

# Weiterentwicklung eines Zellkulturmodells zum Nachweis bakterieller Pyrogene

Anja Peterbauer, Ernst R. Werner, Gabriele Werner-Felmayer  
Universität A-Innsbruck

## Zusammenfassung

Um die Anwendung des Kaninchen-Pyrogenitätstests zu reduzieren, wird bereits in vielen Fällen der Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test (LAL) zur Überprüfung pyrogener Verunreinigungen von Parenteralia akzeptiert. Der LAL-Test erkennt allerdings nur Komponenten der gramnegativen Zellwand (Endotoxine), und es ist schwierig, den Endotoxingehalt von stark proteinhaltigen Proben zu bestimmen. Wir haben den von uns bereits früher etablierten *in vitro* Test zur Erkennung bakterieller Pyrogene auf der Basis der Messung der Neopterin- bzw. Nitritproduktion von IFN- $\gamma$ -kostimulierten humanen (THP-1) bzw. murinen (J774A.1 und RAW 264.7) monozytischen Zelllinien weiterentwickelt. Unsere Optimierungsstudie ergab, daß THP-1 in serumhaltigem Medium einen hochsensitiven Pyrogenachweis und RAW 264.7 in serumfreiem Medium ein optimales Screening von Proben erlaubt.

Im Weiteren zeigten wir, daß zellfreie Überstände von *Staphylococcus aureus*-Kulturen im LAL-Test nicht, in unserem Zellkulturmodell hingegen sehr sensitiv detektiert werden können, und die auftretende Immunstimulation durch Substanzen unterschiedlichen Molekulargewichts verursacht wird.

Wir sind der Meinung, daß unser Nachweissystem für bakterielle Pyrogene gemeinsam mit dem LAL-Test in der Lage ist, den Kaninchen-Pyrogenitätstest zu ersetzen bzw. dessen Anwendungsbereich zu minimieren.

**Keywords:** bacterial pyrogen detection, cell cultur model, monocytic cell lines, IFN- $\gamma$

## 1 Einleitung

Medikamente, die parenteral, d.h. unter Umgehung des Magen-Darm-Trakts verabreicht werden, also durch eine intravenöse, intramuskuläre oder subkutane Applikation, müssen auf pyrogene Verunreinigungen geprüft werden, da diese zu Fieber und in der Folge zu septischem Schock mit möglichem letalen Ausgang führen können, wenn sie ins Kreislaufsystem gelangen. Diese Überprüfung geschieht derzeit vor allem mit dem allseits anerkannten Kaninchen-Pyrogenitätstest. Aus ethischen, aber auch aus ökonomischen Gesichtspunkten wäre es wünschenswert, den Test durch *in vitro* Methoden zu ersetzen bzw. zumindest seinen Anwendungsbereich zu minimieren. Eine bereits häufig eingesetzte Alternativmethode ist der Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test (LAL-Test), der allerdings nur Komponenten aus der gramnegativen Bakterienzellwand (Endotoxi-

ne), die am häufigsten auftretenden pyrogenen Verunreinigungen, detektieren kann, nicht aber pyrogene Substanzen, die von grampositiven Bakterien stammen. Darüberhinaus können bei der Austestung von Proben mit hohem Proteingehalt (Immunglobuline, Albumine) Schwierigkeiten auftreten. Deshalb wird nach weiteren Alternativen gesucht, um diese Unzulänglichkeiten des LAL-Tests zu umgehen.

Bereits vor zehn Jahren haben verschiedene Arbeitsgruppen begonnen, die Produktion von Zytokinen durch Monozyten, monozytische Zelllinien oder Vollblut als Antwort auf Pyrogene als Ersatzmethode zum Tierversuch zu etablieren (zusammengefaßt in Eperon et al., 1997; Hartung und Wendel, 1995; Hartung et al., 1998). Unsere Arbeitsgruppe entwickelte ebenfalls ein Zellkulturmodell zum Nachweis bakterieller Pyrogene (Werner-Felmayer et al., 1995). So konnten wir zeigen, daß die huma-

*Summary: Further development of a cell culture model for the detection of bacterial pyrogens*

*In many cases the limulus amoebocyte lysate assay (LAL) is now accepted to detect pyrogenic contaminations in parenteralia instead of the rabbit pyrogenicity test. As the LAL test is able to detect only compounds of gramnegative bacteria (endotoxins) and as it is difficult to test samples with high amounts of protein, we have now further developed our previously established *in vitro* assay for the detection of bacterial pyrogens in order to overcome the shortcomings of the LAL assay. Our test system is based on the stimulation of IFN- $\gamma$ -primed human (THP-1) and murine (J774A.1 and RAW 264.7) monocytic cell lines by bacterial pyrogens to form neopterin or nitrite, respectively. THP-1 in serum-containing media can be used as a high sensitivity assay, while RAW 264.7 in serum-free media is a very good screening system.*

*We showed that the cell-free supernatants of various *S. aureus* cultures could not be assessed by the LAL assay while the here presented cell culture model detected them very sensitively. The stimulation of immune cells seems to be caused by substances of various molecular masses.*

*In conclusion, we suggest to reduce or even replace the rabbit pyrogenicity test by using our cell culture model in addition to the LAL assay.*

ne Myelomonozytoma-Zelllinie THP-1 und die murine monozytische Zelllinie J774A.1 von gramnegativen und grampositiven Bakterien stammende Pyrogene sehr sensitiv detektieren können, wobei die Sensitivität durch Kostimulation mit dem Zytokin IFN- $\gamma$  noch gesteigert werden konnte. Das *in vivo* von T-Zellen gebildete IFN- $\gamma$  induziert gemeinsam mit den bakteriellen Substanzen die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) bzw. die Guanosintriphosphat-Cyclohydrolase I (GTP-CH.I) in Monozyten bzw. Makrophagen (Werner et al., 1998).

