

Einsatz eines automatisierten Mikroneutralisationstests zum Nachweis neutralisierender Serumantikörper gegen Polioviren

An automatised microneutralisation assay used for detection of neutralising serum antibodies against polioviruses

H. Rabenau, B. Weber, G. Bauer

Institut für Medizinische Virologie (Leiter: Prof. Dr. med. H. W. Doerr), Zentrum der Hygiene, Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

Zusammenfassung:

Mit Hilfe eines Pipettierroboters (Tecan RSP 4072) wurde ein automatisierter Mikroneutralisationstest zum quantitativen Nachweis neutralisierender Antikörper gegen Polioviren etabliert.

Es konnte gezeigt werden, daß die Methode sehr gut reproduzierbar ist und die Untersuchungen von großen Kollektiven in relativ kurzer Zeit mit einem Minimum an Arbeitsaufwand im Vergleich zur manuellen Testdurchführung erlaubt.

Die Seroprävalenzen gegen Poliovirus Typ 1, 2 und 3 wurden anhand von Serumproben von 1243 Patienten während eines Beobachtungszeitraums von 30 Monaten (Januar 1990 bis Juni 1992) untersucht. Die Poliovirus-Seropositivitätsrate gegen alle drei Typen betrug ca. 80%. Die höchsten Seroprävalenzen wurden dabei in der Gruppe der älteren Patienten (≥ 50 Jahre) beobachtet. Insgesamt wies ein relativ hoher Anteil (7,4%) der Probanden gegen keinen der drei Poliovirus-Typen neutralisierende Antikörper auf. Daher sollten Impfungen weiterhin empfohlen werden, insbesondere für Reisende in Endemiegebiete.

Schlüsselwörter:

Mikroneutralisationstest – Polioviren – Automatisierung

Summary:

An automated microneutralization assay for the quantitative detection of neutralizing antibodies against polioviruses using a pipetting roboter (Tecan RSP 5072) was established. As shown by our study, the method proved to be highly reproducible and permitted the testing of large sample collectives in a rapid turn around and with a minimum of labour intensity as compared to the manually performed assay. The seroprevalences against poliovirus type 1, 2 and 3 were investigated in serum samples drawn from 1243 individuals during a time interval of 30 months (January 1990 to June 1992). Overall seroprevalences were about 80%. The highest seroprevalence rates were observed in the elderly age group (≥ 50 years). A total of 7.4% of the individuals had no neutralizing antibodies against polioviruses. Therefore immunization should be further recommended, especially for people travelling in endemic areas.

Keywords:

Microneutralization assay – poliovirus – automation

Einleitung

Zur Beurteilung der Immunitätslage gegen Polioviren ist der Nachweis typenspezifischer Serumantikörper mittels Virusneutralisationstest geeignet. Hierzu sind bereits einige Seroprävalenzstudien erschienen [1–3, 5, 6]. Obwohl ca. 30% der Weltbevölkerung in Gegenden (Nord-

amerika, Westeuropa, Australien und Japan) lebt, die als Polio-Wildvirus-frei gelten, ist jährlich mit 200 000–250 000 Fällen an Poliomyelitis zu rechnen [7]. Eines der Ziele des „Expanded Program on Immunisation“ (EPI) der WHO ist die weltweite Eradikation der Poliomyelitis bis zum Ende dieses Jahrzehntes [9]. Durch den zunehmenden Tourismus und weltweiten Personenreiseverkehr in

Endemiegebiete und begrenzte Epidemien in Industrieländern [3, 10] ergibt sich die Notwendigkeit zur Überwachung des Immunstatus der Bevölkerung auch in Poliomyelitis-frei zu bezeichnenden Gegenden wie der BRD. Neben dem Neutralisationstest stehen der virologischen Laboratoriumsdiagnostik ELISA-Verfahren und die Komplementbindungsreaktion (KBR) zu Verfügung, die jedoch auf Grund eingeschränkter Sensitivität zur Überprüfung des Immunschutzes nur bedingt geeignet ist. Der Mikroneutralisationstest (MNT) hingegen gilt nach wie vor als die sensitivste und spezifischste serodiagnostische Methode. Da die Durchführung zeit- und arbeitsintensiv ist, war der MNT bislang für Screening-Untersuchungen an größeren Personenkollektiven nur beschränkt nutzbar.

In der vorliegenden Studie berichten wir über die Einführung eines automatisierten MNT zum quantitativen Nachweis neutralisierender Antikörper gegen die Polioviren Typ 1, 2 und 3.

