

Fremdvirusausschluß in Lebendimpfstoffen

Beate Krämer, Petra Rübmann, Karin Duchow und Klaus Cußler
Paul-Ehrlich-Institut, D-Langen

Zusammenfassung

In dem vom BMBF geförderten Forschungsprojekt wurde untersucht, ob der nie validierte und sehr belastende Tierversuch zum Fremdvirusausschluß in Impfstoffen durch geeignete *in vitro* Methoden ersetzt werden kann.

Zur Evaluierung der *in vitro* Tests wurde das porcine Herpesvirus (Aujeszkyvirus, Pseudorabiesvirus) als Modellvirus eingesetzt. In artifiziell kontaminierten Lebendimpfstoffen konnte das Pseudorabiesvirus (PRV) sowohl auf sensitiven Zellen durch zellmorphologische Veränderungen als auch molekulargenetisch in der PCR eindeutig nachgewiesen werden. Der Vergleich der im Tierversuch ermittelten Nachweisgrenze mit den Detektionsgrenzen der *in vitro* Verfahren ergab, daß diese dem *in vivo* Modell nicht nur ebenbürtig, sondern überlegen sind.

Die Europäische Arzneibuchkommission hat inzwischen die Prüfung zum Ausschluß von Fremdviiren in zwei der für dieses Forschungsvorhaben relevanten Monographien gestrichen, für die übrigen Lebendimpfstoffe wird die Abschaffung der Prüfung diskutiert.

Summary: Detection of extraneous virus in live vaccines

In the study *in vitro* alternatives to a nonvalidated and harmful animal test for the absence of extraneous virus in live vaccines were investigated.

For evaluation of a suitable *in vitro* method the porcine herpesvirus (Aujeszkyvirus, Pseudorabiesvirus) was used as a model virus. In artificially contaminated live vaccines the aujeszkyvirus could be detected by moleculargenetical and cellular methods. Regarding the threshold values of virus detection *in vitro* tests showed to be more efficacious than animal testing.

Meanwhile the European Pharmacopoeia Commission deleted the animal test for extraneous virus from two monographs. The discussion, if respective animal testing can be cancelled for the other live vaccines as well, is still ongoing.

The study was supported by the German Ministry of Education, Science, Research and Technology.

Keywords: Aujeszkyvirus, veterinary vaccines, live vaccines, extraneous virus, virus contamination, *in vitro* testing

1 Einleitung

Im Rahmen der Qualitätssicherung ist der Fremdvirusausschluß in der Maus in den Monographien für Infektiöse-Hepatitis-Lebend-Impfstoffe für Hunde, für Staupe-Lebend-Impfstoffe für Hunde, Frettchen und Nerze und für Panleukopenie-Lebend-Impfstoffe für Katzen als Endproduktprüfung für jede produzierte Impfstoffcharge vorgeschrieben. Hierbei erhalten Mäuse mit einem Gewicht zwischen 11 und 16 g jeweils 0,03 ml der zu prüfenden Impfstoffzubereitung intrazerebral. Überleben die Tiere den Test 21 Tage symptomlos, gilt die Prüfung als bestanden. Die Injektion selbst ist ein stark belastender Eingriff, der zu spontanen Todesfällen führen kann. Tiere, die innerhalb der ersten 24 bzw. 48 Stunden nach der Injektion verenden, gelten als unspezifische Mortalitätsfälle und führen zur Testwiederholung.

Welche Fremdviiren mit diesem Tierversuch konkret ausgeschlossen werden sollen, geht aus den Monographien nicht hervor. Da das Pseudorabiesvirus gemäß den

EU-Guidelines in caninen und felines Impfstoffen definitiv ausgeschlossen werden muß, wurde es als Modellvirus zur artifiziellen Kontamination von Impfstoffproben eingesetzt. Für die *in vitro* Nachweise wurden ebenso wie zur Untersuchung des *in vivo* Modells Hepatitis-Staupe-Kombinationsimpfstoffe mit absteigenden Verdünnungen eines standardisierten PRV-Antigens kontaminiert.