Als Parameter für die Immunstimulation messen wir in unseren Systemen Neopterin (THP-1), das aus Guanosintriphosphat entsteht und sich im Zellkulturüberstand anhäuft; und Nitrit (J774A.1 und RAW 264.7), welches aus NO entsteht. NO wiederum geht aus der Reaktion L-Arginin zu L-Citrullin und NO (durch das Enzym NO-Synthase) hervor. Diese Me-

taboliten (Neopterin und Nitrit) sind mit einfachen diagnostischen Verfahren zu quantifizieren. Durch die Verwendung von Mikrotiterplatten läßt sich dieser Test auch leicht automatisieren.

Bei der Weiterentwicklung unseres Testsystems haben wir noch eine weitere murine Monozytenzelllinie ausgetestet: RAW 264.7. Ferner haben wir Substanzen ausgetestet, die im LAL-Test nicht oder nur schwer nachweisbar waren. Dies sind vor allem gereinigte Zellwandkomponenten und Exotoxine sowie unbehandelte, zell-freie Überstände von grampositiven Bakterien. Da die Überstände von grampositiven Bakterienkulturen den Zustand einer grampositiven Bakteriämie besser repräsentieren als gereinigte Einzelsubstanzen, wurde noch versucht, die pyrogenen Substanzen im Überstand einer *Staphylococcus aureus*-Kultur mit Hilfe diverser Methoden, wie Hitzedenaturierung, Trichloressigsäurepräzipitierung, Enzymverdau sowie Ausschluß- und Gelfiltration näher zu charakterisieren.

Außerdem testeten wir verschiedene Einflüsse auf unser Zellkulturmodell, wie IFN- $\gamma$  Dosis, Inkubationszeit, L-Arginin-Konzentration und serumhaltiges versus serumfreies Kulturmedium. Als serumfreie Medien verwendeten wir solche, die anders als das früher eingesetzte AIMV, ohne Proteinzusatz auskommen. Dies lieferte uns die erforderlichen Daten für die Erstellung eines Standardprotokolls für den *in vitro* Nachweis bakterieller Pyrogene.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Kultivierung der Zellen

Die humane Myelomonozytoma-Zelllinie THP-1 und die beiden murinen makrophagenähnlichen Zelllinien J774A.1 und RAW 264.7 stammen ursprünglich von der *American Type Culture Collection* (Rockville, MD). THP-1 Zellen wurden in RPMI 1640 (Biochrom, D-Berlin) und in *Ultraculture* (BioWhittaker, Walkersville, MD) in einer Dichte von  $10^5$ /ml kultiviert, nach vier Tagen wurde frisches Medium zugegeben. *Ultraculture* wurde mit 2 mM L-Glutamin (Serva, D-Heidelberg), 100 U/ml Penicillin und 100  $\mu$ g/ml Streptomycin (beide von *Biological Industries*, Kibbutz Beit Haemek, Israel) supplementiert. Dem RPMI 1640 wurde 10% hitze-inaktiviertes fötales Kälberserum (FCS, Biochrom) zugesetzt. J774A.1- und RAW 264.7-Zellen wurden in DMEM (Biochrom), gleich supplementiert und wie RPMI 1640, in X-Vivo 20 (BioWhittaker) kultiviert und zweimal wöchentlich in

einem Verhältnis von 1:8 gesplittet. In regelmäßigen Abständen von etwa sechs Monaten wurden frische Stockkulturen der Zellen aufgezogen, um die Variabilität der Zell-Linien möglichst gering zu halten.

### 2.2. Stimulierung der Zellen

Für den *in vitro* Pyrogenitätstest wurden die Zellen in Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten in einer Dichte von  $2,5 \times 10^5$  Zellen pro Kavität (THP-1) bzw. von  $2 \times 10^5$  pro Kavität (J774A.1 und RAW 264.7) ausgesät. Die diversen Stimuli wurden in 10 bis 40  $\mu$ l zugesetzt und das Volumen pro Kavität auf 250  $\mu$ l mit Zellkulturmedium ergänzt. Als Positivkontrolle dienten 250 U/ml humanes rekombinantes IFN- $\gamma$  (hu IFN- $\gamma$  mit einer spezifischen Aktivität von  $2 \times 10^7$  U/mg, freundlicherweise von F.E. Rentschler Biotechnologie GmbH, D-Laupheim, zur Verfügung gestellt) bzw. murines rekombinantes IFN- $\gamma$  (mu IFN- $\gamma$  mit einer spezifischen Aktivität von  $10^7$  U/mg, von *Gibco BRL, Life Technologies*, A-Wien und 1  $\mu$ g/ml Lipopolysaccharid von *Escherichia coli* O55:B5 (Sigma, Wien, Österreich). Als Negativkontrolle wurde das jeweilige Zellkulturmedium eingesetzt. Die Zellen wurden immer mit dem Kostimulus IFN- $\gamma$  eingesetzt. Nach 40-stündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre wurden die Platten 7 min bei 400 x g abzentrifugiert, der Überstand (150  $\mu$ l pro Kavität) abgenommen und für die Metabolitenmessung aufbewahrt. Mit den restlichen 100  $\mu$ l pro Kavität und den darin befindlichen Zellen wurde der „*Cell Titer 96 AQ<sub>ueous</sub> non-radioactive cell proliferation assay*“ (Promega, Madison, WI) zur Bestimmung der Zellviabilität durchgeführt. Dieser Test basiert auf der Reduktion seiner Tetrazoliumkomponente zu Formazan, dessen Absorption nach einer 30-minütigen Inkubationszeit bei 490 nm gemessen werden kann.

Die IFN- $\gamma$ -Konzentration und die Inkubationszeit wurden in manchen Experimenten variiert.

### 2.3 Testkomponenten

Als Positivkontrolle kam in allen Tests LPS von *E. coli* O55:B5, isoliert durch Phenolextraktion und gereinigt durch Ionenaustauschchromatographie von Sigma (A-Wien, Kat.nr. L4524) zur Anwendung. Es wurden verschiedene LPS und andere Bakterienkomponenten von gramnegativen und grampositiven Bakterien getestet:

LPS von glatten Stämmen:

- E. coli* O55:B5 (Sigma, L4524),
- E. coli* O26:B6 (Sigma, L8274),

*Salmonella typhimurium* (Sigma, L6511 oder Sebak, Wien, Österreich, 24.02.43), *Klebsiella pneumoniae* (Sigma, L4268) und *Pseudomonas aeruginosa* (Sigma, L8643).