Material und Methoden

Viren

Als Referenzvirusstämme für den Mikroneutralisationstest dienten Poliovirus Typ 1 (Chat), Poliovirus Typ 2 (P-712), Poliovirus Typ 3 (WM) (American Type Culture Collection [ATCC], USA).

Die Virusvermehrung erfolgte auf Affenienzellen (Vero) nach Standardmethoden [8]. Die Zellen wurden in Hepes Minimal Essential Medium (MEM) mit 10% foetalem Kälberserum gezüchtet und anschließend mit einer MOI von 0,01 für 1 Stunde bei 37° C beimpft. Erhaltungsmedium wurde zugesetzt und das Virus nach Bildung eines ausgeprägten zytopathogenen Effektes (CPE) durch dreimaliges Frieren und Tauen geerntet. Die Virussuspension wurde abschließend auf 4000 tissue culture infectious dosis (TCID₅₀/ml eingestellt.

Mikroneutralisationstest

Der Neutralisationstest (NT) wurde in einem Mikrotechnikverfahren, modifiziert nach den Richtlinien des früheren Deutschen Referenzzentrums für Enteroviren (Münster, Deutschland), unter Verwendung eines zweiarmigen Pipettierroboters durchgeführt (Robotic Sample Prozessor, RSP 5072; Fa. Tecan, Deutschland).

Der automatisierte NT wurde anhand von Paralleluntersuchungen mit der bereits seit mehreren Jahren etablierten konventionellen manuellen Methode verglichen. Für beide Testverfahren wurden die gleichen Arbeitsprotokolle eingesetzt. Diese sind aus der nachfolgenden Beschreibung des automatisierten NTs zu entnehmen.

Durch spezielle Platten- und Probenhalter- sowie Vorverdünnungsracks, die eine optimale Platznutzung zulassen, ist es möglich, parallel 14 verschiedene 96-Loch-Mikrotiterplatten zu bearbeiten. In Zusammenarbeit mit der Herstellerfirma wurde ein Programm (Fa. Tecan und Institut f.

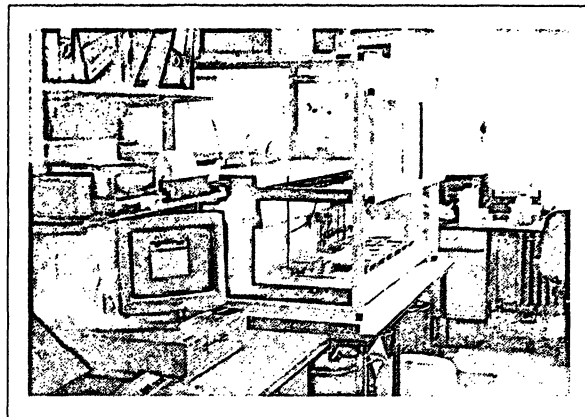


Abb. 1: Zweiarmiger Pipettierroboter (Tecan RSP 5072, Tecan, Wiesbaden, Deutschland) zur Durchführung des Mikroneutralisationstests zum quantitativen Nachweis neutralisierender Antikörper gegen Polioviren.

Med. Virologie, Frankfurt am Main) entwickelt, das den Anforderungen des NT gerecht wird.

Ein Einnadel-Probenarm dient zur Serumverteilung in die jeweiligen 96-Loch-Flachboden-Mikrotiterplatten (Nunc, Wiesbaden, Deutschland). Der zweite Arm ist ausgestattet mit einem Viernadel-Probenarm, der die Serumverdünnungen, Virusverteilung und abschließende Zellzugabe durchführt. Für den Mikroneutralisationstest wurde die Anordnung der einzelnen Komponenten (Reagenzien, Serumproben, Virus und Zellsuspension sowie Mikrotiterplatten) im Hinblick auf eine Minimierung von Verschleppungsrisiken verändert.

Probenverschleppungen werden zusätzlich durch automatisierte Waschschritte zwischen den einzelnen Serumproben unterbunden. Nach jedem kompletten Test werden Spülvorgänge mit 0,5% Formalin (14 Std. bei Raumtemperatur) durchgeführt, um eine interapparative Verunreinigung zu vermeiden. Zur Unterbindung von bakteriellen oder Pilz-Kontaminationen wurde der gesamte Pipettierautomat unter eine Plexiglasummantelung gesetzt (Abb. 1).

