

Entwicklung von *in vitro* Methoden zur Wirksamkeitsprüfung von Clostridien-Impfstoffen

Erika Borrmann, Frank Schulze und Roland Diller

Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, D-Jena

Zusammenfassung

Die MDCK-Zelllinie stellt für *Clostridium (C.)-perfringens-Epsilontoxin* und die VERO-Zelllinie für *C. novyi*-Typ B-Alpha-toxin ein sensitives und spezifisches Nachweissystem dar. Mit diesen Zellen wurden Zellkulturassays zur quantitativen Bestimmung sowohl von Antikörpern gegen Epsilon- als auch gegen Alphatoxin (Antitoxingehalt [IE/ml]) in Kaninchenserum aufgebaut und die für eine reproduzierbare Durchführung notwendigen Parameter standardisiert. Die mit diesen Tests erhaltenen Ergebnisse wurden mit den vom Hersteller angegebenen Wertigkeiten verglichen und die Korrelationskoeffizienten berechnet. Alle Korrelationen sind signifikant. Die Verwendung von permanent wachsenden Zellen als biologische Indikatoren zum Nachweis der Zytotoxizität eines Toxin-Antiserumgemisches stellt eine mögliche Alternative zur Bestimmung des LD₅₀ im Tierversuch dar und eignet sich somit zur Wirksamkeitsprüfung von Clostridien-Impfstoffen.

Summary: Development of *in vitro* methods for the potency testing of clostridial vaccines. Cell culture assays, using the MDCK cell line was confirmed as being sensitive to the *C. perfringens* epsilon toxin and VERO cell line to the *C. novyi* type B alpha toxin. Cell culture assays using these cells were developed and the test conditions were standardised. The antitoxin titres of rabbit antisera were calculated and compared with those of the manufacturers. The correlation coefficients between *in vitro* and *in vivo* method were calculated and were significant. The cell culture assay offers a valid *in vitro* alternative to the animal experiments for the titration of sera generated in the course of potency tests of clostridial vaccines.

Keywords: 3R, cell culture assay, MDCK cell line, VERO cell line, *C. perfringens* epsilon toxin, *C. novyi* type B alpha toxin

1 Einleitung

Die Hersteller biologischer Arzneimittel, zu denen Impfstoffe und Immunsereen gehören, sind verpflichtet, für jede Produktionscharge neben der Unschädlichkeit auch die Wirksamkeit nachzuweisen. Die dafür notwendigen Prüfverfahren sind im Europäischen Arzneibuch (EP 1997) rechtlich verankert (Cußler, 1995).

Veterinärmedizinische Clostridien-Impfstoffe, die zur Bekämpfung einer Reihe von Erkrankungen bei Rind, Schwein und Schaf eingesetzt werden, sind zumeist Mehrkomponenten-Toxoidimpfstoffe. Die Hauptbestandteile sind *Clostridium (C.) perfringens*-Typ B, C und D, *C. septicum*, *C. tetani*, *C. chauvoei* und *C. novyi* Typ B. Für jede dieser Komponenten erfolgt die Qualitätskontrolle nach entsprechenden Monographien des EP (1997), die alle die Durchführung von Tierversuchen beinhalten. Diese Infektions- und Intoxikationsmodelle an Mäusen oder Meerschweinchen, die starkes Leiden und schließlich den Tod von ca. 50% der Tiere verursachen, sind sowohl unter tierschutzrechtlichen Aspekten als auch hinsichtlich ihrer Aussagefähigkeit und dem Entwicklungsstand geeigneter *in*

vitro Methoden kritisch zu hinterfragen (Weißer und Hechler, 1997). Als Alternativmethoden bieten sich sowohl Immunologische als auch Zellkulturassays an.