LPS von rauhen Stämmen:

- E. coli* EH100 (Sigma, L9641 oder Sebak, 24.11.43),
- E. coli* F583 (Sigma, L6893),
- Salmonella minnesota* Re 595 (Sigma, L9764 oder Sebak, 24.08.43) und
- S. typhimurium* mut. (Sebak, 24.09.43).

Detoxifizierte LPS von:

- E. coli* O55:B5 (Sigma, L9023),
- S. minnesota* (L1523) und
- S. typhimurium* (Sigma, L2525).

Diphosphoryl Lipid A von:

- E. coli* F583 (Sigma, L5399),
- S. minnesota* Re 595 (Sigma, L0774) und
- S. typhimurium* mut (Sebak, 24.17.43).

Monophosphoryl Lipid A von:

- E. coli* F583 (Sigma, L6638),
- S. minnesota* Re 595 (Sigma, L6895 und Sebak, 24.15.02) und
- E. coli* mut (Sebak, 24.14.02).

Synthetische Teilstrukturen von LPS:

- b-D-GlcNac(1-6)-D-GlcNac (Sigma, A3919) und
- 2-Keto-3-deoxyoctonat (Sigma, K2755).

Zellwandkomponenten von grampositiven und Mykobakterien:

- Lipoteichonsäure von *S. aureus* (Sigma, L3265),
- N-Acetylmuramyl von *Mycobacterium tuberculosis* (Sigma, A9519) und
- Trehalose-6,6'-dimykolat von *M. tuberculosis* (Sigma, T2268)

*Toxic shock syndrom toxin-1* von:

- S. aureus* (Sigma, T5662).

Toxic shock toxin und Enterotoxin A von:

- S. aureus* (ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA).

### 2.4 Überstände von Bakterienkulturen

Verschiedene *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* Patientenisolate wurden uns von der Bakteriologischen Untersuchungsanstalt der Universität Innsbruck zur Verfügung gestellt. Die Bakterien wurden im pyrogenfreien Zellkulturmedium *Ultraculture* (BioWhittaker) vermehrt, da sämtliche ausgetesteten Medien, die normalerweise für das Wachstum von Bakterien verwendet werden, laut LAL-Test Endotoxin enthielten. 7 ml Kulturmedium wurden mit einer Einzelkolonie von der Agarplatte beimpft und über Nacht bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Mit diesen 7 ml Vorkultur wurden 400 ml neues Medium

beimpft und bei 37°C und 225 rpm bis zu einer OD<sub>620nm</sub> von 0,6 herangezogen. Die Überstände wurden durch Zentrifugation (15 min, 5.000 x g) und anschließende Filtration durch pyrogenfreie Zellulose-Acetat-Filter mit einer Ausschlußgröße von 0,2 µm (Minisart von Sartorius, D-Göttingen) gewonnen und bei -20°C bis zum Einsatz im Zellkulturmodell gelagert. Der Überstand von *S. aureus* 652 wurde zur näheren Charakterisierung vorbehandelt, entweder 10 min mit 95°C, 30 min mit 40 µl/ml 1 M Trichloressigsäure (TCA, Merck, D-Darmstadt) oder 1 h bei 37°C mit 12 U/ml Proteinase K (14 mg/ml, Boehringer, D-Mannheim) bzw. 10 U/ml DNase (RQ1 RNase-frei, Promega) bzw. einer Kombination aus Proteinase K und DNase.

### 2.5 Gelfiltration

5 ml der *S. aureus* 652 Kultur wurden lyophilisiert und anschließend in 500 µl 0,9% steriler pyrogenfreier NaCl-Lösung (Mayrhofer Pharmazeutika GmbH, A-Linz) rekonstituiert. Davon wurden 100 µl auf eine Superose 12 Säule (Pharmacia LKB Biotechnology, S-Uppsala) in einem *high pressure liquid chromatography* (HPLC) System von Hewlett Packard (1050 TI, A-Wien) aufgetragen. Die Flußgeschwindigkeit betrug 0,5 ml/min. Die Absorption der einzelnen Fraktionen wurde von einem UV-Detektor bei 280 nm gemessen. Fraktionen von 500 µl wurden im Laufe einer Stunde gesammelt und bis zur Austestung bei -20°C aufbewahrt. Der verwendete Molekulargewichtsstandard (Serva, D-Heidelberg) war ein Gemisch von Albumin (66 kD), Carboanhydrase (29 kD), Cytochrom C (12,4 kD) und Aprotinin (6,5 kD), der erst nach der Probenfraktionierung aufgetragen wurde, da er mit großen Mengen an Endotoxin kontaminiert war, was mittels LAL Test nachgewiesen wurde.

### 2.6 Messung der Metaboliten und TNF-α im Überstand

Die Neopterinmessung erfolgte mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA, Neopterin ELitest, Brahms, A-Wien). Für den Nitritnachweis mittels Griess-Reaktion wurden 50 µl Probe mit 75 µl a.dest. und 125 µl Griess-Ilosvay's Reagenz (Merck, D-Darmstadt) gemischt und nach 10 min die Absorption bei 540 nm gemessen. Als Standard diente Natriumnitrit in den Konzentrationen 2,5 bis 100 µmol/l. Bei ausgewählten Proben wurde murines TNF-α mittels ELISA (Biosource, B-Fleurus) gemessen.

### 2.7 LAL Test

Für die Endotoxinbestimmung ausgewählter Proben (siehe Tab. 1) wurde ein chromogener LAL-Test verwendet (QCL-1000 von BioWhittaker) und laut Herstellerangaben durchgeführt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Optimierung des Zellkultursystems

#### 3.1.1 Inkubationszeit

Der Einfluß unterschiedlich langer Inkubationszeiten auf das Ergebnis des *in vitro* Pyrogenitätstest wurde anhand steigender *E. coli* O55:B5 LPS Konzentrationen untersucht. Die Messungen erfolgten jeweils 13, 21 bzw. 38 h nach der Stimulation der Zellen.