Innerhalb eines Testlaufes können insgesamt 16 Serumproben auf neutralisierende Antikörper gegenüber den 3 verschiedenen Poliovirus-Serotypen untersucht werden. Die Serumproben werden mit Hepes MEM (mit 2% Ciprofloxacin und 1% Amphotericin) in 2er-Verdünnungsschritten von 1:10 bis 1:1280 verdünnt. Den einzelnen Vertiefungen der Mikrotiterplatten werden je 30 µl von jeder Serumverdünnung sowie das gleiche Volumen einer Virussuspension mit 4000 TCID₅₀/ml zugesetzt. Alle Tests werden im Tripelansatz durchgeführt. Bei Ausnutzung der kompletten Plattenkapazität des Pipettierroboters werden für die Serumverdünnung und Virusbeimpfung insgesamt ca. 80 Minuten benötigt (für die manuelle Durchführung ist der Zeitaufwand ähnlich, allerdings bei erheblich höherer Arbeitsbelastung). Die beimpften 96-Loch-Platten werden für eine Stunde bei 37° C inkubiert und anschließend

mit 60 µl einer Verozell-Suspension mit einer Dichte von 3×10^4 Zellen pro Vertiefung bestückt. Um eine gleichmäßige Zelldichte zu gewährleisten, werden die vorbereiteten Indikatorzellen in einem 50 ml Vorratsgefäß durch einen computergesteuerten Edelstahlrührarm in permanenter Bewegung gehalten. Abschließend werden die Platten für drei Tage bei 37° C in 5% CO₂ inkubiert. Die Auswertung des Tests erfolgt durch mikroskopische Ablesung. Der Neutralisationsantikörpertiter (NAT) entspricht dem reziproken Wert der höchsten Serumverdünnung, bei der kein cytopathogener Effekt zu beobachten ist. Eine Serumprobe wird als positiv bezeichnet, wenn ihr NAT größer oder gleich 1:10 ist.

Patientenkollektiv

Die untersuchten Serumproben stammen aus der laufenden Laboratoriumsdiagnostik des Institutes für Medizinische Virologie der Universitätskliniken Frankfurt am Main. Sie wurden in dem Zeitraum Januar 1990 bis Juni 1992 gesammelt. Die Alters- und Geschlechtsverteilung und die Anzahl der durchgeführten MNT's sind in Tabelle 2 aufgeführt. 81% der Serumproben wurden deutschen Patienten, die restlichen von Personen aus anderen Ländern (z. B. Italien, Türkei, GUS etc.) entnommen.

Ergebnisse

Reproduzierbarkeit der Ergebnisse des automatisierten Mikroneutralisationstests

Insgesamt wurden 72 Serumproben parallel mit dem konventionellen (manuellen) und mit dem automatisierten Mikroneutralisationstest jeweils im Tripelansatz untersucht. Dabei zeigte sich, daß keines der Seren, das im konventionellen MNT seronegativ gegenüber einem der drei Poliovirus-Serotypen war, im automatisierten Test ein positives Resultat aufwies und umgekehrt. Die Neutralisationstiter in beiden Tests waren überwiegend identisch. Unterschiede von maximal einer Verdünnungsstufe wurden beobachtet (Daten nicht aufgeführt).

Die Intra-Test-Variabilität des automatisierten Neutralisationstest erwies sich als sehr gering. Von 95 Serumproben, die jeweils parallel im Tripelansatz getestet wurden, konnte nur bei drei ein Unterschied im Neutralisationstiter von einer Titerstufe beobachtet werden (Tabelle 1).

Die Inter-Test Reproduzierbarkeit wurde überprüft, indem die Neutralisationstiter von 8 verschiedenen Poliovirus Typ 1-positiven Serumproben verglichen wurden, die in

jeweils 14 verschiedenen Testansätzen mitliefen. Titerunterschiede überschritten niemals mehr als eine Verdünnungsstufe (Daten nicht aufgeführt).

Die Reproduzierbarkeit der Resultate wurde nicht durch verschiedene Viruschargen beeinflusst.

Auch zeigte sich, daß unerwünschte bakterielle Kontaminationen durch die getroffenen Maßnahmen (Plexiglasummantelung, Spülvorgänge) effektiv auszuschließen waren.

