Fixierung vorkommen kann (BOURNE, 1983; SEIFERT u. Mitarb., 1984).

Der Ablauf der ABC-Methode nach HSU und Mitarbeitern (1981 a; 1981 b) enthält folgende wesentliche Schritte (Abb. 1):

1. Die zu untersuchende Probe wird mit dem primären Antikörper, der gegen das gesuchte Antigen gerichtet ist, inkubiert.
2. Ein biotinilierter sekundärer Antikörper — gerichtet gegen den primären — wird hinzugefügt.
3. Es folgt die Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex. Das im Überschuß verabreichte Avidin wird mit biotinilierter Meerrettich-Peroxidase gemischt, wobei sich ein gitterähnlicher Komplex zwischen Avidin und Peroxidase ausbildet, und dem Schnitt zugesetzt. Die freie Biotinbindungskapazität des Avidins vermag mit den biotinilierten Antikörpern zu reagieren.
4. Das Antigen wird durch Zugabe eines Peroxidase-Substrats visualisiert und damit lokalisiert.

Eigene Untersuchungen

Material

Sammlung und Einbettung der Gewebeproben

29 Katzen und 30 Hunde aus dem laufenden Sektionsgut des Instituts für Veterinärpathologie der Freien Universität Berlin mit dem klinischen Verdacht auf FIP bzw. Parvovirose werden für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit im Zeitraum 1985–1986 obduziert. Bestätigt sich der

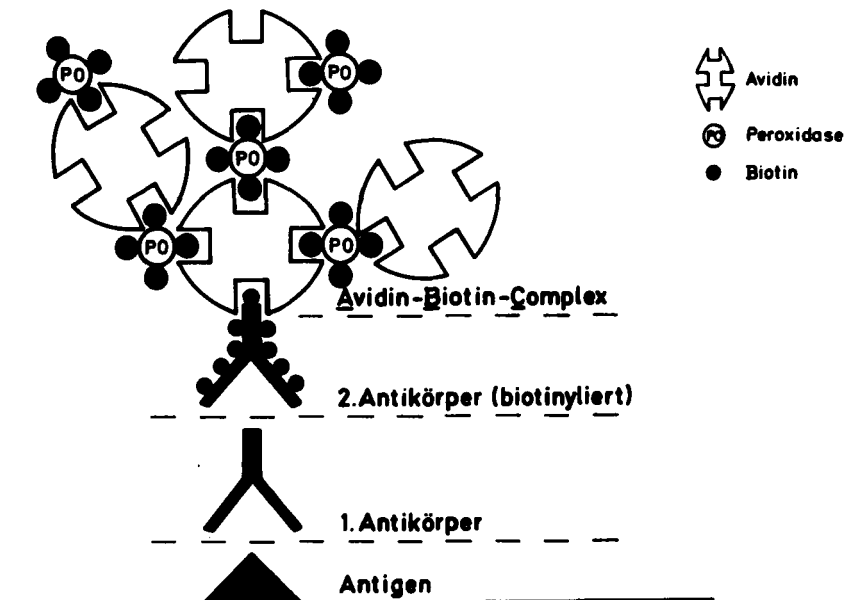


Abb. 1. Schematische Darstellung der Avidin-Biotin-Komplex-Methode (SEIFERT u. Mitarb., 1984)

Krankheitsverdacht bei der makroskopischen Beurteilung, werden bis zu 42 Gewebe aus jeder Katze und bis zu 44 Gewebe aus jedem Hund entnommen (WALTER, 1987; DOHSE, 1987). Danach erfolgt eine 36–48stündige Fixation der Katzengewebeproben im Somogyi-Takagi-Fixationsgemisch (SOMOGYI u. TAKAGI, 1982). Die Hundegewebeproben werden sowohl im Somogyi-Takagi-Fixationsgemisch als auch in neutralem gepufferten Formol nach Lillie und Bouin'scher Lösung (ROMEIS, 1968) 24–48 Stunden lang fixiert. Danach werden die Proben in 70%igem Alkohol (Fixation nach Bouin und Somogyi und Takagi) oder mit Leitungswasser (Fixation nach Lillie) mehrmals gewaschen, innerhalb 24 Stunden in aufsteigender Alkoholreihe (70 % bis 100 %) entwässert sowie nach Xylolbehandlung in Paraffin eingebettet.

Schnittherstellung

Aus den Paraffinblöcken werden ca. 5 µm dicke Schnitte hergestellt. Die Katzengewebeschnitte werden auf normalen Objektträgern aufgezogen und mit Hämatoxylin-Eosin (H. E.) gefärbt. Für die Immunhistochemie werden Schnitte auf Objektträger der Firma Menzel-Gläser (Art. 021102, „chemisch gereinigt“), die zur völligen Entfettung zwei Tage in Aceton gelagert wurden, mit Hilfe von dünn ausgestrichenem und luftgetrocknetem Poly-L-Lysin bzw. mit Hilfe von ausgestrichenem 0,5%igen ELMAR's GLUE (Dakopatts, Hamburg) aufgezogen. Die Hundegewebeschnitte werden auf Objektträger aufgezogen, die nach MAHROUS (1986) mit einer Salzsäure-Alkohol-Lösung sowie mit 100%igem Aceton vorbehandelt und mit einer Eiweißlösung beschichtet sind. Die Wahl eines geeigneten Adhäsives für die Immunhistochemie ist wichtig, da durch die erforderlichen häufigen Waschvorgänge normale Mittel wie Gelatine oder Eiweiß-Glycerin nicht ausreichen, um ein Abschwemmen der Schnitte zu verhindern. Die Firma Vector Laboratories weist darauf hin, daß das in der Eiweißlösung enthaltene Avidin die Färbequalität beeinflussen kann. Nach dem Aufziehen auf die Objektträger werden die Schnitte für 24–48 Stunden im Brutschrank bei 37 °C getrocknet.

