

Zytokinfreisetzung nach Applikation endotoxinhaltiger Impfstoffe

Martina Ecker, Günter Müller

Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, D-Jena

Zusammenfassung

Endotoxine gram-negativer Bakterien sind als starke Auslöser für die Bildung und Freisetzung von Zytokinen, wie Tumornekrosefaktor (TNF) und Interleukin 6 (IL-6), bekannt. Der Gehalt dieser proinflammatorischen Mediatoren im Plasma von Patienten mit akuten Infektionen oder einer Sepsis korreliert mit dem Verlauf und der Prognose der Erkrankung (Hack et al., 1989; Rigato, 1996). Im Zusammenhang mit Impfstoffchargenprüfungen bestimmen wir die Freisetzung und Kinetik von TNF und IL-6 bei Schweinen nach Immunisierung mit verschiedenen endotoxinhaltigen Impfstoffen. Die bisherigen Ergebnisse zeigen, daß die Gehalte beider Zytokine mit steigender Endotoxinkonzentration pro applizierter Dosis zunehmen. TNF erreicht eine Stunde p.appl. Maximalgehalte im Plasma, IL-6 in einem Zeitraum von zwei bis vier Stunden nach der Applikation. Ein Geschlechtseinfluß auf die Zytokinfreisetzung konnte bisher nicht festgestellt werden, dagegen deutet sich ein Einfluß des Körpergewichtes an. Die Erfassung der TNF- und IL-6-Veränderungen im Plasma der geimpften Tiere stellt ein sensibles Instrument zur Bewertung systemischer Reaktionen dar und unterstützt die im Rahmen unseres Projektes erhobenen klinischen und hämodynamischen Parameter.

Summary: Cytokine release after administration of endotoxin containing vaccines

Endotoxins from gram negative bacteria are known to be potent inducers for the synthesis and the release of cytokines such as tumour necrosis factor (TNF) and interleukin 6 (IL-6). The amount of these proinflammatory mediators in plasma from animals and human patients suffering of an acute infection or sepsis, however, is well correlated with the outcome and the prognosis of such diseases (Hack et al., 1989; Ostermann et al., 1997; Rigato, 1996). In connection with regular testing of vaccine lots we determine the release and the kinetic of TNF and IL-6 in piglets after immunisation with different vaccines containing endotoxin. The current results suggest that the amounts of both cytokines increased with elevated endotoxin concentration given with the doses. TNF peaked in plasma after one hour, IL-6 peaked between two and four hours p.appl.. We did not find any influence of the gender of the animals. In contrast, the body weight seems to affect the cytokine release in different ways. Determination of cytokine changes in plasma is a sensitive tool for the evaluation of systemic reactions and supports data about the clinical and haematological signs.

Keywords: vaccines, TNF, interleukin 6, swine

1 Einleitung und Zielstellung

Endotoxin ist ein Bestandteil der äußeren Zellmembran gram-negativer Bakterien. Gelangt es im Zuge einer bakteriellen Infektion in die Zirkulation, kommt es zu den bekannten pathophysiologischen Veränderungen, wie Fieber, Blutdruckabfall, Erbrechen, disseminierte intravasale Blutgerinnung (DIG) etc. sowie in sehr hohen Konzentrationen zum septischen Schock oder Tod des erkrankten Individuums. Diese Wirkungen werden auf den Lipid A-Anteil, der in der äußeren Zellmembran gram-negativer Bakterien verankert ist, zurückgeführt. (Holst et al., 1996; Rietschel et al., 1996). Die immunstimulierenden Eigenschaften, d.h. die Antigenität des Endotoxins, wird durch die O-Seitenkette vermittelt. Diese besteht aus Oligosaccharideinheiten, deren Art und Anzahl für das jeweilige Endotoxin verschiedener Bak-

terienarten charakteristisch ist und die Bildung spezifischer Antikörper vermittelt (Rietschel und Brade, 1993; Rietschel et al., 1996).