Seroprävalenz gegenüber Polioviren

Die Gesamtseroprävalenz gegenüber Poliovirus Typ 1-3 ist in Tabelle 2 dargestellt. Es zeigt sich beim untersuchten Patientenkollektiv eine hohe Poliovirus-Seroprävalenz bei den einzelnen Serotypen (81,4% für Poliovirus Typ 1, 86,7% für Poliovirus Typ 2 und 78,4% für Poliovirus Typ 3).

Die altersabhängige Seroprävalenz ist in Abbildung 2 gezeigt. Eine hohe Immunisierungsrate ($>82\%$) gegen alle drei Serotypen wurde in der Gruppe der über 50-jährigen gefunden. Demgegenüber zeigten Kinder zwischen 1 und 4 Jahren bei den Polioviren 1 und 3 nur eine Prävalenz von 73,4% (95% Konfidenzintervall [KI]: 60,0–81,9%) bzw. 68,8% (95% KI: 56,0–79,8%). Unabhängig von der Alters- und Geschlechtsverteilung wurden bei 92,6% der Probanden Antikörper gegen mindestens einen Poliovirus-Serotyp nachgewiesen. Dagegen zeigten 7,4% der Probanden keine neutralisierenden Antikörper gegen alle 3 Polioviren. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Alter und Seronegativität gegen Poliovirus konnte nicht festgestellt werden (Abb. 3).

Diskussion

Für die Überwachung infektiöser Erkrankungen sind epidemiologische Untersuchungen von großer Bedeutung. Trotz des Rückgangs der Poliomyelitis auf Grund der von der WHO initiierten Poliovakzinierung ist jährlich mit rund einer viertel Millionen Erkrankungsfällen zu rechnen [7]. Laut Daten der WHO von 1988 sind Kinder bis zum 12. Lebensjahr weltweit zu 67% gegen Poliomyelitis geimpft, doch treten hierbei regionale Schwankungen auf, die von 90% in Europa, USA und den westlichen pazifischen Regionen bis zu 45% in Afrika beziffert werden [7]. Um zu gewährleisten, daß eine Zirkulation von Polio-Wildviren unterbunden werden kann, ist es notwendig, daß die Gesamtseroprävalenz der drei Poliovirus Typen über 80% beträgt [1].

In den 80er Jahren traten in den USA nur noch 10 Fälle von paralytischer Poliomyelitis auf, die praktisch alle eingeschleppt oder als Vaccine-assoziierte Poliomyelitis zu bezeichnen waren [4].

In entwickelten Ländern kommen allerdings durch den verstärkten Tourismus Infektionen mit Polioviren eine wachsende Bedeutung zu. Daher ist die Feststellung des Immunstatus im Zusammenhang mit der Schluck-

Tab. 1: Die Intra-Test-Variabilität neutralisierender Antikörpertiter gegen Polioviren, bestimmt mittels automatisiertem Neutralisationstest.

Anzahl durchgeführter Tests (Tripelansätze)	Anzahl von Tests und Titerunterschiede		
	0	zweifach	vierfach
95	92	3	0

Tab. 2: Anteil der Serumproben, die auf Poliovirus Typ 1-3-spezifische Antikörper untersucht wurden sowie geschlechtsspezifische Unterschiede positiver Resultate im Neutralisationstest.

Poliovirus Serotyp	positives Testresultat				durchsch. geometrischer Titer (der Seropos.)
	Gesamt (%) (n = 1243)	M (%) (n = 617 (49,6])	W (%) (n = 626 (50,4])		
Polio 1	1013 (81,4)	501 (85,7)	512 (81,8)		16,5
Polio 2	1078 (86,7)	529 (181,2)	549 (87,8)		22,7
Polio 3	974 (78,4)	467 (75,8)	481 (76,8)		13,4