Reagenzien für die Fixation

Somogyi-Takagi-Fixationsgemisch, pH 7,2–7,4

(SOMOGYI u. TAKAGI, 1982)

- a) 5,00 l SÖRENSEN-Phosphatpuffer, pH 7,4;
 - b) 1,50 l Pikrinsäure, gesättigt (entspricht 0,2 %);
 - c) 3,48 l Paraformaldehydlösung, die 400 g depolymerisiertes Paraformaldehyd enthält (entspricht 4 %);
 - d) 20 ml Glutaraldehyd, 25%ig (entspricht 0,05 %).
- SÖRENSEN-Phosphatpuffer: 0,8 l Stammlösung I + 4,2 l Stammlösung II;
 Stammlösung I: 9,078 g KH_2PO_4 in 1000 ml Aqua dest.;
 Stammlösung II: 48,879 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ in 4,2 l Aqua dest.;

1 n NaOH tropfenweise hinzufügen, bis sich das Paraformaldehyd löst. Danach filtrieren und abkühlen.

Bouin'sche Lösung

(ROMEIS, 1968)

- a) 15 ml gesättigte, wäßrige Pikrinsäure;
- b) 5 ml Formol 40%ig;
- c) 1 ml Eisessig.

Die Vereinigung der vorrätig gehaltenen Flüssigkeiten erfolgt unmittelbar vor Gebrauch. Fixiert wird bei Zimmertemperatur.

Neutrales, gepuffertes Formol nach Lillie, pH 7,0

(ROMEIS, 1968)

- a) 100 ml Formaldehyd, 40 %ig;
- b) 900 ml Aqua dest.;
- c) 4 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (Natriumdihydrogenphosphat);
- d) 6,5 g Na_2HPO_4 (Dinatriumhydrogenphosphat, wasserfrei).

Die Fixation erfolgt bei 4 °C im Kühlschrank.

Benutzte Materialien für die Immunhistochemie

- Aqua bidestillata;
- 0,3 % H_2O_2 in Metanol (frisch!);
- 1%ige Salzsäure-Alkohol-Lösung (MAHROUS, 1986);

- Eiweißlösung (MAHROUS, 1986);
- PBS (phosphate-buffered saline) 10 mM bei pH = 7,6;
- Tris-HCL (Hydroxymethyl-aminomethan) / PBS-Waschpuffergemisch 0,05 M;
- TBS (tris-buffered-saline), 0,05 M, pH 7,6 (MAHROUS, 1986);
- Monoklonale Antikörper (5-3 F₁₀A₇B₁H₁₀ und 5-1 F₄H₉HB₁₀H₂) gegen das Nukleokapsid-antigen des FIPV gewonnen aus Mäuse-Aszites (freundlicherweise von Prof. PEDERSEN, Davis, California/USA zur Verfügung gestellt) in Verdünnungsstufen von 1 : 10 bis 1 : 2000;
- Monoklonale Antikörper gegen das Parvovirusantigen (freundlicherweise von Herrn Direktor A. Aubert, Fa. Virbac, Frankreich zur Verfügung gestellt), optimale Verdünnungsstufe 1 : 600;
- Vectastain: Normal horse serum (1 : 70 in TBS verdünnt);
- Anti-Maus-Serum, gewonnen aus Pferden, biotiniliert (Vector Lab.; Camon; Cat. Nr.: BA 2000) 1 : 200 in PBS bzw. in 0,05 M TBS für den Parvovirusantigennachweis verdünnt;
- Vectastain (R) ABC Kit (Standard): Avidin DH und Meerrettich-Peroxidase (Vector Lab.; Camon; Cat. Nr.: PK 4000); das Kit enthält Tropfflaschen mit den jeweiligen Reagenzien und eine Flasche für die Mischungen; die Konstruktion des Tropfen-Dispensers ermöglicht exakte Tropfen von durchschnittlich 45–50 µl;
- Peroxidase-Substrat: DAB-H₂O₂-Gemisch;
- Substratlösung DAB-H₂O₂ (MAHROUS, 1986);
- Monolayer von fcfw (Felis catus whole foetus) Zellen (PEDERSEN u. Mitarb., 1981) (freundlicherweise von Prof. HORZINEK, Utrecht/Holland zur Verfügung gestellt);
- PS-Zelllinie, fetale Schweinezelllinie des Instituts für Virologie der FU Berlin;
- kulturadaptiertes FIPV (freundlicherweise von Prof. HORZINEK, Utrecht/Holland zur Verfügung gestellt).

Rezepturen für die Immunhistochemie

(Für die Ansätze werden analysenreine Chemikalien verwendet)

Poly-L-Lysin: 10 mg Poly-L-Lysin in 10 ml Aqua dest. lösen und bei Kühlschranktemperaturen aufbewahren.

ELMAR's GLUE: 0,5 %: 0,5 ml in 100 ml Aqua bidest. bei 60 °C auflösen.

1%ige Salzsäure-Alkohol-Lösung (MAHROUS, 1986):

- a) 990 ml 70%iges Äthanol;
- b) 10 ml konzentrierte 37%ige HCl.