2 Tiere, Material und Methoden

2.1 PRV-Standard

Zur Herstellung des PRV-Standardantigens wurde der Wildtypstamm Phylaxia auf Verozellen kultiviert. Der Titer der gepoolten Virusernte lag bei $10^{7.4}$ TICD₅₀, nach der Lyophilisierung betrug er noch $10^{5.5}$ TICD₅₀. Die PRV-Lyophilisate wurden bei -20°C gelagert und in allen Versuchen zur Kontamination der Lebendimpfstoffe verwendet.

2.2 Zelltest

Zum Nachweis des PRV im Zellsystem wurde der zytopathische Effekt (CPE) auf

Verozellen ($1,5 \times 10^5$ Zellen/ml) fünf Tage nach einer Simultaninfektion ausgewertet. Das Kontaminationsvirus wurde in den Endverdünnungen von $10^{-2.3}$ bis $10^{-8.3}$ getestet. Um den durch das PRV induzierten CPE eindeutig identifizieren zu können, wurden die Impfviren, also das staupeinduzierende Morbillivirus und das canine Adenovirus mit entsprechenden Immunsereen neutralisiert. Der Nachweis der vollständigen Neutralisation wurde für das canine Adenovirus durch das Fehlen eines typischen CPEs auf MDCK-Zellen erbracht. Das Morbillivirus wurde in einem Peroxidase-linked-antibody-assay durch eine Farbreaktion nachgewiesen.

2.3 Polymerase Ketten Reaktion - PCR

Für den Nachweis der PRV-DNA in der PCR wurden spezifische Primer, die im kodierenden Bereich des essentiellen gII bzw. gB-Gens hybridisierten, eingesetzt. Das Amplifikat besaß eine Länge von 391 bp und wurde gelelektrophoretisch dargestellt. Zur Steigerung der Sensitivität und Spezifität der PCR wurde eine



zweite Amplifikation, eine sogenannte *nested* PCR, angeschlossen. Hierbei wurde ein weiteres *Primer*paar, dessen Sequenzen innerhalb des zuerst amplifizierten Fragments lagen, verwendet. Das Endprodukt besaß noch eine Länge von 349 bp. Die Nachweisgrenze bei Verwendung reiner PRV-DNA lag in der 1. PCR bei 100 fg, in der *nested* PCR war dagegen ein Nachweis bis zu 1fg PRV-DNA möglich.

2.4 Tierversuch

Zur Ermittlung der Detektionsgrenzen des Tierversuchs wurde NMRI-Mäusen je 0,03 ml eines kontaminierten Impfstoffs appliziert. In den Impfstoffproben lag das Kontaminationsvirus in Verdünnungsstufen von 10⁻¹ bis 10⁻⁸ vor. Jeweils acht Tiere wurden parallel mit der gleichen PRV-Verdünnung infiziert. Als Futter-, Gewichts- und Verhaltenskontrollen wurden unbehandelte Mäuse eingesetzt. Zur Kontrolle der Injektionseffekte wurde einzelnen Mäusen 0,03 ml einer physiologischen Kochsalzlösung injiziert. Darüber hinaus erhielten einige Tiere 0,03 ml des ungespikten Impfstoffes zur Überprüfung der Impfstoffeffekte. Als Positivkontrollen wurden Mäuse mit einer unverdünnten PRV-Suspension infiziert. Die Tiere wurden streng nach Versuchsgruppen getrennt gehalten und 21 Tage lang beobachtet. Neben der täglichen Gewichtserfassung wurden Verhaltensauffälligkeiten und das Auftreten von Krankheitssymptomen detailliert protokolliert. Den verendeten Tieren wurde unverzüglich das Gehirn entnommen und dieses bei -70° C kryokonserviert. Das Kontaminationsvirus wurde in den Gehirnproben sowohl im Zelltest als auch in der PCR nachgewiesen.

