

better yields. A simple method for the production of fibrinogen, gamma-globulin and albumin is mentioned. Finally the properties of these fractions and the possibilities of their use in medicine are recalled.

#### Literaturverzeichnis

- [1] *Cohn E. J.*: *Experientia* 3, 125 (1947).
- [2] *Cohn E. J.*: et al.: *J. Am. Chem. Soc.* 68, 459 (1946).
- [3] *Oncley J. L.* et al.: *J. Am. Chem. Soc.* 71, 541 (1949).
- [4] *Cohn E. J.* et al.: *J. Am. Chem. Soc.* 72, 465 (1950).
- [5] *Barandun S.* und *Hässig A.*: Publikation in Vorbereitung.
- [6] *Deutsch H. F.* et al.: *J. Biol. Chem.* 164, 109 (1946).
- [7] *Nitschmann H.*, *Kistler P.* und *Lergier W.*: *Helv. Chim. Acta* 37, 866 (1954).
- [8] *Gellis* et al.: *J. clin. Invest.* 27, 239 (1948).
- [9] *Berger M.*, *Hässig A.* und *Zumstein P.*: *Helv. Chim. Acta* 37, 1554 (1954).

## Ueber die Herstellung und Prüfung der SALK-Vakzine

von Dr. G. Weisflog, Sektionschef am Eidg. Gesundheitsamt, Bern

Der Surgeon-General der Vereinigten Staaten hat die Salk-Vakzine im Mai 1955 wie folgt umschrieben: «Die Vakzine wird derart hergestellt, daß der in ihr verbleibende Rest an infektiösem Virus unterhalb einer Konzentration bleibt, welche vermittels Gewebekultur oder am Affen gefunden werden kann oder die für den Menschen schädlich ist.»

Der Impfstoff besteht aus einer vermittels Formalin inaktivierten Suspension von Poliomyelitisvirus, die aber die Bildung von Antikörpern noch auslösen kann. Er ist das Resultat einer rapiden Entwicklung und intensiven Forschung, welche dank der großzügigen finanziellen Unterstützung durch das amerikanische Publikum ermöglicht worden ist.

Dr. Jonas Salk, nach dem der Impfstoff benannt wird, konnte sich auf folgende grundlegende Erkenntnisse stützen.

1. Enders, Weller und Robbin haben 1949 Poliovirus erstmals auf extra-neuralem Gewebe in vitro gezüchtet.
2. 1951 wurde es klar, daß mindestens drei immunologisch verschiedene Virusarten bestehen, deren Prototypen folgende Namen tragen: Brunhilde (Name eines Schimpansen), Lansing (Stadt in Michigan) und Leon (Knabename aus Los Angeles). Die drei Typen waren somit im Impfstoff zu berücksichtigen.
3. Neben die frühere Hypothese eines streng neurotrophen Infektionsweges trat die Erkenntnis einer möglichen Virämie als transitorischer Zustand zwischen primärer, indifferenter Infektion des Magen-Darm-Traktes und irreversibler Infektion des Nervensystems. Die Anwesenheit von Poliovirus im Blut wurde durch direkte Isolierung, die Unterbrechung des Zyklus durch Verabreichung von Gammaglobulin im Tierversuch sowie in den Feldversuchen der Jahre 1952 bis 1953 bewiesen. Der statistisch ermittelte

kurze Schutzwert jener Aktion (2. bis 6. Woche nach der passiven Immunisierung) und die Unmöglichkeit, ausreichendes Material zu beschaffen, deuten jedoch die Grenzen eines solchen Unterfangens an.

Von einer aktiven Immunisierung wurde eine unmittelbare Antikörperbildung zur Blockierung des Übertritts von Virus aus der Blutbahn ins Zentralnervensystem und, im Hinblick auf eine spätere Infektion, eine ausreichende Sensibilisierung erwartet. Die Polio-Impfung sollte somit die Funktion der Erstinfektion übernehmen, was in einer Bevölkerung, die zufolge guter hygienischer Verhältnisse über keine natürliche Feiung mehr verfügt, eine große Bedeutung haben kann. Die Frage nach der Form des Impfvirus – lebend oder inaktiviert – kann in einem Zeitpunkt, wo die drei Virustypen durch Adaptation an fremde Wirte ihrer humanpathogenen Eigenschaften noch nicht mit Sicherheit beraubt sind, nur zugunsten des inaktivierten Virus ausfallen. Die Bedeutung der Gewebekultur als virologische Methode muß auch von der industriellen Produktion aus gesehen mit Nachdruck betont werden. Die im wissenschaftlichen Laboratorium mit Vorteil verwendeten humanen embryonalen Gewebe aus Muskel, Niere, Lunge, Testikel usw. kommen für die industrielle Vakzineproduktion aus naheliegenden Gründen nicht in Frage; die HELA-Zelle aus karzinomatösem menschlichem Tumor, die seit 1951 in vitro unterhalten wird, dürfte für die Herstellung eines Injektionsmittels bis auf weiteres ebenfalls ungeeignet sein. Vergleichende Untersuchungen mit verschiedenen Organen des Affen haben Dr. Salk bewogen, der Affenniere als Ausgangsmaterial für die industrielle Produktion von Gewebekulturen den Vorzug zu geben.