Die Objektträger werden zur Entfettung 24 Stunden lang in diese Salzsäure-Alkohol-Lösung gelegt und anschließend mindestens 4 mal 3 Minuten mit Aceton behandelt und an der Luft getrocknet.

Eiweißlösung (MAHROUS, 1986):

- a) Eiweiß von einem frischen Ei;
- b) 1 ml Ammoniumhydroxyd;
- c) ad 1 l Aqua dest.

Die zusammengeführten Materialien werden 10 Minuten mit dem Magnetrührer gerührt und durch groben Mullstoff filtriert. Da die Lösung nicht haltbar ist, muß sie jeweils vor Gebrauch neu hergestellt werden. Die Objektträger müssen eine Minute in der Eiweißlösung bleiben, werden danach bei 160 Upm 10 Minuten lang geschleudert und im Brutschrank bei 60 °C 24 Stunden lang getrocknet. Die Beschichtung auf den Objektträgern ist dann unbegrenzt haltbar.

0,3 % H₂O₂-Methanol: 1 ml 30%iges H₂O₂ + 90 ml Methanol.

PBS (phosphate-buffered saline) 0,1 M, pH 7,4:

Lösung I: 3,56 g Na₂HPO₄ × 2H₂O + 17,40 g NaCl in 2000 ml Aqua bidest. lösen;

Lösung II: 1,38 g NaH₂PO₄ × H₂O in 1000 ml Aqua bidest. lösen; Lösung I mit Lösung II auf pH 7,4 einstellen: (ca. 5 Teile I und 1 Teil II). Die Lösungen I und II sind ca. 14 Tage im Kühlschrank haltbar.

Tris-HCl-Stammlösung: 0,1 M, pH 7,4:

12,11 g Tris (Tris[Hydroxymethyl]-aminomethan: Trizma-Base von Sigma, No. T.-1503; MG = 121,1) in 1000 ml Aqua bidest. lösen und mit Trizma-HCl (Tris[hydroxymethyl]aminomethan-Hydrochlorid von Sigma, No. T.-3253; MG = 157,6) den pH einstellen.

TBS (tris-buffered-saline) 0,05 M, pH 7,6 (MAHROUS, 1980):

- a) Tris-HCl-Lösung 0,5 M:

Tris [hydroxymethyl]-aminomethan-Hydrochlorid (TRIZMA-HCl, MG = 157,6; SIGMA);

b) Tris-Base-Lösung 0,5 M:

Tris-Base (TRIZMA-Base, MG — 121,1; SIGMA);

c) Stammlösung (Tris-Puffer-Lösung 0,5 M, pH 7,6):

1 Teil Tris-Base-Lösung 0,5 M;

9 Teile Tris-HCl-Lösung 0,5 M.

Tropfenweise wird mit einer der beiden Lösungen der pH auf 7,6 eingestellt.

d) Gebrauchslösung (Tris-Puffer-Lösung) 0,05 M, pH 7,6:

500 ml Stammlösung (0,5 M);

225 ml 18 %ige NaCl-Lösung;

ad 4275 ml Aqua dest.

Tropfenweise wird mit Tris-Base oder Tris-HCl-Lösung der pH auf 7,6 eingestellt. Die Lösungen werden bei Kühlschranktemperatur aufbewahrt.

NHS (Normal horse serum) 1 : 50 (Camon, Cat. Nr.: S 2000): 100 µl NHS werden mit 5 ml PBS verdünnt.

Für den Parvovirusantigennachweis: NHS (Normal horse serum) wird mit 10 ml TBS auf 1 : 70 verdünnt.

Anti-Sera in verschiedenen Verdünnungsstufen:

Zum Einsatz gelangen Katzen-Anti-FIPV-Sera und **monoklonale Antikörper** gegen das Nukleokapsid des FIPV, die mit PBS verdünnt werden.

Die **monoklonalen Antikörper** gegen das Parvovirusantigen werden mit 0,05 M TBS (pH 7,6) auf 1 : 600 verdünnt.

Anti-Maus-Serum, biotiniliert (Vector Lab., Camon, Ba 2000): Das Serum, das als 1,5 mg Lyophilisat geliefert wird, muß mit 1 ml Aqua bidest. aufgelöst, danach mit PBS bzw. mit 0,05 M TBS auf 1 : 200 verdünnt werden.

ABC-Reagenz (Vector Lab., Camon: Vectastain ABC Standard Kit Cat. Nr.: PK 4000): Die Gebrauchslösung besteht aus Avidin-DH und biotinilierter Meerrettich-Peroxidase und wird wie folgt hergestellt: 100 µl Avidin DH (Reagenz A) mit 10 ml PBS bzw. mit 0,05 M TBS mischen, dann 100 µl biotinilierte Meerrettich-Peroxidase (Reagenz B) hinzugeben und mischen. Diese Lösung muß kurz vor Gebrauch hergestellt werden.

Peroxidase-Substrat: Besteht aus gleichen Teilen 0,02 % H_2O_2 und 0,1 % (1 mg/ml) DAB: 0,1 ml H_2O_2 30 %ig in 150 ml Aqua dest. lösen.

3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB)-Lösung: 100 mg DAB in 100 ml Tris-HCl 0,1 M, unter Lichtschutz etwa 10 min im Magnetrührer lösen und anschließend filtrieren. End-pH 7,6. Jeweils 100 ml Peroxidase und 100 ml DAB kurz vor dem Gebrauch zusammengeben.