Im Organismus werden zahlreiche Zellsysteme nach Endotoxinkontakt aktiviert, d.h. zur Phagozytose, Proliferation/Differenzierung oder zur Bildung und Freisetzung von Mediatoren angeregt. Im Vordergrund stehen hierbei Monozyten und Makrophagen, polymorphkernige Leukozyten und Lymphozyten (Holst et al., 1996). Unter den Mediatoren sind insbesondere der Tumornekrosefaktor (TNF) und Interleukin 6 (IL-6), darüber hinaus auch andere Zytokine von Bedeutung, wie beispielsweise Interleukin 1, Interferon- γ u.a.. TNF ist bereits innerhalb von dreißig Minuten im Plasma nach Endotoxinapplikation beim Kaninchen (Fong und Lowry, 1990) nachweisbar. Maximale Gehalte werden in einem Zeitraum von ein bis zwei

Stunden p. appl. erreicht und die Ausgangswerte wieder nach sechs bis acht Stunden (Webel et al., 1996). Die Halbwertszeit von TNF in der Zirkulation ist sehr kurz und wird mit wenigen Minuten angegeben (Tracey und Cerami, 1993). TNF induziert an verschiedenen Zellsystemen die Bildung zahlreicher Mediatoren. Zu seinen Hauptwirkungen zählen die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten, wodurch beispielsweise deren Enzymbildung sowie ihre Migration zum Entzündungsherd gesteigert wird, ferner die Aktivierung der Hämatopoese im Knochenmark und der Bildung von Akut-Phase-Proteinen in der Leber.

IL-6 erreicht nach Endotoxinapplikation nach vier bis sechs Stunden maximale Gehalte im Plasma und nach vierundzwanzig Stunden wieder Ausgangswerte (Webel et al., 1996). Zu den Hauptwirkungen zählen neben der Aktivierung der Bildung

von Akut-Phase-Proteinen in der Leber, die Induktion der Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen (Scamurra et al., 1996).

Die Ausschüttung beider Zytokine erfolgt dosisabhängig von der verabreichten Endotoxinkonzentration und dem Applikationsweg. Außerdem stehen die Zytokinkonzentrationen in Bezug zum Ausmaß der klinischen Veränderungen. Verschiedene Autoren messen den TNF- und IL-6-Gehalten bei Patienten mit Sepsis prognostischen Wert bei (Rigato et al., 1996; Ostermann et al., 1997).

Im Rahmen unseres 3 R-Projektes mit dem Paul-Ehrlich-Institut (PEI) in Langen und dem Institut für Viruskrankheiten und Immunprophylaxe (IVI) in Mittelhäusern (Schweiz) sollte überprüft werden, inwieweit diese Aussage auch nach Applikation endotoxinhaltiger Impfstoffe bei Schweinen zutrifft. Nach den Vorgaben für die Impfstoffchargenprüfung wurden hierzu Endotoxingehalt der Vakzinen, klinische und hämatologische Veränderungen der Impflinge bzw. der Kontrolltiere erfaßt (PEI, IVI). In unserem Labor wurden die Plasmagehalte an Tumornekrosefaktor und Interleukin 6 bestimmt.

2 Material und Methoden

2.1 Plasmaproben

Das untersuchte Plasma stammt aus heparinisierten Blutproben, die zum Zeitpunkt 0 h (= unmittelbar vor der Immunisierung) sowie nach 1, 2, 4, 6, 24 und 48 Stunden gewonnen wurden. Das Blut (Antikoagulant: 25 IE Heparin/ml Blut) wurde unmittelbar nach der Immunisierung bei 4° C mit 3.000 U/min. zentrifugiert, in sterile Kryotubes (NALGENE) portioniert und bis zur Bestimmung bei -80° C gelagert.

2.2 TNF-ELISA

Die Plasmaproben wurden entsprechend den Herstellerangaben (Pig ELISAä, Fa. ENDOGEN) durchgeführt. Die Messungen erfolgen jeweils mit Hilfe eines ELISA-Readers (SPECTRAFLOW) bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzfilter 550 nm) und die Berechnung der Konzentrationen mittels Software der Firma TECAN (easyWIN fitting V4.0a). Die resultierenden Ergebnisse stellen die Mittelwerte aus der Doppelbestimmung der Plasmaproben dar.

