



*Summary: Development of a pyrogen test based on rabbit blood*

The testing of drugs for pyrogen contamination e.g. the exclusion of fever inducing impurities, was standardised in the Forties in the form of animal pyrogen assay. We recently proposed an alternative method using human whole blood from healthy donors. The substances to be tested are incubated in the presence of blood and the generation of endogenous pyrogens (Interleukin 1, IL-1) are measured reflecting the primary fever reaction in man. With this method it is possible to detect the reaction of the relevant species. However, pronounced differences were reported for the potency of several bacterial pyrogens in different species (e.g. up to factor 10.000 for an individual endotoxin in different mammals). As a part of the validation of the new method discrepancies between the whole blood system and the rabbit test might occur. In these cases it is not possible to distinguish between an in-vitro-artefact and species differences.

Therefore, the goal of this project is the development of an in-vitro-test based on rabbit blood. For this purpose rabbit IL-1 was expressed. At present chickens and mice are immunized and possibly crossreacting anti-human-IL-1-antibodies are tested. In this way, an ELISA for the rabbit cytokin will be established. Using a temporarily commercially available rabbit TNF-ELISA, the feasibility of the test-system could

already be shown: Pyrogens induced the generation of TNF in rabbit blood. In the human model, the endpoints IL-1 and TNF were very similar. The sensitivity of human blood and rabbit blood appeared to be very similar. However, individual pyrogens (only different endotoxins were tested up to now) showed considerable deviations. However, these results require the verification in the final test.

The rabbit test in preparation will be implemented immediately into the ongoing evaluations by the Paul-Ehrlich-Institute (BMBF) and at the University of Heidelberg (European Pharmacopoea). Furthermore, such a test also represents an interesting alternative in the veterinarian medical field using the correct target species for pyrogenicity testing. This project was supported by the Foundation Research 3R, CH-Muensingen.

**Keywords:** pyrogen test, rabbit whole blood, interleukin-1, target species

**Korrespondenzadresse**

Dr. Dr. Thomas Hartung  
Universität Konstanz  
Biochemische Pharmakologie  
Postfach 5560  
D-78434 Konstanz



## Entwicklung von molekularbiologischen Alternativmethoden für die Prüfung von Poliomyelitis-Impfstoffen

Artur Kaul, Micha Nübling, Martina Kempfer, Ivo Schmidt und Johannes Löwer  
Paul-Ehrlich-Institut, D-Langen

**Zusammenfassung**

In jeder neu produzierten Charge des Poliovirus-Lebendimpfstoffes befinden sich neben attenuierten auch geringe Mengen an Wildtypviren. Impfstoffchargen, deren Wildtypvirusanteil einen bestimmten Grenzwert übersteigt, sind mit dem Risiko behaftet, bisweilen bei Empfängern eine impfassoziierte Poliomyelitis auszulösen. Um über möglichst sichere Poliolebensdimpfstoffe zu verfügen, wird jede neu produzierte Impfstoffcharge im Tierversuch an Affen im Neurovirulenztest überprüft. Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, daß für den attenuierten Charakter eines Virusisolates hauptsächlich eine bestimmte Punktmutation auf dem Poliogenom verantwortlich ist.

Wir entwickelten eine quantitative PCR-(Polimerase Chain Reaction) Methode, mit deren Hilfe der Wildtypanteil der Position 472 des Polioserotyp 3 Genoms bestimmt werden kann. Damit stellt diese Methode bei der Prüfung von monovalenten Lebendimpfstoffen eine mögliche Alternative gegenüber dem Neurovirulenztest an Affen dar.

*Summary: Development of an alternative method to the monkey neurovirulence test for oral poliovirus vaccines*

Each oral poliovirus vaccine lot contains attenuated and small amounts of wildtype viruses. Vaccines containing more than a certain limit of wildtype viruses may cause a vaccine associated poliomyelitis. To provide safe vaccines for humans, each newly manufactured vaccine lot is tested in the monkey neurovirulence test. A certain point mutation on the poliovirus genome has been shown to be responsible for the attenuated phenotype of the vaccine virus.