Aus Platzgründen wurde hier auf eine eingehende Darstellung der verwendeten

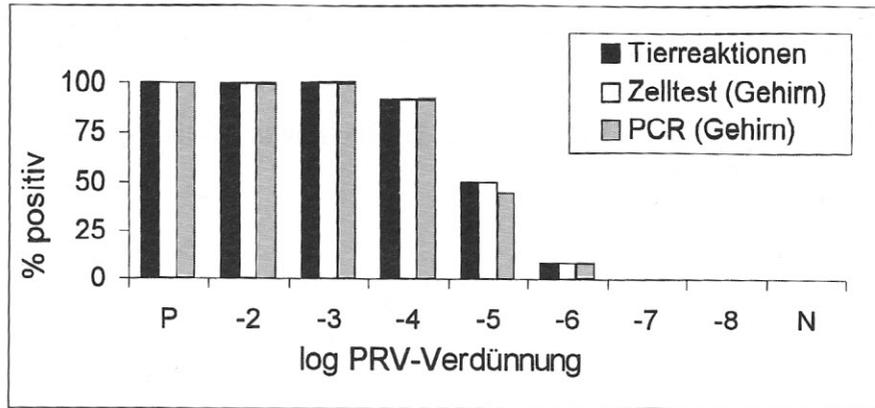


Abbildung 1: Detektion von Pseudorabiesvirus (PRV)-Kontaminationen in Lebendimpfstoffen *in vivo* und Ergebnisse der an Gehirnproben durchgeführten Tests

Materialien sowie der Versuchsdurchführung verzichtet. Die entsprechenden Protokolle können jedoch bei der Autorin angefordert werden.

3 Ergebnisse

Im Zelltest konnte das Kontaminationsvirus auf Vero- und MDCK-Zellen bis zu einer Endverdünnung von 10^{-5,3} detektiert werden. Nach einer einmaligen Passagierung der Überstände war der Nachweis des PRV noch in einer Endverdünnung von 10^{-6,3} möglich. Die Überstände aus den Zelltests wurden außerdem in der PCR überprüft. Die Ergebnisse des zellulären Nachweises wurden zusammen mit den Resultaten der PCR in der folgenden Tabelle dargestellt.

Es wurde eine fast vollständige Übereinstimmung der Ergebnisse aus Zelltest und PCR gefunden: mit einer Ausnahme waren alle im Zelltest negativen Proben auch in der PCR negativ. Wurden kontaminierte Impfstoffproben direkt als Target in der PCR eingesetzt, war ein Nach-

weis des Kontaminationsvirus bis zu einer Endverdünnung von 10⁻⁵ möglich. Somit konnte die Erwartung einer höheren Sensitivität der PCR nicht erfüllt werden.

Im Tierversuch zeigten die Mäuse, die kontaminierte Impfstoffproben erhalten hatten, neben einem ausgeprägten Juckreiz einen stark erhöhten Speichelfluß, Bewegungsstörungen, heftiges Zittern und Krämpfe. Einzelne Tiere waren ausgesprochen aggressiv, andere dagegen völlig apathisch. Der Zeitpunkt des Auftretens und die Ausprägung der Krankheitssymptome waren ebenso wie Gewichtsentwicklung und Überlebensdauer abhängig von der Konzentration des Kontaminationsvirus. Die durchschnittliche Überlebensdauer sank kontinuierlich mit steigender Viruskonzentration, die Tiere der Positivkontrolle überlebten den Test nur zwei Tage. Auch die mittlere Gewichtszunahme nahm kontinuierlich ab, deutliche Gewichtsverluste waren bei Tieren, die eine PRV-Verdünnung von 10⁻³ bis 10⁻¹ erhalten hatten, zu verzeichnen.