In der humanen Zelllinie THP-1 konnte das *E. coli* LPS nach 13 h bereits ab einer Konzentration von 10<sup>-10</sup> g/ml nachgewiesen werden, sowohl bei der Verwendung von RPMI 1640/10% FCS als auch von *Ultraculture*. Bei einer Verlängerung der Kultivierungsdauer auf 21 bzw. 38 h blieb die Nachweisgrenze unverändert, lediglich die Menge des gebildeten Neopterin stieg an (Abb. 1). Bei den beiden murinen Zelllinien J774A.1 und RAW 264.7 lag das Detektionslimit nach 13-stündiger Inkubation bei 10<sup>-7</sup> g/ml, wenn serumfreies Medium verwendet wurde, und konnte im Fall von RAW 264.7 durch Verlängerung der Bebrütungszeit auf 10<sup>-9</sup> g/ml, im Fall von J774A.1 auf 10<sup>-8</sup> g/ml herabgesetzt werden. Wurden die beiden murinen Zelllinien in serumhaltigem Medium kultiviert, lag die Nachweisgrenze nach 13 h bei 10<sup>-9</sup> g/ml, die sich durch eine verlängerte Inkubationszeit nicht veränderte, nur die Metabolitenmenge nahm zu (Daten nicht gezeigt).

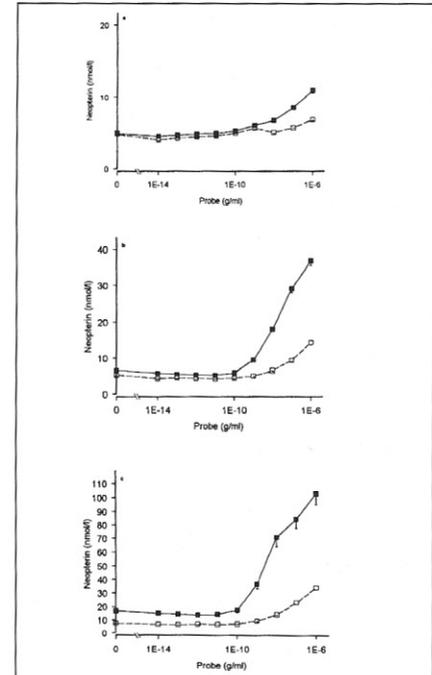
#### 3.1.2 Interferon-γ-Konzentration

Durch Kostimulation mit dem Zytokin IFN-γ konnte bei allen drei Zelllinien die Nachweisgrenze um ein bis zwei Zehnerpotenzen herabgesetzt werden. Während bei der humanen Zelllinie THP-1 eine Erhöhung der IFN-γ-Dosis von 25 auf 250 U/ml eine Sensitivitätssteigerung um weitere ein bis zwei Zehnerpotenzen bewirkte, konnten bei den murinen Zelllinien J774A.1 und RAW 264.7 hingegen nur erhöhte Nitritwerte bei gleichbleibender Sensitivität verzeichnet werden (Abb. 2).

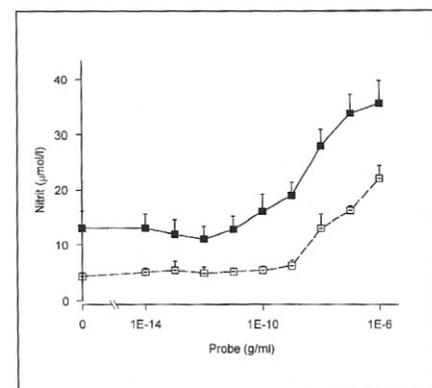
#### 3.1.3 L-Arginin-Konzentration

Da im Verlauf der Nitritbildung durch die murinen Makrophagen Stickstoffmonoxid (NO) aus L-Arg durch das Enzym NO-Synthase entsteht, das zu Nitrit weiterreagiert, wur-

de der Einfluß erhöhter Arg-Konzentrationen im Zellkulturmedium der murinen Zelllinien auf das Ergebnis des *in vitro* Pyrogenitätstest untersucht. Üblicherweise sind in den Zellkulturmedien DMEM und X-Vivo 20 0,4 mM L-Arg enthalten. Der Versuch wurde mit dieser, sowie der doppelten und dreifachen Dosis durchgeführt. Als Stimuli wurden 25 bzw. 250



**Abb. 1:** Einfluß verschiedener Inkubationszeiten (1a: 13 h, 1b: 21 h, 1c: 38 h) auf die Bildung von Neopterin in der humanen Monozytoma-Zelllinie THP-1 (kultiviert in *Ultraculture*) nach Kostimulation mit 250 U/ml humanem IFN-γ bzw. 25 U/ml IFN-γ und steigenden *E. coli* LPS Konzentrationen.



**Abb. 2:** Einfluß zweier IFN-g-Dosen (250 U/ml IFN-γ oder 25 U/ml IFN-γ) auf den Nachweis von *E. coli* LPS in der murinen Zelllinie J774A.1 (kultiviert in DMEM mit 10% FCS) nach 40-stündiger Inkubation.

U/ml mu IFN- $\gamma$  und *E. coli* LPS in den Konzentrationen  $10^{-6}$  bis  $10^{-14}$  g/ml eingesetzt. Die Nachweisgrenze lag bei beiden Zelllinien bei  $10^{-10}$  g/ml *E. coli* LPS und veränderte sich auch bei erhöhten Arg-Konzentrationen nicht (Abb. 3). Ebenso blieb die gebildete Nitritmenge gleich.