We developed a quantitative PCR method to determine the wildtype proportion at position 472 of poliovirus type 3 genome. This method possibly can be used as an alternative for the monkey neurovirulence test.

**Keywords:** quantitative polymerase chain reaction, oral poliovirus vaccine, monkey neurovirulence test, vaccine associated poliomyelitis, point mutations

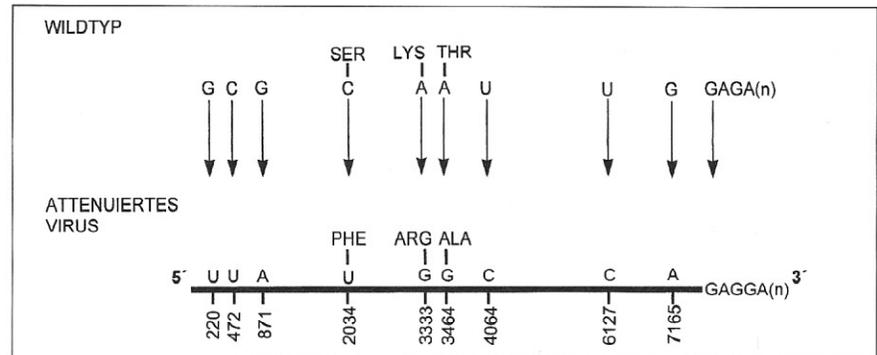
## 1 Einleitung

Die Infektion mit dem humanpathogenen Poliovirus verläuft in den überwiegenden Fällen inapparent. Selten kommt es jedoch zu paralytischen Erscheinungen verschiedener Schweregrade bis hin zur Poliomyelitis (Kinderlähmung).

In den späten 50er Jahren dieses Jahrhunderts gelang es Sabin, für die drei existierenden Poliovirusserotypen aus Wildtypisolaten durch deren Passage in Affen bzw. auf Affenzelllinien abgeschwächte (attenuierte) Impfstämme zu erhalten (Sabin and Boulger, 1973). Die so hergestellten Virusstämme dienen auch heute noch als Saatvirus bei der Produktion von Lebendimpfstoffen.

Da bei der Herstellung von monovalenten Impfstoffen neben den abgeschwächten Viren auch Wildtypen entstehen, deren Menge oft nicht beeinflussbar ist, wird derzeit jede neu produzierte Impfstoffcharge im sogenannten Neurovirulenztest im Tierversuch an Affen (z.B. Makakken) überprüft. Dabei verursachen Wildtypviren bei Affen schon in geringen Mengen Lähmungen durch Zerstörung von Nervenzellen. Attenuierte Stämme rufen hingegen keine histologischen Veränderungen hervor.

Die Überprüfung neu produzierter Impfstoffchargen wird für die Polioerotypen 1 und 2 an mindestens 22 und für den Typ 3 an mindestens 38 Tieren getestet (World Health Organization, 1990). Zwei bis drei Wochen nach der intraspinalen Impfstoffverabreichung werden die Tiere euthanasiert und Rückenmark- bzw. Gehirnschnitte aus unterschiedlichen Regionen auf das Ausmaß von Neuronenzerstörung untersucht (World Health Organization, 1990). Im Parallelansatz werden Affen einer Vergleichsgruppe mit unbedenklichem Impfstoff behandelt. Die in den Impfstoffen enthaltenen attenuierten Virusstämme unterscheiden sich gegenüber den Wildtypisolaten durch eine Anzahl von Punktmutationen, die über das gesamte Virusgenom verstreut sind (Abb. 1). Eine entscheidende Rolle für den attenuierten Charakter aller drei Sabinserotypen kommt einer Punktmutation in der Domäne V der 5' NTR (5' Nicht Translatierte Region) zu. Beim Serotyp Sabin 3 befindet sich diese Punktmutation an der Position 472 des Genoms und führt zum Nukleotid austausch Zytosin zu Uracil (Svitkin et al.,