Substratlösung DAB- H_2O_2 (MAHROUS, 1986):

a) 9 Teile Tris-HCl-Lösung, 0,05 M;

1 Teil Tris-Base-Lösung 0,05 M.

Bei Zimmertemperatur wird die Pufferlösung zunächst auf den pH 7,3 eingestellt.

b) Zugabe von 50 mg 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB, SIGMA, chemical company) pro 100 ml dieser Pufferlösung. Im Eisbad wird die DAB-Lösung unter Lichtschutz 40 Minuten lang mit einem Magnetrührer gerührt, mit Tris-Base auf den pH 7,6 eingestellt, filtriert und abschließend 0,1%ige H_2O_2 -Lösung im Verhältnis 1 : 100 zugegeben.

Die biotinilierten Reagenzien sind bei 4 °C etwa zwei Jahre haltbar (Hsu u. Mitarb., 1981 b).

Kontrollen

Kontrolle des primären Antiserums

Positivkontrollen

In Vorversuchen werden die monoklonalen Antikörper mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz (iIF) getestet¹. Dabei sollte FIPV in der fcwf-Linie (zur Charakterisierung der Zellen und des FIPV-Wachstums siehe PEDERSEN u. Mitarb., 1981) und TGEV in porkiner Zelllinie (PS) nachweisbar sein. Folgender methodischer Ablauf wird verwendet:

1. Aceton-Fixation der mit FIPV bzw. TGEV infizierten Zellkulturen (fcwf und PS) auf Objektträger;

¹ Wir bedanken uns bei Frau Renate Lefert vom Inst. f. Virologie der Freien Universität Berlin für ihre Hilfestellungen bei Pflege der Zellkulturen und des FIPV-Stammes sowie für ihre Unterstützung bei der Ausführung und Auswertung der iIF-Untersuchungen.

2. Spülen in PBS;
3. Inkubation der monoklonalen Antikörper im Brutschrank: 30 min bei 37 °C;
4. Waschen: 2 × je 5 min in PBS;
5. Inkubation mit FITC-konjugiertem Protein A (1 : 30 in PBS verdünnt für 30 min bei 37 °C);
6. Waschen: 2 × je 5 min in PBS;
7. Gegenfärben mit Evans Blue (1 % in PBS für 2 min);
8. Spülen in Aqua dest.;
9. Auswertung im Fluoreszenzmikroskop: Positive Reaktion: helles gelbgrünes Aufleuchten im roten Umfeld.

Anschließend wird FIPV in der fcwf-Linie und TGEV in porkiner Zelllinie mit der ABC-Methode nachgewiesen (Abb. 2).

Parallel zur ABC-Methode werden die Hundegewebeproben mit der direkten Immunfluoreszenz untersucht. Als Positivkontrollen gelten die durch die direkte Immunfluoreszenz bestätigten parvopositiven Gewebeproben.

Negativkontrollen

Gewebe einer SPF-Katze werden mit der ABC-Methode untersucht.

Für die Durchführung der Negativkontrollen beim Parvovirusantigennachweis ist es nicht möglich, parvovirusfreie Welpen gleichen Alters als Kontrolltiere zu bekommen. In den Zuchtbetrieben besteht ein Parvovirusvorkommen, weshalb sowohl Muttertiere als auch Welpen geimpft sind. Aufgrund der Parvoviruspräsenz und Impfvirusausscheidung ist davon auszugehen, daß diese Welpen damit Virusträger sind. Zur Kontrolle der Reaktionsspezifität wird deshalb zu jedem positiven Schnitt eine Negativkontrolle durchgeführt. Dabei wird der primäre Antikörper weggelassen und durch das verbleibende Normalserum vom Pferd ersetzt.

Immunhistochemische Kontrollen

Inkubation der Schnitte für 20 min mit verdünntem Normalserum anstelle des primären Antiserums, gewonnen aus der gleichen Tierart wie das sekundäre Antiserum.

Ersatz des primären Antiserums durch 10 mM PBS-Puffer.

Ersatz der biotinilierten Anti-Maus-IgG durch unkonjugiertes Immunglobulin (NS).

Kontrolle sonstiger Fehlerquellen

Hämosiderin und Bilirubin sind Pigmente, die einer positiven ABC-Reaktion ähneln und dadurch ein falsch-positives Ergebnis hervorrufen können. Zur Kontrolle werden alle Schnitte von Hundegewebeproben, die dem retikulohistiozytären System angehören, mit der Berliner-Blau-Methode nach Lison (ROMEIS, 1968) für den Hämosiderinnachweis und teilweise mit der Gmelinschen Reaktion (BURCK, 1973) für den Bilirubinnachweis gefärbt.

Von den Katzensgewebeproben werden Knochenmark-, Leber-, Milz-, Lymphknoten- und Lungenschnitte mit der Berliner-Blau-Reaktion kontrolliert.

Beide Pigmente sind auch in den Negativkontrollen zu beobachten.

Daneben können Artefakte wie Gegenfärbungspigmente oder Kristalle der Fixationslösungen (BOURNE, 1983) von einer positiven Reaktion abgegrenzt werden, weil sie auch in den Negativkontrollen wiederzufinden sind und nicht zellgebunden im ganzen Schnitt verteilt liegen.

Spezifität der Anti-FIP-Seren

Sämtliche Seren mit Ausnahme einer Probe der monoklonalen Antikörper (5-1 F₄FB₁₀H₂) zeigen in der iIF positive Reaktionen sowohl auf FIPV-infizierter fcwf-Linie als auch auf TGEV-infizierter PS-Linie.