2.3 Interleukin 6-Bioassay

Die IL-6-Gehalte wurden anhand der murinen Hybridomazelllinie 7TD1 ermittelt. Plasma wird in Verdünnungsstufen von 1:40 und 1:120 eingesetzt und der murine rekombinante IL6-Standard (Item # 1726-01, lot#: B41328; GENZYME Diagnostics) in einem Konzentrationsbereich von 2 U/ml bis 0,015 U/ml eingesetzt. Plasma und Standard werden in RPMI-Medium (mit L-Glutamax-I; GIBCO) verdünnt, das als weitere Bestandteile 10% inaktiviertes fetales Kälberserum (BIOCONCEPT, Ch. 1005), 2% Antibiotikazusatz (Antibiotic Antimycotic Solutionä 100-fach, SIGMA), 0,24 mM L-Asparagin (A4284; SIGMA), 0,55 mM L-Arginin (A3909, SIGMA), 0,05 mM 2-Mercaptoethanol (MERCK) enthält. Je weil einer 96er Flachbodenplatte (CORNING) werden 100 µl der Proben-/Standardverdünnung bzw. zur Leerwertbestimmung (nur Medium) pipettiert (Doppelbestimmungen). Anschließend erfolgt die Zugabe von 100 µl einer Zellsuspension mit 2×10^4 Zellen/ml Medium. Nach 3-tägiger Inkubation bei 5% CO₂ und 37° C erfolgt die Zugabe des Tetrazoliumsalses WST-1 (BOEHRINGER) in einer Konzentration von 10 µl/200 µl Medium. Nach einer weiteren Inkubation von 6 Stunden bei 37° C und 5% CO₂ erfolgt die Messung bei 450 nm (Referenzfilter 690 nm). Die Messungen und Konzentrationsberechnungen mit ELISA-Reader (SPECTRAFLOW) und Software der Firma TECAN (easyWIN fitting V4.0a).

3 Ergebnisse

Im Rahmen unseres Projektes konnten wir bislang Plasmaproben aus Versuchen mit je vier Monoimpfstoffen gegen Infektionen durch *E. Coli* bzw. *Actinobacillus pleuropneumoniae*, zwei Mischimpfstoffen und zwei Lebendimpfstoffen mit jeweils unterschiedlichen Bakterienspezies untersuchen. Die erhobenen Resultate zeigen sehr große individuelle Unterschiede (Daten nicht dargestellt). In mehr oder weniger starkem Ausmaß finden wir innerhalb der beiden Impfgruppen ein Tier mit höheren und eines mit niedrigeren Zytokingehalten. Die Kontrolltiere hingegen, denen ein dem Volumen der einfachen Impfdosis entsprechendes Volumen isotonischer NaCl-Lösung appliziert wurde, zeigen in der Regel keinen Zytokin-

anstieg. Einen Geschlechtseinfluß hinsichtlich der Zytokinreaktionen konnten wir bislang nicht feststellen, allerdings scheint sich das individuelle Körpergewicht auf die TNF- und IL-6-Freisetzung unterschiedlich auszuwirken. Um die Reaktionen in verschiedenen Impfgruppen, d.h. bei einfacher oder doppelter Dosierung, übersichtlicher darstellen zu können, berücksichtigen wir nachfolgend die entsprechenden Mittelwerte. In der Gruppe < 100.000 EU Endotoxin pro Impfdosis wurden 4 Impfgruppen berücksichtigt, in der Gruppe < 1.000.000 EU Endotoxin pro Impfdosis 10 und in der letzten Gruppe (> 1.000.000 EU/Dosis) 8. In allen Gruppen sind sowohl einfache wie auch doppelte Dosierungen enthalten.

Abbildung 1 stellt die ermittelten TNF-Gehalte in verschiedenen Endotoxingruppen dar. TNF erreicht bereits eine Stunde nach der Impfung einen deutlichen Peak und ist meist nach vier Stunden wieder im Ausgangsbereich

Abbildung 2 verdeutlicht die entsprechenden IL-6-Gehalte. IL-6 zeigt bei niedrigeren Endotoxinkonzentrationen nach zwei bis vier Stunden einen Maximalwert, bei höheren Endotoxingehalten bereits nach zwei Stunden p. appl.

Weiterhin konnten wir auch feststellen, daß Impfstoffe unterschiedlicher Zusammensetzung bei gleichem Endotoxingehalt verschiedene Zytokinreaktionen hervorrufen (Daten nicht dargestellt). So führten Impfstoffe, die *Actinobacillus spp.* enthielten, meist zu höheren Zytokingehalten im Plasma.