Die Wertigkeit der *C. perfringens*- und *C. novyi*-haltigen Impfstoffe wird mittels der Menge der in Kaninchen gebildeten, schützenden Antikörper gegen die Toxide (Antitoxingehalt) ermittelt, die dann quantitativ in einem sich anschließenden Toxinneutralisationstest in Mäusen (TNT) bestimmt werden. Knight et al. (1990) überprüften erfolgreich die Anwendungsmöglichkeit der Zellkulturtechnik für Toxinneutralisationstests von *C. perfringens*, *C. septicum* und *C. novyi*, während Payne et al. (1994) einen Zytotoxizitätstest für das Epsilontoxin von *C. perfringens* Typ D beschrieben. Kanoe et al. (1998) verwendeten primäre Nierenzellen zum Nachweis der zytotoxischen Effekte von *C. novyi* Typ A.

Ausgehend von diesen Arbeiten entwickelten wir einen quantitativ auswertbaren Zellkulturassay zur Bestimmung der Antikörpertiter gegen *C. perfringens*-Epsilon- und *C. novyi*-Alpha-toxin.

In Vorversuchen wurden geeignete Zellen für den Nachweis des zytotoxischen

Effektes von *C. perfringens*-Epsilontoxin und *C. novyi*-Alpha-toxin ausgewählt. Dabei erwies sich die MDCK-Zelllinie als empfindliches und spezifisches Nachweissystem für das Epsilontoxin (Payne et al., 1994; Borrmann et al., 1997; Shortt et al., 2000), während VERO-Zellen spezifisch auf das *C. novyi*-Alpha-toxin reagierten (Borrmann und Schulze, 1999).

Für den Aufbau eines Zellkulturassays zur Bestimmung von Antikörpertitern in Kaninchenserum waren folgende Aufgaben zu lösen:

- ▶ Aufbau eines Neutralisationstests zur Bestimmung von Antikörpertitern (Antitoxingehalten) in Standard- und Prüfserum, Parameteroptimierung, Entwicklung eines Auswertprogramms
- ▶ Bestimmung der Korrelation zwischen *in vivo* und *in vitro* Methode.

2 Material und Methoden

2.1 Toxin

- ▶ *C. perfringens*-Epsilontoxin: Partiiell gereinigtes Epsilontoxin, hergestellt im Paul-Ehrlich-Institut (PEI), Langen
- ▶ *C. novyi*-Alpha-toxin: Standardtoxin für den *C. novyi*-Alpha-toxin-Neutralisations-

test in Mäusen (Lot-Nr. 425), bereitgestellt von Dr. Hauer (*Animal and Plant Health Inspection Service, Center for Veterinary Biologics, Ames, USA*)

2.2 Zelllinien

► MDCK (*Madin Darbin canine kidney*)-Zelllinie, ATCC Nr. CCI 34, kultiviert in *Eagle's minimal essential Medium* mit Earle-Salzen (MEM) supplementiert mit nicht-essentiellen Aminosäuren (Sigma, BRD), unter Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (FKS), 2mM Glutamin und 50 µg/ml Gentamycin, bei 37°C und 5% CO₂.

► VERO (*African Green Monkey Kidney*), ECACC Nr.: 84113001, kultiviert in MEM (ICN Biomedicals, Inc., USA) unter Zusatz von 10% FKS, 2mM Glutamin und 50 µg/ml Gentamycin, bei 37°C und 5% CO₂.

2.3 Seren

► Referenzseren

– 1. Internationaler Standard für *C. perfringens*-Epsilon-Antitoxin ,1954 (*Central Veterinary Laboratory* Weybridge, UK; jetzt National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC, UK))
– Anti-*Clostridium-perfringens*-Epsilon-toxin (Laborstandardserum vom Kaninchen) vom 14.12.1994 (aEps1 b), hergestellt im PEI, Langen, 10 IE/ml

– 3. Internationaler Standard für Gas-Gangrän-Antitoxin (*Cl.novyi*), equine; Code:OE, (NIBSC, UK)

– Anti-*Clostridium-novyi*-Alphatoxin (Laborstandardserum vom Kaninchen) v. 23.4.1998, hergestellt im PEI, Langen, 6 IE/ml (bestimmt durch Wood K. R., Hoechst Roussel Vet, GB)

Die internationalen Standardseren wurden zur Bestimmung der Wertigkeit der Laborstandardseren verwendet.