Arbeitsablauf ABC-Methode

In Vorversuchen werden die einzelnen Schritte der ABC-Methode mit verschiedenen Seren bei unterschiedlichen Inkubationszeiten und Temperaturen ausgetestet. Dabei ergibt sich folgendes:

Die Wahl eines geeigneten Adhäsivums für das Aufziehen der Schnitte auf Objektträger erweist sich als großes Problem. Bedingt durch die häufigen Waschungen besteht die Tendenz, daß viele Gewebe im Laufe der ABC-Prozedur abschwimmen. Bei den Katzensgewebeschnitten zeigt sich, daß mit Poly-L-Lysin aufgezogene Schnitte sich häufig vom Objektträger lösen. Als ein geeignetes Adhäsivum erweist sich dagegen bei den Katzensgewebeschnitten die Beschichtung mit Elmar's Glue und bei den Hundegewebeschnitten die Eiweißbeschichtung nach MAHROUS (1986).

Einen befriedigenden Nachweis von FIPV-Antigen ermöglicht die Antikörperprobe "5-3 F₁₀A₇B₁H₁₀" bei einer Verdünnung von 1 : 800.

Die gegen das Parvovirusantigen gerichteten monoklonalen Antikörper zeigen bei einer Verdünnung von 1 : 600 die besten Nachweisergebnisse.

Die niedrigste Background-Einfärbung kann bei 24stündiger Inkubation der monoklonalen Antikörper bei Kühlschranktemperatur (4 °C) erzielt werden. Eine nochmals deutliche Reduzierung unspezifischer Anfärbung wird durch Inkubation der Substratlösung im Eisbad (bei 4 °C) erreicht.

Die anderen Schritte der ABC-Methode können ohne nennenswerte Zunahme der unspezifischen Färbung bei Raumtemperatur durchgeführt werden.

Ergebnisse

Als Ergebnis der Vorversuche werden folgende Arbeitsabläufe etabliert:

A. FIP-Nachweis

1. Entparaffinieren in Xylol und absteigende Alkoholreihe (Xylol über 100%igen bis 50%igen Alkohol und Aqua dest. jeweils für 5 min).
2. Wässern in Aqua bidest. für 5 min.
3. Waschen in PBS-Puffer für 2 mal 20 min.
4. Inkubieren mit 1 : 50 verdünntem NHS (Vector Lab.; Camon, Wiesbaden) für 20 min in der feuchten Kammer.
5. Abkippen des NHS.
6. Inkubation mit monoklonalen Antikörpern, verdünnt auf 1 : 800, in der feuchten Kammer bei 4 °C für 24 h bzw. bei Raumtemperatur für 30 min.
7. Waschen in PBS-Puffer für 10 min.
8. Inkubation mit 1 : 200 verdünntem biotinilierten Antiserum (Vector Lab.; Camon, Wiesbaden) für 45 min.
9. Waschen in PBS-Puffer für 10 min.
10. Inkubation der Schnitte für 30 min in 0,3 % H₂O₂-Methanol zur Eliminierung endogener Peroxidasen.
11. Inkubation mit Avidin DH-biotinierter Meerrettichperoxidase verdünnt in PBS (Vectastain ABC-Reagenz, Vector Lab.; Camon, Wiesbaden) für 45 min.
12. Waschen PBS für 10 min.
13. Inkubation in Peroxidase-Substrat für 5—45 min im Eisbad bei etwa 4 °C. Nach 5 min wird der Schnitt mikroskopisch auf die braunen Substratprodukte kontrolliert; danach jede Minute. Die Inkubation wird beim Sichtbarwerden der DAB-Oxide abgebrochen. Sind nach 45 min noch keine Reaktionen sichtbar, ist der Nachweis mißlungen.
14. Waschen in Wasser für 5 min.
15. Gegenfärben mit konzentriertem Hämatoxylin nach MEYER für 30 sec.
16. Wässern in Leitungswasser für 10 min.
17. Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe, Waschen in Xylol, Abtropfen und Eindecken mit Kanadabalsam.

B. Die ABC-Methode wird zum Nachweis von Parvovirusantigen im wesentlichen nach der Anleitung von MAHROUS (1986) durchgeführt:

1. 30 min lang in Xylol entparaffinieren, in der absteigenden Alkoholreihe (100 %—50 %) rehydrieren und für 10 min in Aqua dest. waschen.
2. Inkubation der Schnitte für 35 min in 0,3%igem H₂O₂-Methanol.
3. Waschen in 0,05 M TBS-Puffer (pH 7,6) 2 mal 20 min.
4. Inkubieren mit 1 : 70 verdünntem Normalserum für 20 min in der feuchten Kammer.
5. Abkippen des Normalserums und mit Filterpapier um den Schnitt herum zusätzlich antrocknen.
6. Inkubation mit den monoklonalen Antikörpern, verdünnt auf 1 : 600 in der feuchten Kammer bei 4 °C über Nacht.
7. Waschen mit 0,05 M TBS-Puffer (pH 7,6) für 10 min.

8. Inkubation mit 1:200 verdünntem biotinilierten Antiserum, 30 min lang in der feuchten Kammer.
9. Waschen mit 0,05 M TBS-Puffer (pH 7,6) für 10 min.
10. Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex 1 Stunde lang in der feuchten Kammer.
11. Waschen mit 0,05 M TBS-Puffer (pH 7,6) 10 min lang bei 4–6 °C.
12. Inkubieren in DAB-H₂O₂ nach MAHROUS (1986) bei 4–6 °C 20 min lang.
13. Waschen in fließendem Leitungswasser für 10 min.
14. Kernfärbung mit Hämalaun nach MEYER für 30 sec.
15. Waschen in fließendem Leitungswasser für 10 min.
16. Dehydrieren in der aufsteigenden Alkoholreihe (50 %–100 %), Xylolbehandlung, Eindecken in Kanadabalsam.