4 Diskussion

Ein Bezug der Zytokinreaktionen auf die Applikation von freiem Endotoxin konnte bereits in verschiedenen Untersuchungen belegt werden (Zanetti et al., 1992; Webel et al., 1996). In deutlich geringerer Zahl finden sich Erhebungen über *in vivo* auftretende Zytokinreaktionen nach Impfstoffapplikationen. Die Vorgaben zur Durchführung der Impfstoffchargenprüfungen (DAB10) sehen eine bestimmte Tierzahl sowie die Erfassung von Änderungen der Körpertemperatur vor. Über die Bewertung weiterer klinischer Veränderungen bestehen derzeit nur vage Angaben. Als schwierig stellt sich in diesem Zusammenhang die Beschränkung auf je zwei Tiere in einer Gruppe dar, was keine

statistische Aussage über die erhobenen Befunde zuläßt. Im Rahmen unseres Projektes wurden eine Reihe weiterer Untersuchungsmethoden eingesetzt, um möglichst viele Erkenntnisse über die beim Schwein nach Applikation endotoxinhaltiger Impfstoffe auftretenden Reaktionen zu erhalten. Das hierbei angestrebte Ziel ist, einen Beitrag zur Optimierung der Versuchsbedingungen im Sinne des *Refinement* derartiger Untersuchungen zu leisten.

Die Ergebnisse unserer Zytokinuntersuchungen belegen einen deutlichen Zusammenhang zu dem applizierten Endotoxingehalt in den Vakzinen. Dies trifft sowohl auf die verschiedenen Vakzinen allgemein (vgl. Abb. 1 und 2), wie auch im einzelnen bezüglich der Reaktionen auf die einfache und doppelte Dosis des jeweiligen Impfstoffes zu. Wir sind der Ansicht, daß die Untersuchung der Zytokinreaktionen in diesem Zusammenhang ein sinnvolles und empfindliches Instrument ist, um Impfnutzenwirkungen aufzuklären zu können. Ferner erhoffen wir im Rahmen unseres Projektes genügend Anhaltspunkte zu gewinnen, um über eine Reduktion des Endotoxingehaltes in Impfstoffen diskutieren zu können.

Literatur

- Fong, Y. and Lowry, S. F. (1990). TNF in the pathophysiology of infection and sepsis. *Clinical Immunology and Immunopathology* 55, 157-170.
- Hack C. E. De Groot, E. R., Felt-Bersma, R. J. F., Nuijens, J. N., Strack van Schijndel, R. J. M., Eerenberg-Belmer, A. J. M., Lambertus, G., Aarden T, and Aarden L. A. (1989). Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis. *Blood* 74, 1704-1710.
- Holst, O., Ulmer, A. J., Brade, H., Flad, H.-D., and Rietschel, E. T. (1996). MiniReview - Biochemistry and cell biology of bacterial endotoxins. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 16, 83-104.
- Ostermann, H., Kratz-Albers, K., Mesters, R. M., Kiehl, M., and Kienast, J. (1997). Reciprocal changes in circulating interleukin-6 and its soluble receptor during evolving sepsis in leukocytopenic patients. *The Journal of Infectious Diseases* 176, 825-828.
- Rietschel, E. T. und Brade, H. (1993).