**3.1.4 Zelllinien und Zellkulturmedien – ein Vergleich der Sensitivität, Variabilität und Reproduzierbarkeit**

Um FCS als mögliche Quelle für pyrogene Verunreinigungen auszuschließen, wurde der Einsatz der serumfreien Medien *Ultraculture* und X-Vivo 20 ausgetestet. Während die Zelllinie THP-1 in *Ultraculture* ein gutes Wachstum und eine gute Stimulierbarkeit zeigte, eignete sich zur Kultivierung der murinen Zelllinien X-Vivo 20 besser. Der Vorteil dieser beiden Medien gegenüber dem früher verwendeten serumfreien AIMV ist, daß kein bovines Serumalbumin, das ebenfalls eine Kontaminationsquelle darstellt, zugesetzt werden muß.

Vergleicht man nun die drei Zelllinien und die verschiedenen Zellkulturmedien miteinander, so sieht man, daß sich das Wachstum der Zellen nur wenig unterscheidet bei der Verwendung von serumfreien und serumhaltigen Medien. So wächst die humane Zelllinie THP-1 gleich gut in RPMI/10% FCS wie in *Ultraculture*. Die murinen Zelllinien wachsen hingegen etwas besser unter serumhaltigen als unter serumfreien Bedingungen (Daten nicht gezeigt). Überlegen sind die serumhaltigen den serumfreien Medien insofern, als die Zellen bei zugesetztem FCS eine höhere Sensitivität gegenüber immunstimulatorischen Substanzen

aufweisen. Nur die Zelllinie RAW 264.7 im serumfreien Medium X-Vivo 20 ist ähnlich sensitiv wie die anderen Zellen in serumhaltigem Medium (Daten nicht gezeigt).

Die Werte der Nullkontrollen (Zellen in Zellkulturmedium, nur mit IFN- $\gamma$  stimuliert) und der Positivkontrollen (Zellen in Zellkulturmedium, mit *E. coli* LPS und IFN- $\gamma$  stimuliert) unterliegen bei allen Zelllinien mehr oder weniger starken Schwankungen. Es läßt sich jedoch bei keiner der Zelllinien außer J774A.1 in X-Vivo 20 eine Tendenz in Richtung niedrigerer Metabolitenmenge bei mehrwöchiger Kultivierungsdauer feststellen. Bei der Zelllinie J774A.1 nimmt allerdings nach etwa zehn Passagen die Fähigkeit nach Kostimulation durch IFN- $\gamma$  und *E. coli* LPS, Nitrit zu bilden, stark ab (Daten nicht gezeigt).

Die anderen Zelllinien zeigen gut reproduzierbare Ergebnisse bezüglich ihrer Detekti-

onlimits, nur der absolute Neopterin- bzw. Nitritgehalt ist relativ variabel (Abb. 4).

Aus den Ergebnissen dieser Optimierungsstudie läßt sich das unten abgebildete Standardprotokoll ableiten.

**3.2 Substanzen, die im LAL Test nicht oder nur schwer nachweisbar sind**

Die Austestung von hochgereinigten, kommerziell erhältlichen Zellwandkomponenten grampositiver und Mykobakterien und Exotoxinen von grampositiven Bakterien ergab, daß diese Substanzen in den meisten Fällen die Zellen nur in sehr hohen Dosen stimulieren können (Tab. 1), während die zell-freien Überstände diverser Patientenisolate von *S. aureus* bei einer Verdünnung von 1:2.500 und 1:250 die IFN- $\gamma$  kostimulierten Zellen zu einer sehr starken Neopterin- bzw. Nitritbildung anregten. Die Endotoxinbestimmung mittels LAL-Test

**Standardprotokoll**

	THP-1 (hochsensitives System)	RAW 264.7 (Screeningsystem)
<b>Zellkulturmedium</b>	RPMI 1640 mit 10% FCS	X-Vivo 20
<b>Zelldichte</b>	$2,5 \times 10^5$ pro Kavität in 100 $\mu$ l Medium	$2 \times 10^5$ pro Kavität in 100 $\mu$ l Medium
<b>IFN-<math>\gamma</math>-Dosis</b>	250 U/min in 10 $\mu$ l zusetzen	25 U/min in 10 $\mu$ l zusetzen
<b>Testkomponenten</b>	in 10 bis 40 $\mu$ l zusetzen	in 10 bis 40 $\mu$ l zusetzen
<b>Gesamtvolumen</b>	auf 250 $\mu$ l mit Medium auffüllen	auf 250 $\mu$ l mit Medium auffüllen
<b>Inkubation</b>	20 h bei 37° C und 5% CO <sub>2</sub>	20 h bei 37° C und 5% CO <sub>2</sub>
<b>Absammlung</b>	7 min bei 400 x g abzentrifugieren	7 min bei 400 x g abzentrifugieren
<b>Metabolitmessung</b>	150 $\mu$ l Überstand zur Neopterinmessung mittels ELISA	150 $\mu$ l Überstand zur Nitritmessung mittels Griess-Reaktion
<b>Zellproliferationsassay</b>	Zellen in verbleibenden 100 $\mu$ l	Zellen in verbleibenden 100 $\mu$ l

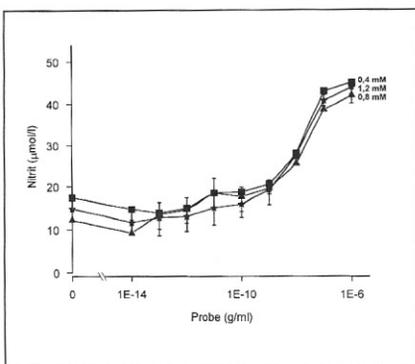


Abb. 3: Einfluß erhöhter L-Arginin-Konzentrationen (0,8 und 1,2 mM statt 0,4 mM) auf die Sensitivität und die Menge des gebildeten Nitrits, das nach Kostimulation mit 250 U/ml IFN- $\gamma$  und steigenden *E. coli* LPS Konzentrationen in der Zelllinie J774A.1 (kultiviert in DMEM mit 10% FCS) gebildet wird.