Nach jedem Waschen wird der Objektträger bei beiden Nachweisen um den histologischen Schnitt herum mit Fließpapier abgetrocknet, wobei der Schnitt feucht bleiben muß.

Bewertung der Reaktion

Bei einem positiven Ergebnis zeigen antigenhaltige Zellen eine deutliche feinkörnige, grobschollige oder homogene dunkelbraune Anfärbung (Abb. 3, 4, 5).

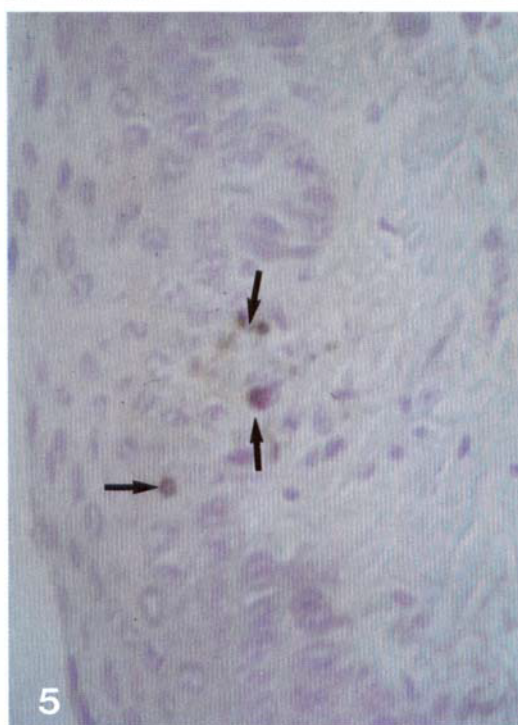
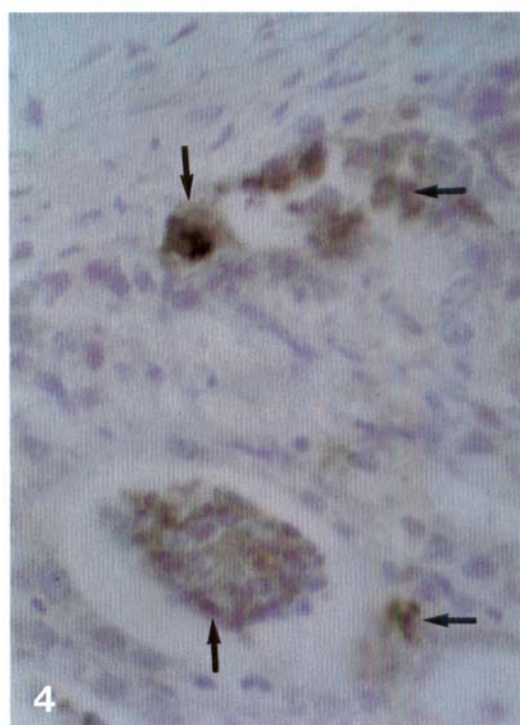
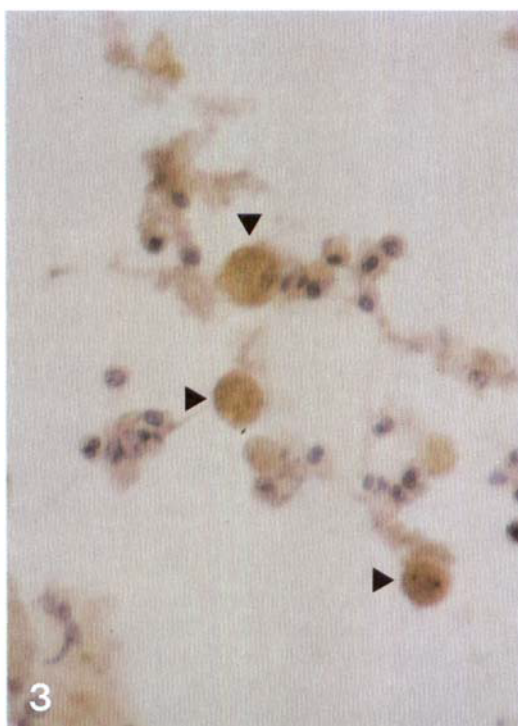
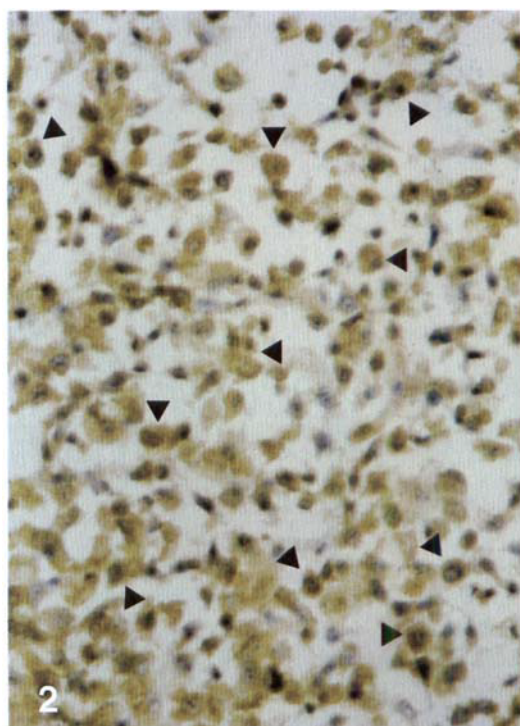
Diskussion