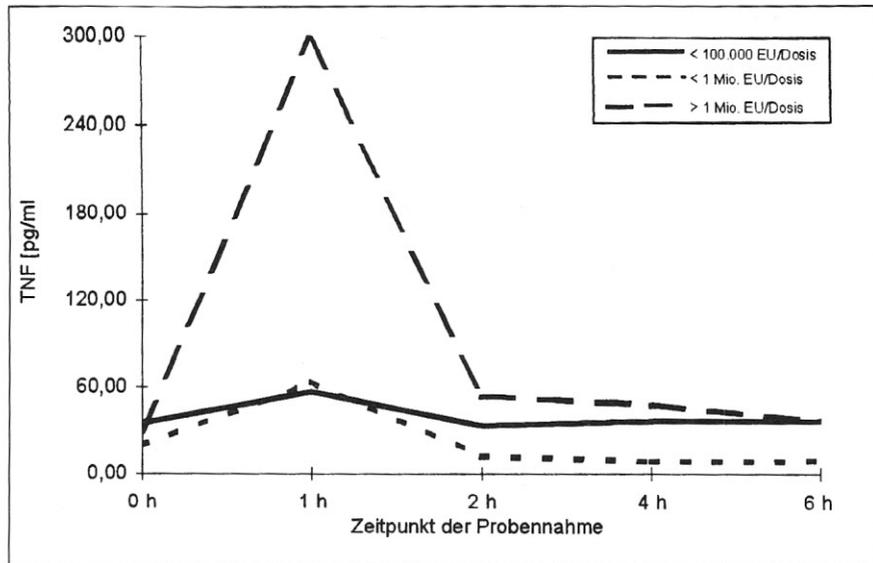


Abbildung 1: TNF-Reaktionen bei unterschiedlichen Endotoxinkonzentrationen. Bestimmung im Plasma von Schweinen mittels ELISA; Blutentnahme jeweils unmittelbar vor der Impfung (= 0 h) sowie 1, 2, 4, 6, 24, und 48 Stunden p. imm.; Endotoxinbestimmung mittels LAL (durchgeführt vom Paul-Ehrlich-Institut, Langen)

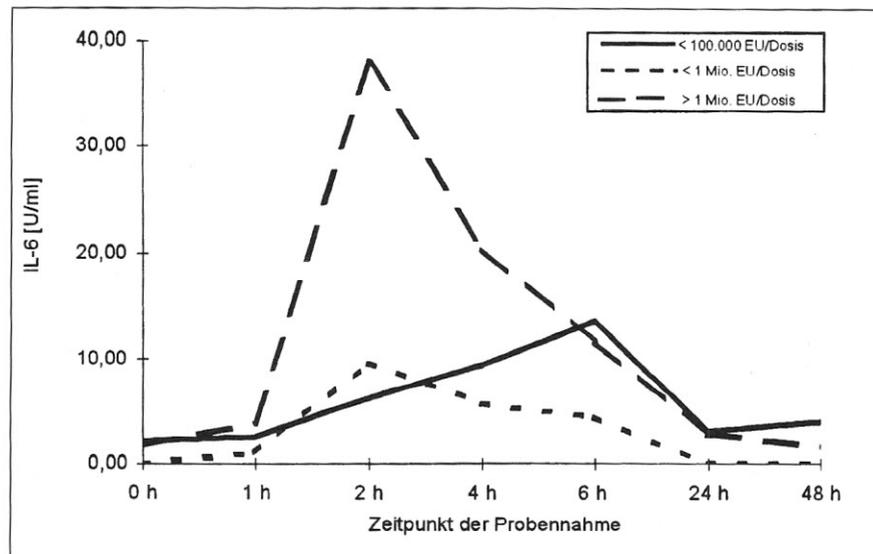


Abbildung 2: IL-6-Reaktionen bei unterschiedlichen Endotoxinkonzentrationen. Bestimmung im Plasma von Schweinen mittels Bioassay (7TD1); Blutentnahme jeweils unmittelbar vor der Impfung (= 0 h) sowie 1, 2, 4, 6, 24, und 48 Stunden p. imm.; Endotoxinbestimmung mittels LAL (durchgeführt vom Paul-Ehrlich-Institut, Langen)

Bakterielle Endotoxine. *Spektrum der Wissenschaft*, Januar 1993, 34-42.

- Rietschel, E. T., Brade, H., Holst, O., Brade, S., Müller-Loennies, S., Mamat, U., Zähringer, U., Beckmann, F., Seydel, U., Brandenburg, K., Ulmer, A. J., Mattern, T., Heine, H., Schletter, J., Loppnow, H., Schönbeck, U., Flad, H.-D., Hauschildt, S., Schade, U. F., Di Padova, F., Kusumoto, S., and Schumann, R. R. (1996). Bacterial endotoxin: chemical constitu-

tion, biological recognition, host response, and immunological detoxification. *Current topics in Microbiology and Immunology*, N.Y. 216, 39-81.

- Rigato, O., Ujvari, S., Castelo, R., and Salomão, R. (1996). Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and sepsis: Evidence for a role in host defence. *Infection* 24 (1996), 4, 42-46.
- Scamurra, R. W., Arriaga, C., Sprunger, L., Baarsch, M. J., and Murtaugh, M. P.