**Abbildung 1: Unterschiede in der Nukleinsäuresequenz zwischen Wildtyp (oberer Teil der Abbildung) und dem attenuierten Virus (unterer Teil der Abbildung) des Polioerotyps 3.**

**An drei Stellen unterscheiden sich die beiden Virusstämme zusätzlich in ihrer Aminosäuresequenz. Die unterschiedlichen Aminosäuren sind über den entsprechenden Nukleotiden dargestellt.**

1990; Westrop et al., 1989). Analoge Punktmutationen sind bei den Serotypen 1 am Nukleotid 480 und beim Serotyp 2 an Position 481 zu finden (Christodoulou et al., 1990; Kawamura et al., 1989; Moos et al., 1989).

Es besteht beim Serotyp 3 eine signifikante Korrelation zwischen dem Virusanteil mit dem Wildtypnukleotid Zytosin an Position 472 und den Ergebnissen des Neurovirulenztests. So bestehen Impfstoffchargen mit einem Wildtypanteil über 1% den Neurovirulenztest nicht (Chumakov et al., 1991).

Das Ziel unserer Untersuchungen ist die Etablierung der Taq Man PCR zum quantitativen Nachweis von „Uracil zu Zytosin“-Revertanten an der Nukleotidposition 472 des Polioerotyp 3-Genoms. Die Methode kann dabei zum „Vorscreenen“ von monovalenten Impfstoffpräparationen des Serotyps 3 verwendet werden, so daß zumindest Präparationen mit einem zu hohen Wildtypanteil nicht mehr im tierbelastenden Neurovirulenztest eingesetzt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Allgemeines Prinzip der Taq Man PCR

Das Grundprinzip der Taq Man PCR ist zunächst das gleiche wie bei der herkömmlichen PCR; zusätzlich zu den Primern wird hier jedoch eine fluorogene Oligonukleotid-Sonde eingesetzt, die innerhalb des Amplifikates bindet. Die Sonde ist am 5'-Ende mit dem Reporter-Farbstoff 6-Carboxy-Fluorescein (FAM) und am 3'-Ende mit dem Quencher-Farbstoff

6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin (TAMRA) markiert.

Wird nun der Reporter-Farbstoff mit der Lichtwellenlänge von 488 nm angeregt, so wird seine Fluoreszenz aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher (die Emissionswellenlänge des Quencher liegt bei 582 nm) durch einen Fluoreszenz-Energietransfer unterdrückt (Förster, 1948). Hybridisiert die Sonde dagegen während des Primer-Sonden-Annealings der PCR mit dem DNA-Template-Strang, so wird sie bei der DNA-Synthese aufgrund der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq DNA Polymerase zunächst von der DNA-Matrize entfernt und anschließend gespalten. Dadurch wird die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher aufgehoben und damit auch der Fluoreszenz-Energietransfer. Durch den Wegfall des Fluoreszenz-Energietransfers bildet der Reporter eine Eigenemission bei 518 nm aus. Entsprechend der Syntheserate des PCR-Produkts steigt die Fluoreszenz des Reporters mit jedem PCR-Zyklus, die vom ABI PRISM™ 7700 (Applied Biosystems) erfasst wird. Damit kann die Amplifikatmenge im Verlauf der PCR exakt bestimmt werden.