In den ersten Darstellungen der ABC (Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex)-Methode (Hsu u. Mitarb., 1981 a; 1981 b) werden nur unzureichende Angaben über gewebe- und antigenschonende Probenfixation mitgeteilt. Für die Etablierung der ABC-Methode mit monoklonalen Antikörpern wird in dieser Studie die Fixation der entnommenen Katzensgewebeproben mit dem SOMOGYI-TAKAGI-Fixationsgemisch (SOMOGYI u. TAKAGI, 1982) vorgenommen. Die für die Fixierung der Hundegewebeproben verwendeten drei Fixationslösungen (Bouin; Somogyi-Takagi; Lillie) entsprechen den Anforderungen ebenfalls, wobei die gepufferte Formollösung nach Lillie am günstigsten erscheint, da sie schnell hergestellt werden kann und nicht wie die Bouin'sche Lösung vor jedem Gebrauch neu angesetzt werden muß.

Da Hsu und Mitarbeiter (1981 a; 1981 b) keine Hinweise zur Auswahl eines geeigneten Adhäsivums zum Aufziehen der Schnittpräparate mitteilen, ist nach Vorversuchen für die vorliegende Aufgabenstellung Elmar's Glue (Katzensgewebeschnitte) als einfach handhabbares Reagenz eingeführt worden. Mit der Verwendung einer Eiweißlösung steht für den Antigennachweis beim Hund ein geeignetes Adhäsivum zur Verfügung. Auch die Temperaturangaben und Inkubationszeiten, die Hsu und Mitarbeiter (1981 a; 1981 b) für Peptid-Hormon-Untersuchungen vorgeben, sind für einen Virusantigennachweis ungeeignet. Mit den für die vorliegenden Untersuchungen erarbeiteten Inkubationszeiten und Inkubationstemperaturen ist ein Antigennachweis mit guten und reproduzierbaren Ergebnissen möglich. Nachteilig bei der ABC-Methode ist allerdings weiterhin die unspezifische Anfärbung von Pankreas-, Muskel- und Bindegewebe, die bei den Hundegewebeproben auch in Epithelien (respiratorisches Epithel der Trachea und Übergangsepithelien der Harnblase), Ausführungsgängen der Gl. lacrimalis und Gl. parotis, Nebenniere, Großhirn, Rückenmark, N. ischiadicus und Markschiebt des Kleinhirns aufzufinden sind. Es ist nicht auszuschließen, daß das in der Eiweißlösung enthaltene Avidin für die unspezifischen Reaktionen mitverantwortlich ist.

Mit den monoklonalen Antikörpern gelingt es in der vorliegenden Untersuchung erstmals, eine modifizierte ABC-Methode für den Nachweis des Coronavirusantigens bei der FIP-Erkrankung bzw. des Parvovirusantigens bei der Parvovirose des Hundes zu etablieren (DOHSE u. RUDOLPH, 1988; WALTER u. RUDOLPH, 1988).

Allgemein sind immunhistochemische Methoden wie die PAP (unlabeled antibody peroxidase-antiperoxidase) je nach Fragestellung 20- bis 1000fach sensitiver als die indirekte Immunfluoreszenz (STERNBERGER, 1979); die ABC-Methode wiederum soll 20- bis 40fach sensitiver als die PAP-Technik sein (Hsu u. Mitarb., 1981 b).



Zusammenfassung

Es wird eine modifizierte ABC-Methode (Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex) vorgestellt, die es ermöglicht, virale Antigene bei der Coronavirusinfektion der Katze (FIP) und der Parvovirus-Typ2-Infektion des Hundes mit Hilfe monoklonaler Antikörper in Paraffinschnitten nachzuweisen. Vor- und Nachteile sowie mögliche Fehlerquellen werden dargestellt und diskutiert.

Literaturverzeichnis

1. BOURNE, J. A., 1983: Handbook of immunoperoxidase staining methods. Dako Corp., Santa Barbara.
2. BURCK, H.-C., 1973: Histologische Technik. 3. Aufl. Verlag Thieme, Stuttgart.
3. BURNS, J., 1975: Background staining and sensitivity of the unlabeled antibody-enzyme, (PAP) method. Comparison with the peroxidase labeled antibody sandwich method. Histochem. 42, 291–294.
4. DOHSE, K., 1987: Immunhistochemische und histologische Untersuchungen zur Lokalisation des Antigens bei Hunden mit Parvovirus-Typ2-Infektion. Berlin, Freie Univ., Fachber. Veterinärmed., Diss.
5. DOHSE, K., und R. RUDOLPH, 1988: Antigen-Lokalisation bei caniner Parvovirus-Typ2-Infektion mittels der Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC) und der direkten Immunfluoreszenz (IF). J. Vet. Med. B 35, 717–728.
6. GRAHAM, T. C., and M. J. KARNOVSKY, 1966: The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: Ultrastructural cytochemistry by a new technique. J. Histochem. Cytochem. 14, 291–303.
7. GREEN, M., 1975: Avidin. Adv. Prot. Chem. 29, 85–133.
8. GUESDON, J., T. TERNYNCK, and S. AVRAMEAS, 1979: The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. J. Histochem. Cytochem. 27, 1131–1139.
9. HANKER, J. S., P. E. YATES, C. B. METZ, and A. RUSTIONI, 1977: A new specific, sensitive and non-carcinogenic reagent for the demonstration of horseradish peroxidase. Histochem. J. 9, 789–792.
10. HEGGENS, M. H., 1977: Avidin binds to condensed Chromatin. Stain Technology 52, 165–169.
11. HEITZMANN, H., and F. M. RICHARDS, 1974: Use of avidin-biotin-complex for specific staining of biological membranes in electron microscopy. Proc. Nat. Acad. Sci. 71, 3537–3541.
12. HEYERMANN, E., 1979: Immunoperoxidase technique in histopathology: applications, methods, and controls. J. Clin. Pathol. 32, 971–978.
13. HSU, S. M., and L. RAINE, 1981: Protein A, avidin and biotin in immunohistochemistry. J. Histochem. Cytochem. 29, 1349–1353.
14. HSU, S. M., L. RAINE, and H. FANGER, 1981 a: The use of avidin-biotin-peroxydase complex (ABC) in immunoperoxydase technique — a comparison between ABC and unlabeled (PAP) procedures. J. Histochem. Cytochem. 29, 577.
15. HSU, S. M., L. RAINE, and H. FANGER, 1981 b: A comparative study of the PAP-method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. Am. J. Clin. Pathol. 75, 734–738.
16. LEWIS, R. E., W. W. JOHNSON, and J. M. CRUSE, 1983: Pitfalls and caveats in the methodology for immunoperoxidase staining in surgical pathologic diagnosis. Surv. Synth. Path. Res. 1, 134–152.
17. LUPPA, H., 1986: Prinzipien immunhistochemischer Methoden. In: LUPPA, H., H. AMBROSIOUS, und W. STORCH: Immunreaktionen in der Histochemie. Handbuch der Histochemie; Bd. 4, Proteine, Teil 2. Verlag Fischer, Stuttgart, New York, 83–184.