Tabelle 1: Detektion von PRV-Kontaminationen *in vitro*

<i>in vitro</i> - Nachweis	Testergebnisse bei absteigenden PRV-Verdünnungen						
	10 ^{-2,3}	10 ^{-3,3}	10 ^{-4,3}	10 ^{-5,3}	10 ^{-6,3}	10 ^{-7,3}	10 ^{-8,3}
Zelltest	++	++++	+++++	-----	-----	---	-
Überstände: PCR	++	++++	+++++	-----	-----	---	-
Zelltest: 1. Passage	++	++	+++	+++	+++	----	----
Überstände: PCR	++	++	+++	+++	+++	----	----

+/- = Ergebnis und Anzahl der durchgeführten Test

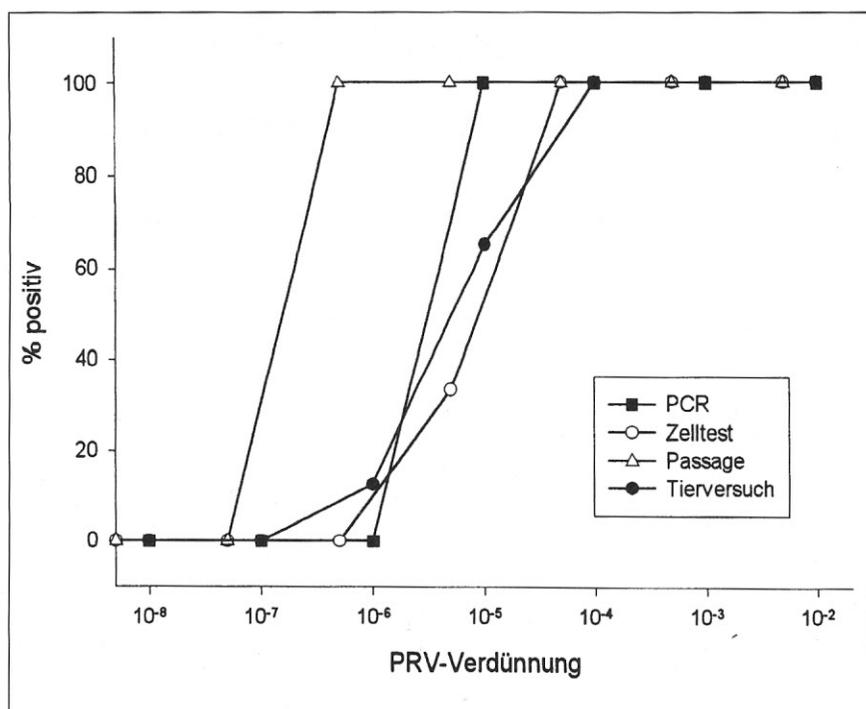


Abbildung 2: Vergleich von *in vitro* und *in vivo* Verfahren zum Nachweis einer Pseudorabiesvirus (PRV)-Kontamination in Lebendimpfstoffen

In der Abbildung 1 wurden neben den Resultaten des Tierversuchs auch die Ergebnisse der an den Gehirnproben durchgeführten Tests dargestellt.

In der Positivkontrolle und bis zur Virusverdünnung von 10^{-3} zeigten 100% der Tiere Krankheitssymptome und verendeten innerhalb des Beobachtungszeitraums. In den nachfolgenden Verdünnungsstufen lag die Mortalitätsrate bei 92% (10^{-4}) und sank dann weiter auf 50% (10^{-5}) bzw. 8% (10^{-6}). In den übrigen Gruppen überlebten alle Tiere die Infektion ohne Symptome. In Gehirnproben konnte das Kontaminationsvirus im Zelltest nachgewiesen werden, die Ergebnisse stimmten vollständig mit den Resultaten des Tierversuchs überein. Sämtliche Tiere, die Krankheitssymptome entwickelt hatten, waren auch im Zelltest positiv, und umgekehrt konnte bei den überlebenden Tieren kein PRV in den Gehirnproben nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der PCR wichen geringfügig davon ab. Da in einigen Gehirnhomogenisaten auch nach mehrmaliger Wiederholung kein Virus nachgewiesen werden konnte, muß man davon ausgehen, daß die PCR hier falsch negative Ergebnisse geliefert hat.