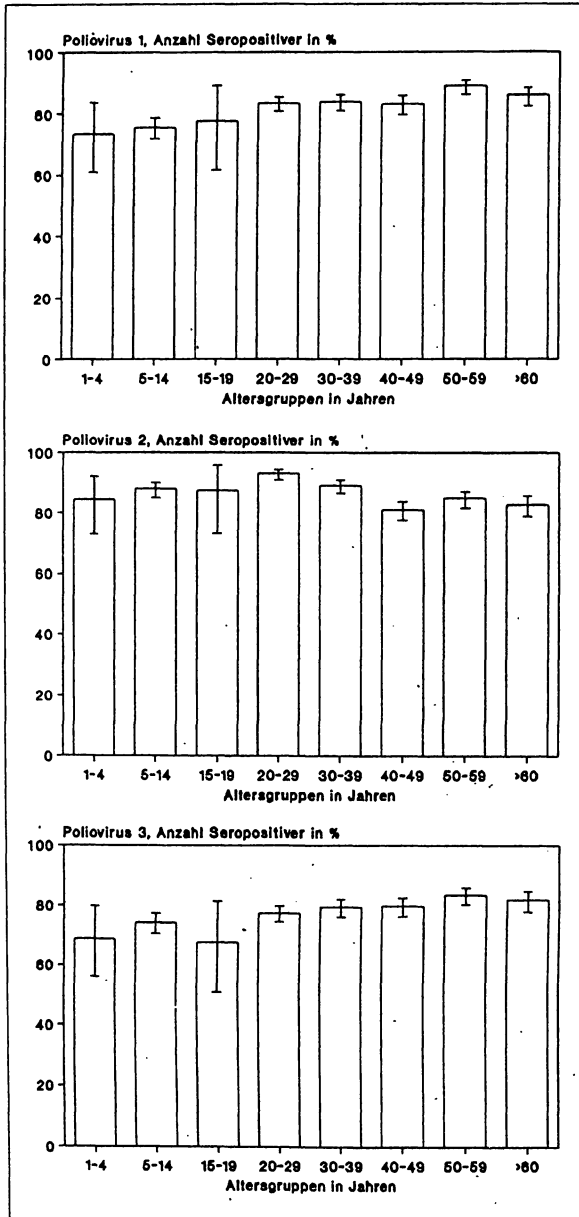


Abb. 2: Altersabhängige Seroprävalenz (95% Konfidenzintervall) gegenüber Poliovirus Typ 1, 2 und 3.

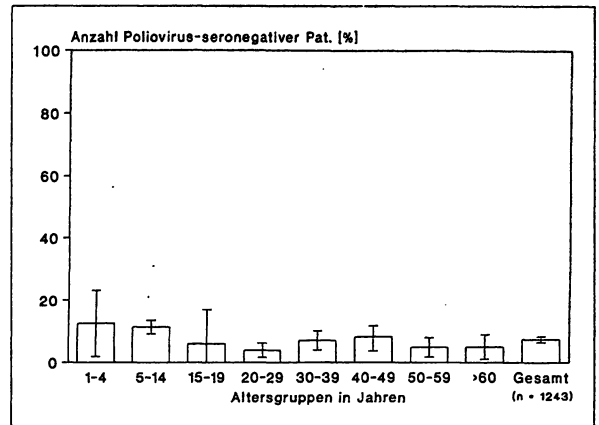


Abb. 3: Altersabhängiger prozentualer Anteil Poliovirus seronegativer Personen (95% Konfidenzintervall).

impfung, der Virusisolierung und der Einzelfallbeschreibung von Ausbrüchen von Poliomyelitis in industrialisierten Ländern von besonderem Interesse. Gerade im Hinblick auf die kürzlich in Finnland und den Niederlanden [3, 10] beschriebenen Fälle von Poliomyelitis ist die regelmäßige Überwachung der Immunität in Risikogruppen (z. B. religiösen Gemeinschaften, die keine Impfung zulassen) sinnvoll. Dabei stellt der Neutralisationstest derzeit die einzige zuverlässige und typenspezifische Untersuchungsmethode zur Kontrolle der serologischen Antwort auf Poliovirus-Infektionen bzw. Impfungen dar. Andere Testsysteme, wie die Komplementbindungsreaktionen oder der ELISA sind nicht für einen typenspezifischen Antikörpernachweis oder für eine Immunitätskontrolle geeignet.

Unsere epidemiologische Untersuchung erbrachte eine Gesamtseroprävalenz gegen Polioviren von ca. 80%. In der Gruppe der Kinder zwischen 1 und 4 Jahren wurde dieser Wert allerdings nicht erreicht. Damit traten bei uns, im Vergleich zu einer Studie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung von Viruskrankheiten (DVV) [6], insgesamt niedrigere Seroprävalenzraten auf. Dort wurde eine altersabhängige Seroprävalenz von mindestens 80% gemessen. Am häufigsten fanden sich Antikörper gegen Poliovirus Typ 2 (96% der Untersuchten zeigten hier eine Immunität). Bei Typ 1 und 2 war der Anteil nur geringfügig niedriger [6]. Die Unterschiede zu der hier vorliegenden Untersuchung mögen in dem hohen Anteil der ausländi-

schen Patienten (19%) liegen, die oftmals aus Ländern stammen, in denen eine generelle Immunisierung bislang nicht vorgenommen wurde (z. B. Türkei).