### 2.2 Primer- und Sondenwahl für den quantitativen Wildtypnachweis

Beim quantitativen Nachweis von Wildtypanteilen in Polio-Lebendimpfstoffen des Serotyps 3 mit Hilfe der Taq Man PCR wurden die Sonde und der sense Primer so gewählt, daß diese sowohl zu attenuierten als auch zu Wildtypvirus-Sequenzen eine 100%-ige Komplementarität zeigen. Weiterhin wurde ein antisense Primer synthet-

tisiert, dessen direktes 3'-Ende mit der Position 472 des Polio-Genoms abschloß. Dieser antisense Primer hatte zum Wildtypgenom eine 100%-ige Komplementarität und bildete mit Sequenzen des attenuierten Virus eine Fehlpaarung (*Mismatch*) mit der 3'-Base. Ein weiterer antisense Primer kann nicht zwischen den Virussequenzen diskriminieren und wird zur Bestimmung der Polio-RNA Menge verwendet.

### 2.3 Standards

Zwei Serotyp 3 Vollängenklone mit der Wildtyp- bzw. der attenuierten Sequenz dienten zur Herstellung von Standardproben. Die verwendeten Standards enthielten 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2 und 1,4% Genomanteile mit der Wildtypsequenz.

### 2.4 Versuchsdurchführung und

#### Auswertung

Sowohl die Standardproben als auch die zu testenden Impfstoffproben wurden in getrennten Ansätzen mit Hilfe beider antisense Primer amplifiziert. Anschließend wurde für jede Probe der DCt-Wert gebildet. Der DCt-Wert ist die Differenz aus den *Threshold Cycles* (Ct) von Amplifikationen einer Probe mit dem einen oder dem anderen antisense Primer. Der Ct-Wert ist jener PCR-Zyklus, bei dem die Reporter-Fluoreszenz einen bestimmten Schwellenwert erreicht. Über die graphische Darstellung der DCt-Werte gegenüber den Wildtypanteilen der Standards konnte für diese Proben ein Regressionsverlauf erstellt werden. Der Wildtypanteil unbekannter Proben konnte aus der Formel der Regressionskurve ermittelt werden.

### 2.5 Verwendete Materialien und Proben

0,45 ml der Proben wurden in Anwesenheit von 0,05 ml 10% SDS mit 0,5 ml Phenol extrahiert und über Nacht bei -20°C mit dem doppelten Volumen Isopropanol gefällt, davon wurden 0,3 ml mit 70% Ethanol gewaschen. Das Virus-RNA-Pellet wurde mittels MuLV-RT und *Random priming revers* transkribiert (*Applied Biosystems*).

Die cDNAs aus der reversen Transkription und die Standardproben wurden mit dem Taq Man PCR Core Reagent Kits™ (*Applied Biosystems*) im Taq Man PCR Assay nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

## 3 Ergebnisse

Anhand von Standardproben, die verschiedene Mischungsverhältnisse zwischen Wildtyp- und attenuierten Virussequenzen darstellten, konnten wir den Wildtypanteil diverser Proben mit der Taq Man PCR bestimmen. Der Wildtypanteil eines Teils der Proben wurde bereits früher im MAPREC-Ringversuch auf 1,12; 0,67 und 0,4% bestimmt. Die Wildtypanteile dieser in einer unabhängigen Methode bereits charakterisierten Proben konnten mit der Taq Man PCR Methode bestätigt werden.

## 4 Diskussion

Aus den ersten Untersuchungsergebnissen mit der Taq Man PCR zeichnet sich ab, daß Proben mit einem Wildtypanteil zwischen 0,2 und 1,4% (untersuchter Bereich) gut quantifiziert werden können.

In noch ausstehenden Versuchen soll die Reproduzierbarkeit dieser Methode an einer größeren Zahl von Impfstoffchargen des Serotyps 3 überprüft werden. Der Wildtypanteil dieser Proben ist bereits bzw. wird noch mit der von Chumakov et al., 1991 beschriebenen MAPREC Methode bestimmt.

Zudem sollen in weiteren Versuchen die Inter- und Intra-Assayvariabilität der Taq Man PCR Methode bestimmt werden.