► Prüfseren

– Die zur Bestimmung der Antitoxingehalte verwendeten Kaninchenseran einschließlich der Angaben ihrer Antitoxingehalte wurden vom PEI im Rahmen eines gemeinsamen Projektes erhalten (Ebert, 1998).

2.4 Zellkulturassay

Die Testdurchführung erfolgte in 96-Kavitäten-Platten (Costar Europe Ltd., NL). Zum Ansetzen der Toxinlösungen und der log₂-Verdünnungsreihe der Antiseren verwendeten wir das jeweilige Zellkulturmedium mit reduziertem Serumzusatz (5%

FKS). Die log₂-Verdünnungsstufen des jeweiligen Antiserums (Prüf-, Negativ- und Referenzserum) wurden nach vorgegebenem Prüfschema in 96-Kavitäten-Platten (Verdünnungsplatten) hergestellt. Je 50 µl der entsprechenden Antiserumverdünnungen wurden nach vorgegebener Plattenbelegung in die Testplatte pipettiert, dazu 50 µl Toxinlösung gegeben und 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 50 µl Zellsuspension. Die Zellsuspensionen gewannen wir durch Abtrypsinieren der in Zellkulturflaschen konfluent gewachsenen Zellen und Resuspendieren in den jeweiligen Medien. Als Zellkontrollen dienten 50 µl Zellsuspension in 100 µl Zellzuchtmedium (5% FKS) bzw. für die Toxinkontrolle 50 µl Toxinlösung in 50 µl Zellzuchtmedium und 50 µl Zellsuspension pro Kavität. Auf jeder Platte wurden ein Antiserum (Dreifachbestimmung), eine Negativkontrolle (Einfachbestimmung) und das Referenzserum (Doppelbestimmung) titriert. Die Auswertung erfolgte nach drei Tagen Kultivierung bei 37°C und 5% CO₂ mikroskopisch und mittels 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Test (Mossman, 1983). Für die Messung der Extinktion bei 550 nm verwendeten wir einen ELISA-Reader (TECAN Deutschland GmbH, BRD). Zur Berechnung der relativen Wertigkeiten der Kaninchenseran in IE/ml aus den gemessenen Extinktionen wurde ein im BgVV entwickeltes Programm (Borrmann et al., 1997) eingesetzt.

2.5 Testparameter

Um eine reproduzierbare Durchführung der Neutralisationstests zu ermöglichen,

mussten eine Reihe von Bedingungen in Vorversuchen bestimmt und optimiert werden. Diese Parameter sind in Tabelle 1 aufgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Bestimmung der Antikörpertiter von Prüfseren mittels Zellkulturassay

3.1.1 *C. perfringens*-Epsilontoxin

Die Antikörpertiter (Antitoxingehalte) von 90 Kaninchenseran (einschließlich Wiederholungen) wurden berechnet und die Korrelationen zu den von den Herstellern angegebenen Wertigkeiten bestimmt. Der Korrelationskoeffizient betrug $r = 0,6$, $p < 0,01$ ($n = 90$), die Korrelation ist signifikant.

3.1.2 *C. novyi*-Alphatoxin

Hierbei wurden die Antikörpertiter von 69 Kaninchenseran (einschließlich Wiederholungen) berechnet. Aus der Korrelationsstudie ergab sich ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,8$, $p < 0,01$ ($n = 69$), die Korrelation ist ebenfalls signifikant

3.2 Reproduzierbarkeit der Zellkulturassays

Zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit des Zellkulturassays wurden die Standardabweichungen der Antikörpertiter in IE/ml von mindestens drei Untersuchungen berechnet. Der Inter-Assay-Variationskoeffizient beträgt für die Epsilonbestimmung durchschnittlich 11% (min. 1,7%; max. 27,8%), und für die Alphatoxinbestimmung ergaben sich Inter-Assay-Variationskoeffizienten von 5,7% (min. 0,6%; max. 15%). Der Intra-Assay-Variationskoeffizient bezüglich der Antikörpertiter (IE/ml) wurde für ausgewählte Beispiele berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tab. 1: Testparameter

	<i>C.perfringens</i> -Epsilontoxin	<i>C.novyi</i> -Alphatoxin
Zellzahl/Kavität	5x10 ³	1x10 ⁴
Alter der Zellen nach Passage	4 Tage	4 Tage
Zellpassagen	<140. Pa.	6.-100. Pa.
Toxinkonzentration	0,01 mg/ml	¹⁾
Nachweis des zytotoxischen Effektes	MTT	MTT

¹⁾ Toxinkonzentration unbekannt, Originaltoxin von Dr. Hauer wird 1:2000 verdünnt, verwendet.