Insgesamt wurden bei hoher Antikörperprävalenz niedrige Antikörpertiter (1:10) beobachtet. Die durchschnittlichen geometrischen Titer bewegten sich zwischen 1:13,4 (Poliovirus Typ 3) und 1:22,7 (Poliovirus Type 2). 7,4% der untersuchten Seren waren seronegativ gegenüber allen drei Poliovirus-Serotypen. Ein hoher Prozentsatz an Personen zeigte keine komplette Immunität gegenüber allen drei Serotypen. Daher sollte weiterhin die Immunisierung gegen Poliomyelitis empfohlen werden, insbesondere für Reisende in Endemiegebiete.

Die Bestimmung der neutralisierten Antikörper gegen Polioviren wurde in der vorliegenden Untersuchung mittels eines automatisierten Mikroneutralisationstests durchgeführt. Dabei wurden übereinstimmende Ergebnisse zwischen dem konventionellen (manuellen) und dem automatisierten Testsystem beobachtet. Darüber hinaus wurde durch den Einsatz des automatisierten Pipettierroboters eine hohe intra- und inter-Testreproduzierbarkeit erreicht und die Möglichkeit geschaffen, eine große Anzahl von Untersuchungen in relativ kurzer Zeit und mit vertretbarem Arbeitsaufwand durchzuführen.

Dabei wurde eine deutliche Verringerung der benötigten Laborarbeitskraft im Vergleich mit der manuellen Testdurchführung erreicht und damit die Basis für weitere seroepidemiologische Untersuchungen geschaffen.

Literatur:

1. Doerr, H. W., Selb, B. (1988) Bedeutung hoher Durchimpfungsraten am Beispiel der Poliomyelitis. *Medwelt* 39, 1299-1302.
2. Haas, R., Petersen, E. E., Neumann-Haefelin, D., Doerr, H. W., Eggert, E., Enders, G., Firtzlaff, R., Kuwert, E., Lennartz, H., Schmidt, W. A. K. (1979) Untersuchungen über die Immunitätslage gegen Poliomyelitis. *Dtsch. med. Wschr.* 1, 1-8.
3. Hovi, T., Huovilainen, A., Kuronen, T., Pöyry, T., Salama, N., Cantell, K., Kinnunen, E., Lapinleimu, K., Roivainen, M., Stenvik, M., Silander, A., Thoden, C.-J., Salminen, S., Weckström, P. (1986) Outbreak of paralytic poliomyelitis in Finland: Widespread circulation of antigenically altered poliovirus type 3 in a vaccinated population. *Lancet* II, 1427-1432.
4. Kim-Farley, R. J., Bart, K. J., Schonberger, L. B. (1984) Poliomyelitis in the USA: Virtual elimination of disease caused by wild virus. *Lancet* II, 1315-1317.
5. Maass, G., Doerr, H. W. (1986) Untersuchungen zur Immunitätslage gegen Poliomyelitis in Deutschland. *Dtsch. med. Wschr.* 44, 1670-1676.
6. Maass, G., Weber, B., Doerr, H. W. (1991) Untersuchungen zur Immunitätslage gegen Poliomyelitis. *Deutsch. Med. Wschr.* 116, 1457-1462.
7. Robertson, S. E., Chan, C., Kim-Farley, R., Ward, N. (1990) Worldwide status of poliomyelitis in 1986, 1987, and 1988 and plans for its global eradication by the year 2000. *Wild Hlth Stat. Q.* 43, 80-90.
8. Schmidt, N. J. (1979) Cell culture techniques for diagnostic virology. In: *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections*, Hrsg. E. H. Lennette, N. J. Schmidt, S. 65-139. American Public Health Association, Washington, D. C.
9. World Health Assembly (1988) Global eradication of poliomyelitis by the year 2000. Geneva: World Health Organization [Resolution WHA41.28].
10. World Health Organization (1992) Expanded programme on immunization-poliomyelitis outbreak, Netherlands, *Weekly Epidemiol. Rec.* 46, 341-344.

Anschrift der Verfasser:

Dr. Holger Rabenau
 Dr. Bernard Weber
 Gabriele Bauer
 Zentrum der Hygiene
 Institut für Medizinische Virologie
 Paul-Ehrlich-Straße 40
 60596 Frankfurt am Main