

Entwicklung einer oral applizierbaren festen Arzneiform zur Immunisierung von Forellen gegen die Virale Hämorrhagische Septikämie

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen zu oral applizierbaren festen Arzneiformen für die Immunisierung von Regenbogenforellen (*Onchoryncus mykiss*) gegen die Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS), eine bedeutende Fischseuche, durchgeführt. Diese Arzneiformen waren durch unterschiedliche Freisetzungssysteme gekennzeichnet. Bei den in Vorversuchen eingesetzten Hartfettpräparaten, in die lyophilisiertes Vakzinevirus eingearbeitet wurde, sollte das physiologische Prinzip der Fettverdauung genutzt werden. Da Forellen zu den carnivoren Fischen zählen und über entsprechende digestive Enzyme zur Verdauung von Fetten verfügen, erschien dies als ein erfolgversprechender Ansatz. Jedoch zeigten die In-vivo-Untersuchungen, dass solide Partikel aus Hartfett vom Fisch nicht beziehungsweise kaum verdaut werden und infolgedessen eine vollständige Liberation der Vakzine nicht anzunehmen war. Wirksamkeitsuntersuchungen im Tierversuch bestätigten, dass durch die Applikation dieser Darreichungsform kein ausreichender Schutz induziert werden kann. Die Fütterungsversuche mit Hartfettpräparaten zeigten auch ein weiteres generelles Problem auf. Oral verfügbare Arzneiformen, die ausschließlich im Darm zerfallen sollen, verweilen aufgrund ihrer Größe mitunter extrem lange im Magen, so dass eine Kumulation der applizierten Präparate auftreten kann und dadurch die intestinale Aufnahme der Vakzine entscheidend verzögert wird. Außerdem ist eine partielle Inaktivierung der Vakzine bei längerem Kontakt der Präparate mit der sezernierten Magensäure denkbar, denn Aussagen über die Stabilität solcher Arzneiformen im Magen des Fisches existieren nicht. Dies betrifft in erster Linie magensaftresistente Arzneiformen. Eigene Untersuchungen zur Gastrointestinalpassage von unverdaulichen Silikonpräparaten bestätigten die Annahme, dass unzerfallene Partikel erst nach sehr langer Zeit den Darm erreichen.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde ein neuartiges Freisetzungssystem entwickelt, das einen schnellen Transport der Vakzine in den Darm und eine verbesserte Liberation gewährleistet. Um eine rasche Magenpassage zu erreichen, war es notwendig, dass die Präparate bereits im Magen der Fische zerfallen. Der hier erforderliche Schutz vor dem inaktivierenden Einfluss der im Magen vorhandenen Säure wurde durch die Wirkung neutralisierender und adsorbierender Substanzen erzielt. Mit Polyethylenglykol (PEG) stand eine wasserlösliche, chemisch weitestgehend inerte Matrix zur Verfügung, in die das lyophilisierte Vakzinevirus, Puffersubstanzen und basische Substanzen problemlos eingearbeitet werden konnten und die eine Extrusion des temperaturempfindlichen VHS-Virus bei niedrigen Temperaturen ermöglichte.

Durch die orale Immunisierung von Regenbogenforellen mit dieser neu entwickelten Darreichungsform konnten in mehreren Tierversuchen in Relation zu nichtimmunisierten Kontrollfischen signifikante Schutzraten induziert werden. Als besonders effektiv erwiesen sich dabei die PEG-Präparate, die $Mg(OH)_2$ und Al_2O_3 als neutralisierende und adsorbierende Basen enthielten.

Mit Hilfe der RT-PCR und seminested PCR gelang es, Virus-RNA nach Applikation der virushaltigen Impfpräparate im Darm, inneren Organen und im Blut nachzuweisen. Außerdem konnte die Virusreplikation im Darmgewebe mittels indirektem Immunfluoreszenztest gezeigt werden. Der erfolgte Virusnachweis verdeutlicht, dass diese Arzneiform geeignet ist, attenuiertes VHS-Virus weitestgehend unbeschadet zum posterioren Teil des Darms zu transportieren und die zur Induktion einer Immunantwort notwendige Infektion von Darmzellen zu ermöglichen.

Die mittels realtime RT-PCR durchgeführten immunologischen Untersuchungen zeigten, dass durch die Applikation der virushaltigen PEG-Präparate das Immunsystem im Darm und in der Milz stimuliert wird. Besonders interessant hinsichtlich einer Replikation des Vakzinevirus in den Darmzellen war die Stimulierung des lokalen darmassoziierten lymphatischen Gewebes. Hier konnte auf RNA-Ebene nachgewiesen werden, dass Moleküle des zellulären adaptiven Immunsystems, besonders MHC Klasse II und CD4, verstärkt exprimiert wurden, was möglicherweise zu einer Aktivierung von T-Helferzellen führt.

Die orale Immunisierung mit der entwickelten Arzneiform führte ebenso zur Stimulierung des adaptiven humoralen Immunsystems, indem die Bildung von Antikörpern gegen VHSV im Serum induziert wurde. Ob diese jedoch eine entscheidende Rolle bei der Abwehr einer möglichen Infektion spielen, ist bisher nur unzureichend untersucht.

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Arzneiform kann einen wesentlichen Beitrag leisten, Krankheiten, wie die VHS, in der Aquakultur weiter einzudämmen. Durch die anwenderfreundliche Handhabung, die nachgewiesene Wirksamkeit und die vergleichsweise geringen Herstellungskosten könnte diese Darreichungsform eine interessante Alternative zu bisher praktizierten Immunisierungsmethoden sein. Außerdem bietet diese Arzneiform die Möglichkeit, andere Impfstoffe und auch Arzneistoffe zur Prophylaxe beziehungsweise Therapie von Fischkrankheiten praktikabel einzusetzen.

Malte Börries Adelman, Mai 2006