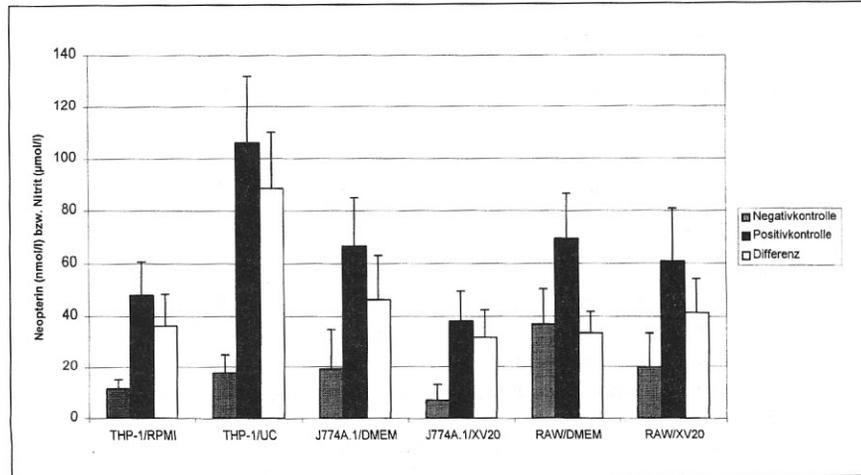


Abb. 4: Variabilität der Zelllinien in den diversen Zellkulturmedien. Dargestellt sind die Negativkontrolle (Zellen nur mit IFN- $\gamma$  stimuliert) und die Positivkontrolle (Zellen mit IFN- $\gamma$  und 1  $\mu$ g/ml *E. coli* LPS stimuliert), sowie die Differenz aus Positiv- und Negativkontrolle.

fiel für sieben der elf Proben negativ aus, einer zeigte leicht und drei zeigten stark erhöhte Endotoxinwerte (siehe Tab. 1).

Zur näheren Charakterisierung der immunstimulatorischen Substanzen in den Staphylokokken-Überständen wurde jener von *S. aureus* 652 für weitere Versuche ausgewählt. Durch verschiedene Methoden, wie Hitzedenaturierung (95° C, 10 min), TCA-Präzipitation (mit 1 MTCA, 30 min), Enzymverdau (Proteinase K und/oder DNase), Ausschlußfiltration („größer oder kleiner als 10 bzw. 30 kD“) und Gelfiltration können folgende Aussagen über die pyrogenen Substanzen im *S. aureus* 652 Überstand getroffen werden: Sie sind hitzestabil, durch TCA präzipitierbar, durch Proteinase K, nicht aber durch DNase inaktivierbar, und sie verursachen eine Immunstimulation innerhalb eines breiten Molekulargewichtsbereiches von <6,5 bis >66 kD, mit der höchsten immunstimulatorischen Aktivität bei etwa 65 kD, wie aus Abbildung 5 ersichtlich wird.

## 4 Diskussion

### 4.1 Optimierung des Zellkultursystems

Aufgrund der Erfahrungen mit den drei Zelllinien und den diversen Medien schlagen wir vor, die Zelllinie RAW 264.7, kultiviert und stimuliert in X-Vivo 20, als Pyrogenitäts-Screeningssystem zu verwenden. Diese Zelllinie detektiert Pyrogene sehr sensitiv und die Griess-Reaktion zum Nitritnachweis ist ein sehr einfaches, schnelles und zuverlässiges Detektionssystem. Stimuliert können die RAW 264.7 Zellen mit der niedrigeren Dosis von 25 U/ml mu IFN- $\gamma$  werden, da eine Erhöhung der IFN- $\gamma$ -Konzentration zu keiner weiteren Steigerung der Sensitivität mehr führt. Proben mit höherem L-Arg-Gehalt stellen keine Beeinträchtigung für das Nachweissystem dar, wie anhand erhöhter Arg-Konzentrationen im Zellkulturmedium festgestellt wurde (Abb. 3).

Als zweiter, noch sensitiverer Pyrogennachweis könnte die Neopterinmessung in der humanen Zelllinie THP-1, kultiviert und stimuliert in RPMI 1640/10% FCS, zur Anwendung kommen. Als Kostimulus müssen bei THP-1 250 U/ml hu IFN- $\gamma$  eingesetzt werden, um einen optimalen Pyrogennachweis zu erzielen. Neben der etwas besseren Sensitivität bieten THP-1 Zellen noch den Vorteil, Monozyten humanen Ursprungs zu sein, weshalb keine speziesspezifischen Unterschiede auftreten können. Aber auch die Zelllinie J774A.1 ist in der Lage, Pyrogene sehr sensitiv zu detektieren, allerdings nimmt bei J774A.1 nach etwa

**Tabelle 1: Minimale Dosis von Bakterienkomponenten grampositiver und Mykobakterien bzw. von *S. aureus* Kulturüberständen, die zu einem signifikanten Anstieg<sup>b</sup> der Neopterin- bzw. Nitritbildung bei Kostimulation durch 250 U/ml IFN- $\gamma$  führt bzw. im LAL-Test detektiert werden kann.**

