

# Ersatz des Neurovirulenztests (NVT) an Primaten zur Sicherheitsprüfung von Polioimpfviruschargen: *In vitro* Methode „MAPREC-Test“

Volker Dörsam<sup>1</sup>, Andreas Schmeel<sup>1</sup>, Konstantin Chumakov<sup>2</sup> und Mathias R. Fibi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Chiron-Behring GmbH & Co. D-3 Marburg

<sup>2</sup>FDA/CBER, Rockville, USA

## Zusammenfassung

Zur Sicherheitsprüfung und Freigabe von Polioimpfviruschargen ist von nationalen und internationalen Behörden der Neurovirulenztest am Affen (NVT) vorgeschrieben. Dieser Test ist extrem teuer, zeitaufwendig und verwendet sozial sensitive Primaten. Durchgeführte Untersuchungen lassen darauf schließen, daß das Auftreten bestimmter Mutationen im Impfvirusgenom mit dem Auftreten von Neurovirulenz im Affenneurovirulenztest korreliert. Für Typ I sind dies die Mutationen 480 G → A und 525 U → A, für Typ II die Mutation 481 G → A und für Typ III die Mutation 472 U → A. Die von Chumakov et al (FDA) entwickelte *in vitro* Methode „MAPREC“ (Mutation Analysis by PCR and Restriction Enzyme Cleavage) ist der bisher einzige molekularbiologische Test, der für die relative Quantifizierung dieser Mutationen geeignet ist. Parallel durchgeführte Untersuchungen von Typ III Impfstoffchargen im Affen-Neurovirulenztest (NVT) und MAPREC zeigen, daß Chargen mit einer Mutationsrate von ≥ 0.9% gegenüber der Referenz signifikant erhöhte Läsionen im Rückenmark von Affen verursachen und folglich den NVT nicht bestehen. Für die Typen I und II konnte ein solcher Grenzwert bisher nicht klar definiert werden.

Der MAPREC-Test analysiert jeweils nur ein einziges Nukleotid. Da aber auch andere, bisher noch unbekannt oder wenig untersuchte Mutationen das Neurovirulenzpotential des Impfvirus beeinflussen können, ist der NVT, der das gesamte Virusgenom erfaßt, bisher nicht zu ersetzen. Mit dem MAPREC-Test kann jedoch durch Bestimmung der Reversionsrate die Konsistenz bestehender Produktionsbedingungen überprüft sowie im Zuge von Optimierungsmaßnahmen der Einfluß veränderter Produktionsbedingungen auf die Reversionsrate beurteilt werden.

Sollte es sich in weiteren Untersuchungen zeigen, daß die Voraussagen der MAPREC Ergebnisse im Hinblick auf die Neurovirulenz beim Affen hinreichend sicher sind, wäre dieser *in vitro* Test eine echte Alternative zum Tierversuch.

**Summary:** Alternative for the neurovirulence test (NVT) in primates for safety-testing of poliomyelitis attenuated life virus vaccine (Sabin): *in vitro* test MAPREC

For safety testing and release for attenuated oral poliomyelitis virus (OPV) vaccine lots, national and international authorities require the *in vivo* neurovirulence test (NVT). This test is

*extremely expensive, time consuming and is carried out in socially sensitive monkeys. In this test the test vaccine is injected into the spinal chord of monkeys and the mean lesion score of neurovirulence is evaluated and compared to that of a reference vaccine. If the test vaccine is not significantly different from the reference, the vaccine passes the test.*

Data from several investigations suggest that the accumulation of distinct reversion in a vaccine lot correlate with an increased mean lesion score of neurovirulence in the monkey test, and thus are the *causa sine qua non* of reversion of attenuation to wild type. The relevant reversion are for serotype 1, 480 G to A and 525 U to C, for serotype 2, 481 A to G, and for serotype 3, 472 U to C. To quantify these reversion on a relative basis *in vitro*, the MAPREC test (Mutation Analysis by PCR and Restriction Enzyme Cleavage), developed by Chumakov et al. (FDA), seems to be the only suitable test. For serotype 3 it could be demonstrated, that vaccine lots failing the NVT comprise a reversion rate ≥ 0.9%. For serotypes 1 and 2 such a limit could not yet clearly be defined. MAPREC quantifies only single mutations, which have been shown to be important for neurovirulence. There is a possibility, however, that also other mutations/reversions, not yet identified, could principally contribute to neurovirulence, but would not be detected by MAPREC. Therefore, at date, there is no scientific basis to replace the monkey NVT by MAPREC. However, MAPREC can be used to check the consistence of reversion rates in vaccine lots under current production conditions, and the impact of changed production conditions on the reversion rates, and thus can be used to get more and more experience.

It further ongoing studies and analyses of manufacturers and national and international control laboratories will show that the predictions of the MAPREC results on the outcome of the monkey NVT are sufficiently safe, this *in vitro* test would be an excellent alternative for the monkey test.

**Keywords:** monkey neurovirulence test, reversion of attenuation, alternative *in vitro* method

## Korrespondenzadresse

Dipl. Chem. Volker Dörsam  
Chiron-Behring GmbH & Co  
D-35041 Marburg