Zum Vergleich der *in vitro* und *in vivo* ermittelten Nachweisgrenzen wurden die

Ergebnisse der Tests in der Abbildung 2 zusammengefaßt.

Im Tierversuch liegt die LD_{50} bei einer PRV-Verdünnung von $10^{-5.5}$. In der PCR ist die der LD_{50} entsprechende ED_{50} etwa bei einer Virusverdünnung von $10^{-5.6}$ erreicht. Die ID_{50} des Zelltests liegt bei einer Virusverdünnung von $10^{-5.2}$, nach einer einmaligen Passagierung der Zellen liegt sie bei einer PRV-Verdünnung von 10^{-7} .

4 Diskussion

Die Gegenüberstellung der Ergebnisse aus den untersuchten Testsystemen zeigt, daß die *in vitro* Verfahren dem *in vivo* Modell nicht nur ebenbürtig, sondern durchaus überlegen sind. Hierbei darf allerdings nicht übersehen werden, daß der Vergleich dieser drei Methoden nur bedingt möglich ist. So ist bei den Ergebnissen des Tierversuchs zu berücksichtigen, daß laut Monographie zwei Tiere, das sind immerhin 20% sterben dürfen. Da in den durchgeführten Versuchen lediglich 8% der Tiere in der grenzwertigen Verdünnungsstufe reagiert haben, kann ein gesicherter Nachweis erst in der nächst niedrigeren Verdünnungsstufe, also bei 10^{-5} erwartet werden.

Ein Problem der molekulargenetischen Nachweisverfahren liegt darin, daß ein positives Ergebnis, also das Vorhandensein viraler DNA, nicht unbedingt einen Rückschluß auf die Aktivität eines Virus zuläßt.

Mit dem Zelltest werden dagegen nur vermehrungsfähige Viren nachgewiesen. Allerdings können hier die Nachweisgrenzen in Abhängigkeit der Sensitivität der verwendeten Zellsysteme und der Testdurchführung stark variieren.

Von den beiden untersuchten *in vitro* Methoden hat sich der zelluläre Nachweis als das robustere und weniger störanfällige Verfahren erwiesen. Deshalb sollte dieser Methode eine Präferenz beim Ersatz des Tierversuchs zum Fremdvirusausschluß eingeräumt und eine Validierung angestrebt werden.

5 Aktuelle Änderungen der Arzneibuchmonographien

Die Europäische Arzneibuchkommission hat 1997 den Tierversuch zum Fremdvirusausschluß für Panleukopenie-Lebendimpfstoffe für Katzen sowie für Staupe-Lebendimpfstoffe für Hunde gestrichen. Für diese Präparate wird nunmehr ausschließlich ein zellulärer Nachweis zum Ausschluß von Fremdviolen gefordert.

Über eine Streichung des Tierversuchs aus der Monographie für Infektiöse-Hepatitis-Lebendimpfstoffe wird derzeit innerhalb der Expertenkommissionen diskutiert. Eine Revision wurde durch die Deutsche Arzneibuchkommission für Staupe-Lebendimpfstoffe für Frettchen und Nerze beantragt.

Danksagung

Das im Paul-Ehrlich-Institut durchgeführte Projekt zur „Untersuchung der Relevanz des Tierversuchs zum Ausschluß von Fremdviolen gemäß DAB bei Impfstoffen *ad us. vet.* und zur Eignung möglicher Ersatzmethoden“ wurde vom Bundesministerium für Bildung, Forschung, Wissenschaft und Technologie gefördert.

Korrespondenzadresse

Dipl.-Biol. Beate Krämer
Paul-Ehrlich-Institut
Abteilung Veterinärmedizin
Paul-Ehrlich-Str. 51-59
D-63225 Langen