Bakterienkomponenten <sup>a</sup>	Minimal detektierte Dosis (ng/ml) oder Verdünnungsfaktor						LAL Test <sup>c</sup>
	in vitro Pyrogenitätstest						
	THP-1		J774A.1		RAW 264.7		
	RPMI/FCS	UC	DMEM/FCS	X-Vivo 20	DMEM/FCS	X-Vivo 20	
<b>Zellwandkomponenten</b>							
Lipoteichonsäure ( <i>S. aureus</i> )	100	1.000	1	1.000	10.000	1.000	0,1
N-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin, adjuvant peptide ( <i>M. tuberculosis</i> )	100	0,001	1	100	100	100	0,4
6,6'-Di-O-mykolyol- $\alpha,\alpha$ -trehalose, cord factor ( <i>M. tuberculosis</i> )	1.000	1.000	1	1.000	1.000	1.000	0,1
<b>Exotoxine (<i>S. aureus</i>)</b>							
TSST-1 (Sigma)	100	1.000	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	1,3
TSST ICT)	>10.000	10.000	>10.000	>10.000	>10.000	>10.000	n.g.
Enterotoxin B	>10.000	>10.000	>1.000	>10.000	>10.000	>10.000	n.g.
<b>Patientenisolat</b>							
<i>S. aureus</i> 602	1:2.500	1:2.500	1:2.500	1:250	1:2.500	1:2.500	1,4
<i>S. aureus</i> 652	1:250	1:250	1:250	1:2.500	1:2.500	1:2.500	0,1
<i>S. aureus</i> 677	1:2.500	1:2.500	1:2.500	1:2.500	1:2.500	1:2.500	2,7
<i>S. aureus</i> 680	1:250	1:2.500	1:250	1:250	1:2.500	1:2.500	<0,1
<i>S. aureus</i> 696	1:250	1:250	1:250	1:2.500	1:2.500	1:2.500	0,1
<i>S. aureus</i> 709	1:25	1:250	1:250	1:2.500	1:2.500	1:2.500	0,1
<i>S. aureus</i> 712	1:2.500	1:2.500	1:2.500	1:2.500	1:2.500	1:2.500	<0,1
<i>S. aureus</i> 713	1:250	1:250	1:2.500	1:2.500	1:2.500	1:2.500	0,1
<i>S. aureus</i> 730	1:2.500	1:2.500	1:2.500	1:2.500	1:2.500	1:2.500	1,7
<i>S. aureus</i> 744	1:2.500	1:2.500	1:250	1:250	1:250	1:250	0,2
<i>S. aureus</i> 745	1:2.500	1:250	1:250	1:2.500	1:2.500	1:2.500	0,1

<sup>a</sup> Testkonzentration, 1 pg/ml bis 1  $\mu$ g/ml

<sup>b</sup> Signifikante Erhöhung ( $p < 0,05$ , Student's T-test, 4 unabhängige Messungen) der Metabolitenproduktion im Vergleich zum Zellkulturmedium oder IFN- $\gamma$  alleine

<sup>c</sup> Detektionslimit 0,1 EU/ml

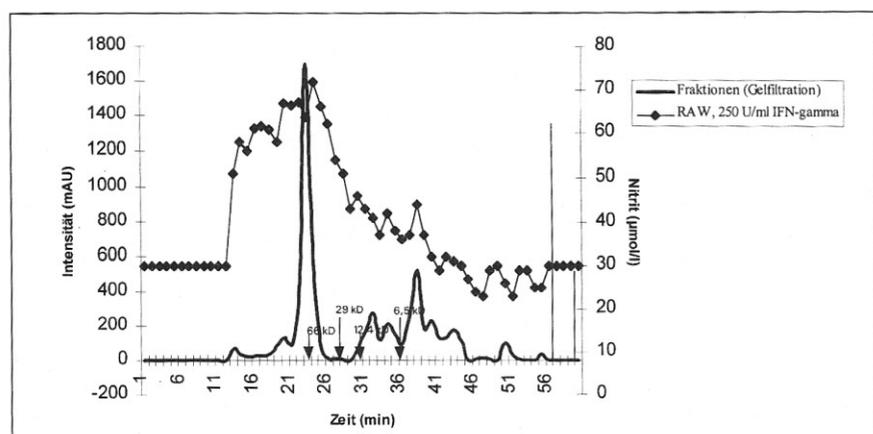
n.g. nicht getestet

zehn Passagen in serumfreiem X-Vivo 20 die Fähigkeit, Nitrit zu bilden, stark ab, weshalb wir uns für die beiden erstgenannten Detektionssysteme (RAW 264.7 in X-Vivo 20 und THP-1 in RPMI/10% FCS) entschieden haben.

Die Inkubationszeit kann auf 20 Stunden herabgesenkt werden, was einen guten Kom-

promiß zwischen möglichst geringem Zeitaufwand bei gleichzeitig hoher Sensitivität darstellt.

Der Vergleich mit anderen Parametern, nämlich der Messung der Produktion des Cytokins TNF- $\alpha$  als Antwort auf die Immunstimulation mit ausgewählten Proben ergab gut übereinstimmende Meßergebnisse. Deshalb kann



**Abb. 5: Auftrennung des *S. aureus* 652 Überstands durch Gelfiltration.**

Die aufgetrennten Fraktionen wurden anschließend im Zellkulturmodell auf ihre Fähigkeit, die Nitritproduktion in 250 U/ml mu IFN- $\gamma$ -kostimulierten RAW 264.7 Zellen zu induzieren, ausgetestet. Die Kultivierung und Stimulierung der Zellen erfolgte im serumfreien Zellkulturmedium X-Vivo 20.



die wesentlich einfachere und billigere Nitrit- bzw. Neopterinbestimmung statt der Cytokinmessung als Maß für die Stimulation von Immunzellen verwendet werden. Der Nachweis der Metaboliten Nitrit und Neopterin hat den Vorteil, daß diese Substanzen sehr stabil sind im Vergleich zu Cytokinen. Auch die Lagerung der Überstände bis zur Metabolitenmessung über mehrere Stunden bei Raumtemperatur sowie wiederholtes Einfrieren und Auftauen haben keinen Einfluß auf das Meßergebnis. Cytokine hingegen müssen sofort bestimmt oder ansonsten aliquotiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt werden.