Nach der Etablierung der Taq Man PCR für die monovalenten Impfstoffchargen des Serotyps 3 kann diese Methode prinzipiell auch auf die Typen 1 und 2 übertragen werden. Dabei sollen beim Serotyp 1 neben den Revertanten an der Position 480 auch die des Nukleotids 525 mit berücksichtigt werden, da sie am neurovirulenten Verhalten eines Virusisolats mitbeteiligt sind (Christodoulou et al., 1990; Li et al., 1996).

Die Taq Man PCR Methode ist zum Voruntersuchen von neu produzierten monovalenten Impfstoffchargen gut geeignet. Bei der Durchführung dieses molekularbiologischen Ansatzes können Impfstoffchargen mit einem deutlich erhöhten Wildtypanteil (über 1%) von vornherein dem Neurovirulenztest entzogen werden. Impfstoffchargen, die in der quantitativen Taq Man PCR unauffällig sind, müssten jedoch weiterhin den Tierversuch durchlaufen, um das mögliche Restrisiko einer impfassozierten Poliomyelitis beim Menschen weiter zu minimieren.

## Literatur

- Christodoulou, C., Colbere-Garapin, F., Macadam, A., Taffs, L. F., Marsden, S., Minor, P. and Horaud, F. (1990). Mapping of mutations associated with neurovirulence in monkeys infected with Sabin 1 poliovirus revertants selected at high temperature. *J. Virol.* 64, 4922-4929.
- Chumakov, K. M., Powers, L. B., Noonan, K. E., Roninson, I. B. and Levenbook, I. S. (1991). Correlation between amount of virus with altered nucleotide sequence and the monkey test for acceptability of oral poliovirus vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 199-203.
- Förster, T. (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* 2, 55-75.
- Li, J., Zhang, L. B., Yoneyama, T., Yoshida, H., Shimizu, H., Yoshii, K., Hara, M., Nomura, T., Yoshikura, H., Miyamura, T. and Hagiwara, A. (1996). Genetic basis of the neurovirulence of type 1 polioviruses isolated from vaccine-associated paralytic patients. *Arch. Virol.* 141, 1047-1054.
- Kawamura, N., Kohara, M., Abe, S., Komatsu, T., Tago, K., Arita, M. and Nomoto, A. (1989). Determinants in the 5' noncoding region of poliovirus Sabin 1 RNA that influence the attenuation phenotype. *J. Virol.* 63, 1302-1309.
- Moos, E. G., O'Neill, R. E. and Racaniello, V. R. (1989). Mapping of attenuating sequences of an avirulent poliovirus type 2 strain. *J. Virol.* 63, 1884-1890.
- Sabin, A. B. and Boulger, L. R. (1973). History of Sabin attenuated poliovirus oral live vaccine strains. *J. Biol. Stand.* 1, 115-118.
- Svitkin, Y. V., Cammack, N., Minor, P. D. and Almond, J. W. (1990). Translation deficiency of the Sabin type 3 poliovirus genome: Association with an attenuating mutation C<sub>472</sub> U. *Virology* 175, 103-109.
- Westrop, G. D., Wareham, K. A., Evans, D. M. A., Dunn, G., Minor, P. D., Magrath, D. I., Taffs, F., Marsden, S., Skinner, M. A., Schild, G. C. and Almond, J. W. (1989). Genetic basis of attenuation of the Sabin type 3 oral poliovirus vaccine. *J. Virol.* 63, 1338-1344.
- World Health Organization. (1990). Requirements for poliomyelitis vaccine (oral). *WHO Tech. Rep. Ser.* 800, 30-65.

## Korrespondenzadresse

Dipl.-Biol. Artur Kaul  
Paul-Ehrlich-Institut,  
Abteilung Virologie  
Paul-Ehrlich-Str. 51-59  
D-63225 Langen  
Tel.: +49-6103-773300  
Fax: +49-6103-77123  
E-mail: Kaul@em.uni-frankfurt.de