- (1996). Regulation of IL-6 expression in porcine immune cells. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 16, 289-296.
- Tracey, K. and Cerami, A. (1993): Tumor Necrosis Factor: An updated review of its biology. *Critical Care Medicine* 21,415-422.
- Webel, D. M., Finck, B. N., Baker, D. H., and Johnson, R. W. (1997). Time course of increased plasma cytokines, cortisol, and urea nitrogen in pigs following intraperitoneal injection of lipopolysaccharide. *The Journal of Animal Science* 75, 1514-1520.
- Zanetti, G., Heumann, D., Gérain, J., Kohler, J., Abbet, P., Barras, C., Lucas, R., Glauser M.-P., and Baumgartner, J.-D. (1993). Cytokine production after intravenous or peritoneal gram-negative bacterial challenge in mice. *The Journal of Immunology* 148, 1890-1897.
- Danksagung**
Wir danken für die finanzielle Förderung unseres Projektes durch die Stiftung Forschung 3R, CH-Münsingen
- Korrespondenzadresse**
Martina Ecker, Tierärztin
Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, FG 421 - Immunologie
D-07749 Jena



Untersuchungen zur Relevanz der Prüfung auf spezifische Unschädlichkeit an der Zieltierspezies. Ergebnisse bei bakteriellen Impfstoffen im Zeitraum von 1994-1997

Angela Pöbnecker und Klaus Cußler
Paul-Ehrlich-Institut, D-63207 Langen

Zusammenfassung

Die gesetzlichen Vorschriften zur Impfstoffprüfung verlangen, daß jede neue Charge auf Unschädlichkeit und Wirksamkeit getestet werden muß. Bei Tierimpfstoffen wird die „Prüfung auf spezifische Unschädlichkeit an der Zieltierspezies“ in der Europäischen Pharmakopöe als eine Untersuchung am Endprodukt verlangt. Dieser Tierversuch wird ebenfalls in den „General requirements for the production and control of live mammalian viral and bacterial vaccines (GRLMV)“ und den „General requirements for the production and control of inactivated mammalian viral and bacterial vaccines (GRIMV)“ der europäischen Union gefordert. In der Zeit von Januar 1994 bis Dezember 1997 wurden 1934 Chargenfreigaben beim Paul-Ehrlich-Institut im Bereich der bakteriellen Tierimpfstoffe (einschließlich der Kombinationsimpfstoffe mit Virusanteilen), der parasitologischen Impfstoffe, der Pilzimpfstoffe und der Seren beantragt. Die Hersteller benötigten für die Unschädlichkeitsuntersuchung an der Zieltierspezies 5250 Tiere. Der Wert des Unbedenklichkeitsversuchs am Zieltier wird verschiedentlich in Frage gestellt. Insbesondere ist unklar, ob dieser Tierversuch unter den heutigen Anforderungen an die Qualitätskontrolle von Tierimpfstoffen noch einen wesentlichen Beitrag zur Arzneimittelsicherheit leisten kann. Bisher liegt allerdings noch nicht genügend Datenmaterial zum Unbedenklichkeitsversuch als Diskussionsgrundlage vor. In dieser Arbeit werden vorläufige Daten einer Untersuchung

vorgestellt, die sich mit den Ergebnissen der Prüfung „Prüfung auf spezifische Unschädlichkeit an der Zieltierspezies“ bei den in Deutschland zugelassenen bakteriellen Impfstoffen der Jahre 1994 bis 1997 befaßt.

Summary: Evaluation of the relevance of the target animal safety test for the quality control of veterinary immunological medicinal products

The legal requirements for veterinary vaccines require the testing of each new vaccine batch for safety. In the European Pharmacopoeia a target animal safety test (TAST) is regularly required as a final product test for almost all vaccine batches. This test is also required in the „General requirements for the production and control of live mammalian viral and bacterial vaccines (GRLMV)“ and the „General requirements for the production and control of inactivated mammalian viral and bacterial vaccines (GRIMV)“ by the European Union. In several publications the relevance of this TAST has been questioned. Particularly, it is questionable whether this animal test is able to give a significant contribution to the safety of immunologicals considering today's standards of the quality control of animal vaccines, e.g. Good manufacturing practice and Good laboratory practice. However, due to a lack of sufficient amount of data the relevance of this animal test is discussed contradictorily. 1934 batch release protocols were sent to the Paul-Ehrlich-Institut between January of 1994 and December of 1997 for bacterial