Abb. 2. Massive Immunreaktionen (◄) in der fcwf-Zelllinie (felis catus whole foetus). ABC-Technik, Kernfärbung Hämatoxilin, 265fache Vergrößerung

Abb. 3. Immunreaktive Pneumozysten (◄) einer Katze. ABC-Technik, Kernfärbung Hämatoxilin, 320fach

Abb. 4. Spezifische Reaktion in Kryptenzellen (←) eines Hundes, sowie im Lumen eines Drüsen-schlauches im Rectum. ABC-Technik, Kernfärbung Hämatoxilin, 480fach

Abb. 5. Spezifische Reaktion in Epithelzellen (←) des Ösophagus eines Hundes. ABC-Technik, Kernfärbung Hämatoxilin, 480fach

18. MAHROUS, A.-T., 1980: Immunenzymhistochemischer Nachweis von Prolactin (PRL) und Wachstumshormon (STH) in spontan auftretenden Neubildungen und Dysplasien, in experimentell induzierten Dysplasien und im normalen Gewebe der Milchdrüse der Hündin. Berlin, Freie Univ., Fachber. Veterinärmed., Diss.
19. MAHROUS, A.-T., 1986: Persönliche Mitteilung.
20. MAYERSBACH, H. v., 1967: Ausmaß und Ursachen unspezifischer Färbungen. *Acta Histochem., Suppl.* 7, 271—284.
21. PEDERSEN, N. N. C., J. F. BOYLE, and K. FLOYD, 1981: Infection studies in kittens, using feline infectious peritonitis virus propagated in cell culture. *Am. J. Vet. Res.* 42, 363—367.
22. RÄSÄNEN, O., E. VANHATALO, and K. P. O. RÄSÄNEN, 1979: Sensitivity and background staining of the unlabeled antibody enzyme (PAP) method. *Anat. Anz.* 145, 58—64.
23. ROMEIS, B., 1968: *Mikroskopische Technik*. 16. Aufl. Verlag Oldenbourg, München, Wien.
24. SEIFERT, G., H. DENK, P. J. KLEIN, H. STEIN, und H. F. OTTO, 1984: Die Anwendung der Immunzytochemie in der praktischen Diagnostik des Pathologen. *Pathologe* 5, 187—199.
25. SOMOGYI, P., and H. TAKAGI, 1982: A note on the use of picric acid — paraformaldehyde — glutaraldehyde fixative for correlated light and electron microscopic immunocytochemistry. *Neuroscience* 7, 1779—1783.
26. STERNBERGER, L. A., 1979: *Immunocytochemistry*, 2nd edition. J. Wiley & Sons, New York.
27. STRAUS, W., 1971: Inhibition of peroxidase by methanol and by methanol-nitroferricyanide for use in immunoperoxidase procedures. *J. Histochem. Cytochem.* 19, 682—688.
28. STREEFKERK, J. G., 1972: Inhibition of erythrocyte pseudoperoxidase activity by treatment with hydrogen peroxide following methanol. *J. Histochem. Cytochem.* 20, 829—831.
29. WALTER, J., 1987: Morphologische und immunhistochemische Untersuchungen zur Antigenlokalisierung bei der Feline Infektiösen Peritonitis (FIP) unter Verwendung monoklonaler Antikörper. Berlin, Freie Univ., Fachber. Veterinärmed., Diss.
30. WALTER, J., und R. RUDOLPH, 1988: Die Feline Infektiöse Peritonitis. Histologische und immunhistochemische Untersuchungen zur Antigenverteilung. Report (Hamburg) Nr. 27, 33—42.
31. WEISBURGER, E. K., A. B. RUSSFIELD, F. HOMBURGER, J. H. WEISBURGER, E. BOGER, C. G. VAN DONGEN, and K. C. KENNETH, 1978: Testing of twenty-one environmental aromatic amines or derivatives for long-term toxicity or carcinogenicity. *J. Environmental Pathology and Toxicology* 2, 325—356.