Außer der laufenden Beschaffung der lebenden Affen und geeigneter Nährmedien, stellen der *Unterhalt und die Erneuerung von Gewebekulturen* und die *Sterilhaltung* von der Autopsie bis zur Ampulle schwere Probleme für die industrielle Massenproduktion dar. Das Prozedere kann wie folgt skizziert werden: Das Tier wird unter Anästhesie entblutet, die Nieren entnommen und eine Nekropsie unter besonderer Berücksichtigung von Lunge und Milz durchgeführt. Die Nieren werden ohne Zeitverlust von der Kapsel und vom Bindegewebe befreit, mit der Schere fein zerhackt, gewaschen und in einer Nährlösung, genannt TCM 199 nach Morgan, Morton und Parker, suspendiert. Diese enthält etwa 50 Komponenten, worunter Aminosäuren, Dextrose, Vitamine, Mineralsalze usw. Der Verwendung von tierischem Eiweiß, wie Pferdeserum, Hühnerembryonalextrakt, Amnionflüssigkeit, Laktalbuminhydrolysat, als Wachstumsfaktoren ist wegen der Sensibilisierungsgefahr gewisse Grenzen gesetzt. Durch Trypsinisieren mit  $\frac{1}{4}$  Prozent Difco-Trypsin wird das Gewebe aufgeschlossen und der Prozeß im geeigneten Moment in der Kälte unterbrochen. Die Herstellung einer brauchbaren Zellsuspension erfordert einige Übung und ist zeitraubend. Ein Nierenpaar liefert etwa 1,5 bis 2 Gramm Zell-

sediment, aus dem mit Nährmedium die gewünschte Suspension von beispielsweise 100 Milligramm Zellen/4 ccm hergestellt wird.

In Kulturflaschen gebracht und schwach mit Nährmedium bedeckt, zur Erzeugung eines regelmäßigen Wachstums in konstanter Schaukelbewegung gehalten, entwickelt sich bei 36 bis 37° auf dem Glasboden ein mehr oder weniger zusammenhängender Zellrasen. Das günstigste  $p_H$  für das Zellwachstum liegt bei 7,2 bis 7,4 und wird mit Phenolrot markiert. Gut wachsende Kulturen verändern die Wasserstoffionen-Konzentration ziemlich rasch und werden mit Bikarbonat nötigenfalls wieder alkalisch gemacht. Das optimale Zellwachstum ist in 7 bis 8 Tagen erreicht. Die Nährlösung wird in diesem Stadium erneuert und mit Virus infiziert, worauf nach etwa vier Tagen eine brauchbare Virus-konzentration gewonnen, filtriert und titriert werden kann; ein Titer von  $10^{-6}$  wird als brauchbar bezeichnet.

Zur *Inaktivierung* des Virus bei 36° C dient Formalin in einer Endverdün-nung von 1 : 4000. Durch laufende Proben erstellt man eine Inaktivierungs-kurve und verlängert die Kontaktzeit über die Nulllinie hinaus im Sinne einer Sicherheitsmarge. Das Formalin wird in der Folge mit Natriumbisulfit neutra-lisiert. Es ist klar, daß bei der Inaktivierung die größte Sorgfalt aufgewendet werden muß.

Über die *Prüfung von Poliomyelitis-Impfstoffen* hat das National Institute of Health in Washington am 12. April 1955 sogenannte *Minimalanforderungen* herausgegeben, die inzwischen durch vier Supplemente ergänzt bzw. verschärft worden sind (19. April, 26. Mai, 10. September, 11. November 1955). Die eben-falls 1955 im « Hessischen Staatsanzeiger » publizierten deutschen Vorschriften<sup>1)</sup> deckten sich weitgehend mit den ersten U. S. « Requirements »<sup>2)</sup> und umfaßten :

- a) eine klinische und pathologisch-anatomische Untersuchung der Affen, deren Nieren für die Gewebekultur zur Herstellung von Impfstoffen verwendet werden;
- b) die Typenbestimmung;
- c) die Bestimmung des Infektionstiters;
- d) die Messung der Inaktivierungsgeschwindigkeit sowie
- e) den Nachweis des Freiseins von vermehrungsfähigem Kinderlähmungsvirus und anderen Keimen;
- f) die Prüfung auf Schutzkraft.