#### 4.2 Substanzen, die im LAL Test nicht oder nur schwer nachweisbar sind

Da die gereinigten Zellwandkomponenten und Exotoxine von grampositiven und Mykobakterien die Zellen zu einer wesentlich schwächeren Immunreaktion anregten als die unbehandelten, zellfreien Überstände von Staphylokokken-Kulturen, ist es wahrscheinlich, daß es sich bei den pyrogenen Substanzen im Überstand des näher untersuchten *S. aureus* 652 Isolates nicht um eine der in der Tabelle genannten isolierten Bakterienkomponenten oder Exotoxine, sondern um ein bislang noch nicht näher definiertes aktives Molekül handelt. Es ist, wie bereits in 3.2, beschrieben, hitzestabil, durch TCA präzipitierbar, durch Proteinase K, nicht aber durch DNase inaktivierbar und stimuliert Immunzellen innerhalb eines weiten Molekulargewichtsbereiches von  $<6,5$  bis  $>66$  kD, mit der stärksten immunstimulatorischen Aktivität bei etwa 65 kD. Diese Charakteristika deuten darauf hin, daß es sich nicht um eine einzelne Substanz, die die Immunstimulation verursacht, sondern um ein Substanzgemisch mit einem hohen Proteinanteil handelt. Vergleicht man diese Daten mit jenen von der Arbeitsgruppe um Kusunoki und Wright, die ebenfalls *S. aureus* Material durch Gelfiltration aufgetrennt haben (allerdings nicht unbehandelte, zell-freie Kulturüberstände, sondern Phenolextraktionen von *S. aureus*, also proteinfreies Material), so zeigt sich, daß bei ihren Versuchen ebenfalls eine Immunstimulation über einen weiten Molekulargewichtsbereich stattfand, jedoch verursachten bei ihnen die Fraktionen  $>300$ , 150 und  $<15$  kD die stärkste Immunstimulation bei den Zellen, wobei bei den großen Molekülspezies die stärkere Aktivität zu bemerken war (Kusunoki and Wright, 1996). Die

Zellstimulation dürfte durch das aktive Molekül, das wahrscheinlich nicht-kovalent an die Peptidoglycanschicht von grampositiven Bakterien gebunden ist, bewirkt werden. Dieses ist möglicherweise ein Monomer  $<15$  kD, das Aggregate oder Micellen mit hohem Molekulargewicht bildet. Kusunoki und Wright vertreten die Hypothese, daß die gereinigten Zellwandkomponenten grampositiver Bakterien gar keine Immunstimulation verursachen können, sondern diese immer durch das nicht näher definierte aktive Molekül erfolgt, da dieses im Zuge der Isolierungsschritte nicht weggereinigt werden kann (Kusunoki and Wright, 1996). Diese Hypothese wäre auch mit unseren Ergebnissen vereinbar. Allerdings könnte die Abschwächung der immunstimulatorischen Aktivität des aktiven Moleküls durch Proteinase auch bedeuten, daß es sich bei unseren Versuchen tatsächlich um ein Protein oder Lipoprotein, etwa ein bisher noch nicht näher definiertes Toxin von *S. aureus* handelt. Durch die Proteinase könnten aber auch andere, für die Immunstimulation essentielle Strukturen angegriffen worden sein und nicht das Pyrogen selbst, das in diesem Falle ohne weiteres die von Kusunoki und Wright identifizierte aggregatbildende Lipidstruktur sein könnte.

Bei einem Vergleich mit dem LAL-Test (Tab. 1) zeigt sich, daß dieser Substanzen, die von grampositiven Bakterien stammen, nicht oder nur schwer erkennen kann und deshalb eine Lücke im Pyrogennachweis entsteht, die durch den Einsatz unseres Zellkulturmodells in Zukunft geschlossen werden könnte.

#### 5 Ausblick

Aus ethischen und ökonomischen Gründen wird nach Ersatzmethoden zu Tierversuchen gesucht. Im Falle des Kaninchen-Pyrogenitätstest sind bereits der LAL-Test und andere Methoden (siehe Eperon et al., 1997; Hartung et al., 1998; Werner-Felmayer et al., 1995) entwickelt worden. Der LAL-Test wird in einigen Fällen bereits als Alternative akzeptiert, muß aber im Einzelfall stets neu validiert werden. Deshalb wäre es wünschenswert, wenn die anderen Methoden einer unabhängigen Validierungsstudie unterzogen würden und die geeignetste in die Monographien der diversen Pharmakopoën aufgenommen würde, um so, als Ergänzung zum LAL-Test, dessen Unzulänglichkeiten

auszugleichen. Somit könnte der Kaninchen-Pyrogenitätstest vollständig ersetzt bzw. dessen Anwendungsgebiet minimiert werden.

#### Literatur

- Eperon, S., DeGroote, D., Werner-Felmayer, G. and Jungi, T. W. (1997). Human monocyte cell lines as indicators of endotoxin: comparison with rabbit pyrogen and Limulus amoebocyte lysate assay. *J Immunol Methods* 207 (2): 135-145.
- Hartung, T. und Wendel, A. (1995). Die Erfassung von Pyrogenen in einem humanen Vollblutmodell. *ALTEX* 12, 70-75.
- Hartung, T., Fennrich, S., Fischer, M., Montag-Lessing, T. und Wendel, A. (1998). Entwicklung und Evaluierung eines Pyrogentests mit menschlichem Blut. *ALTEX* 15 (Suppl.), 9-10.
- Kusunoki, T. and Wright, S. D. (1996). Chemical characteristics of Staphylococcus aureus molecules that have CD-14-dependent cell-stimulating activity. *J Immunol.* 157 (11), 5112-5117.
- Werner, E. R., Werner-Felmayer, G. and Mayer, B. (1998). Tetrahydrobiopterin, Cytokines and Nitric Oxide. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 219, 171-182.
- Werner-Felmayer, G., Baier-Bitterlich, G., Fuchs, D., Hausen, A., Murr, C., Reibnegger, G., Werner, E. R. and Wachter, H. (1995). Detection of Bacterial Pyrogens on the Basis of their Effects on Gamma Interferon-Mediated Formation of Neopterin or Nitrite in Cultured Monocyte Cell Lines. *Clin and Diagn Lab Immunol.* 2: 307-313.

#### Danksagung

Wir bedanken uns für die Unterstützung durch das Österreichische Bundesministerium für Wissenschaft und Verkehr.

#### Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Gabriele Werner-Felmayer  
 Institut für Medizinische  
 Chemie und Biochemie  
 Universität Innsbruck  
 Fritz-Pregl-Str. 3  
 A-6020 Innsbruck  
 Tel: +43-512-507-3518  
 Fax: +43-512-507-2865