4 Diskussion

Zum Nachweis, ob eine Ersatzmethode geeignet ist, die Wirksamkeit von Impfstoffen zu bestimmen, müssen die Ergebnisse der *in vitro* und *in vivo* Methode miteinander verglichen werden. Dazu wird berechnet, in welchem Maß beide Methoden mitein-

Intra-Assay-VK von <10% und Inter-Assay-VK zwischen 4 und 33%, vereinzelt bis 50% angegeben (Ebert, 1998). Für immunchemische Methoden sind entsprechend dem Kommentar zum Kapitel „Immunchemische Methoden des Deutschen Arzneibuches“, 10. Ausgabe (1996), Intra-Assay-VK von <10% erlaubt.

	n	x	Intra-Assay- VK
C. perfringens-Epsilontoxin			
Laborstandardantiserum	4	4	9,8 (min. 4,4; max. 14,1)
HV 17	3	3	14,4 (min. 12,0; max. 18,2)
C. novyi-Alphatoxin			
Laborstandardantiserum	3	3	8,8 (min. 1,8; max. 15,3)
HV 17	6	3	2,1 (min.1,0; max. 3,0)

n= Anzahl der Platten, x= Anzahl der Bestimmung / Platte

Tab.2: Intra-Assay-Variationskoeffizient berechnet für Antikörpertiter in IE/ml

ander korrelieren (Ebert, 1998). Der Tierversuch gilt dabei als der „goldene Standard“ und die Ersatzmethode sollte zu vergleichbaren Aussagen führen, damit die Unbedenklichkeit und Wirksamkeit des Impfstoffes gewährleistet bleibt (Schwanig, 1998).

Die mit dem Zellkulturassay bestimmten Antikörpertiter (IE/ml) der Prüferen wurden mit dem im TNT erhaltenen Wert verglichen und die Korrelationskoeffizienten zwischen den Ergebnissen beider Verfahren berechnet. Alle Korrelationen sind signifikant. Die erhaltenen Korrelationskoeffizienten zeigen, dass eine gute Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen des Zellkulturassays und des TNT besteht.

Ein Maß für die Reproduzierbarkeit eines Tests sind sowohl die berechneten Standardabweichungen der Antitoxingehalte (Inter-Assay-Variationskoeffizient (VK)) als auch der Intra-Assay-VK. Die berechneten Standardabweichungen liegen in der gleichen Größenordnung wie die von Knight et al. (1990) angegebenen Werte. Sowohl der Inter-Assay-VK von <20% als auch der Intra-Assay-VK von <15% zeigt die Bedeutung der Durchführung des Zelltests unter standardisierten Bedingungen. Da die Berechnung der Antikörpertiter unter Einbeziehung des auf jeder Platte mitgeführten Standardantiseraums erfolgt, können die von Platte zu Platte unterschiedlichen Wachstumsbedingungen vernachlässigt werden. Für die zur Bestimmung von *C. perfringens*-Antikörpertitern in Kaninchenseren entwickelten ELISA wurden

Die Anwendung von Zellkulturassays zur Wirksamkeitsprüfung von Impfstoffen besitzt große Vorteile gegenüber immunologischen Methoden, da die biologische Komponente berücksichtigt wird. Die Verwendung von permanent wachsenden Zellen als biologische Indikatoren zum Nachweis der Zytotoxizität eines Toxin-Antiserumgemisches stellt eine mögliche Alternative zum Tierversuch dar und eignet sich somit zur Wirksamkeitsprüfung von Clostridien-Impfstoffen.

In den von der Europäischen Arzneibuchkommission überarbeiteten Monografien für Clostridien-Impfstoffen wird auf die Verwendung geeigneter validierter Ersatzmethoden hingewiesen, Zellkulturmethoden werden hierbei ausdrücklich erwähnt (European Pharmacopoeia 2001).

Danksagung

Die Arbeiten wurden mit Unterstützung des Bundesministeriums für Bildung und Forschung durchgeführt. Wir danken Frau Ch. Muselmann und Frau A. Dramburg für die gewissenhafte Durchführung der Arbeiten. Außerdem danken wir Dr. Hauer (USDA, APHIS, VS, USA) für die Bereitstellung des Alphatoxins und Dr. Wood (Hoechst Roussel Vet, GB) für die Bestimmung der Wertigkeit des Laborstandards für *C. novyi* Typ B. Aus dem PEI Langen, Abt. Veterinärmedizin, erhielten wir dankenswerterweise das Epsilontoxin sowie Prüf- und Laborstandardantisera.

Literatur

- Borrmann, E., Schulze, F. und Diller, R. (1997). Wirksamkeitsprüfung von Clostridium-perfringens-Impfstoffen mittels Zellkulturassay. *Tierärztl. Umschau* 52, 616-621.
- Borrmann, E. and Schulze, F. (1999). Detection of Clostridium novyi type B a toxin by cell culture systems, *FEMS Immun. Med. Microbiol.* 24, 275-280.
- Cußler, K. (1995). Tierversuche im Arzneibuch – Möglichkeiten für Alternativen bei Veterinärimpfstoffen. In H.Schöffl, H. Spielmann, H. A. Tritthart et al. (Hrsg.), *Forschung ohne Tierversuche* (184-187). Wien, New York: Springer-Verlag.
- Deutsches Arzneibuch, 10. Ausgabe (1996). Kommentar zu Kapitel V.2.1.10. Immunchemische Methoden. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag.
- Ebert, E. (1998). *Gesetzlich vorgeschriebene Tierversuche zur Wirksamkeitsprüfung von Clostridium perfringens -Immunpräparaten: Entwicklung und Prävalidierung von Alternativmethoden*. Dissertation, Frankfurt/Main.
- Europäisches Arzneibuch, 3. Ausgabe (1997). Monografie Nr. 362, 363. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag.
- European Pharmacopoeia, Supplement 2001, Council of Europe, Strasbourg)
- Kanoe, M., Masui, Y., Murakami, Y. et al. (1998). Detection of cytotoxic effects of Clostridium novyi type A on bovine kidney cells. *Microbios* 95, 7-13.
- Knight, P. A., Queminet, J., Blanchard, J. H. et al. (1990). In vitro tests for the measurements of clostridial toxins, toxoids and antisera. II. Titration of Clostridium perfringens toxins and antitoxins in cell culture. *Biologicals* 18, 263-270.
- Mossmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* 65, 55-63.
- Payne, D. W., Williamson, E. D., Havard, II. et al. (1994). Evaluation of a new cytotoxicity assay for Clostridium perfringens type D epsilon toxin. *FEMS Microbiol. Lett.* 116, 161-168.
- Schwanig, M. (1998). Ersatzmethoden zum Tierversuch. Der lange Weg von der Entwicklung bis zur Arzneibuchmethode. *ALTEX*, 15 (Suppl.), 6-9.
- Short, S. J., Titball, R. W. and Lindsay, C. D. (2000). An assessment of the in vitro toxicology of Clostridium perfringens type D e-toxin in human and animal cells. *Hum. Exper. Toxicol.* 19, 108-116.
- Weißer, K. and Hechler, U. (1997). *Animal welfare aspects in the quality control of immunobiologicals. A critical evaluation of the animal tests in Pharmacopoeia Monographs*. Nottingham: FRA-ME.

Korrespondenzadresse

Dr. Erika Borrmann
Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
Fachbereich 4 „Bakterielle Tierseuchen und Bekämpfung von Zoonosen“
Naumburgerstraße 96A
D-07743 Jena
Tel. +49-3641-80 42 51
Fax +49-3641-80 42 28
E-mail: e.borrmann@bgvv.de