Jede inaktivierte Virussuspension wird vorerst einem *Sicherheitstest auf Gewebekulturen* unterzogen und nach einem eventuellen zytopathogenen Effekt gefahndet. Der Musteranteil am Gesamtvolumen, das Verhältnis Inokulum zu

---

<sup>1)</sup> Die deutschen Minimalanforderungen 1955 sind gegenwärtig sistiert und werden über-arbeitet.

<sup>2)</sup> Wir beschränken uns auf die Darstellung der Grundzüge des Verfahrens unter bewußtem Verzicht auf unzählige Einzelheiten. Auf die in den U.S.-Anforderungen eingetretenen Modi-fikationen wird zurückgekommen.

Nährflüssigkeit und die Zahl der Proben ist genau vorgeschrieben. Nach einer Beobachtungszeit von 7 bzw. 14 Tagen werden Subkulturen angelegt. Analog wird mit der fertigen Mischung der drei Virussuspensionen verfahren.

Ein zweiter *Sicherheitstest* wird *am lebenden Affen* (Rhesus- oder Cynomolgus-Affen) durch intramuskuläre bzw. intrazerebrale Beimpfung geführt. Bei sämtlichen Affen ist am Ende der Beobachtungszeit oder unmittelbar nach vorzeitigem Tod eine histopathologische Untersuchung, besonders von Hirn und Rückenmark, auf Anzeichen von übertragbarer Kinderlähmung vorzunehmen. Die Gewebekultur wird als empfindlicher als der Affe bezeichnet. Der verprüfte Musteranteil pro HerstellungschARGE ist beträchtlich und beträgt in den USA 4½ Liter, unabhängig vom Produktionsvolumen.

Parallel wird auf Abwesenheit von vermehrungsfähigem B-Virus (Sabin) am Kaninchen und von vermehrungsfähigem Virus der lymphozytären Choriomeningitis an der Maus geprüft.

*Prüfung auf Schutzkraft des Impfstoffes.* Die amerikanischen *Minimum Requirements* lassen die Wahl zwischen einer Gehaltsbestimmung der neutralisierenden Antikörper im Serum geimpfter Mäuse oder geimpfter Affen. In Schweden beurteilt S. Gard den Impfstoff an Hand der größten Verdünnung, die im Meerschweinchen noch Antikörper bildet. Die deutschen Minimalanforderungen bedienen sich für den Wirksamkeitstest ebenfalls des Meerschweinchens; durch Herzpunktion von 15 Tieren werden im Abstand von drei Wochen vor und nach der Impfung Mischseren gewonnen; ein minimaler Titeranstieg um das Vierfache ist für die Zulassung Bedingung. Die Auswertung erfolgt gegen 50 oder 100 DCPm (Dosis cytopathogenia media) der drei Typen, die Beurteilung an Hand des zytopathogenen Effektes oder im sogenannten  $p_H$ -Test; bei dieser letzten Methode macht man sich den rotgelben Farbumschlag des Indikators Phenolrot in wachsenden bzw. durch Virus geschädigten Gewebekulturen zu Nutzen, um den Antikörpertiter des Serums zu bestimmen. Der Wirksamkeitstest ist natürlich nur von relativem Wert und nur bedingt auf den Menschen übertragbar; auch gibt er keine Auskunft über die Dauer des Impfschutzes.

Grundsätzliche Unterschiede in der Herstellungstechnik der verschiedenen inaktivierten Impfstoffe sind heute nicht bekannt. Dagegen werden nicht von allen Herstellern die gleichen Virusstämme verwendet:

USA, Canada	Mahoney, MEF I, Saukett
Dänemark, Deutschland	Brunhilde, MEF I, Saukett
England	Brunhilde <sup>1)</sup> , MEF I, Saukett und Brunhilde <sup>1)</sup> , YSK, Leon (Versuch 1956)
Südafrika	Brunhilde, Collans, Templeon (letzte zwei lokaler Provenienz)

---

<sup>1)</sup> Von Sabin durch Passage über Schimpansen abgeschwächte Variante.

Der deutsche Impfstoff (Behringwerke) enthält im Gegensatz zum amerikanischen Impfstoff Aluminiumhydroxyd als Aktivator, von dem man sich eine Verstärkung der immunisatorischen Wirkung verspricht. Das Garantiedatum des amerikanischen Impfstoffes beträgt sechs Monate, dasjenige der deutschen Impfstoffe 12 Monate. Die amerikanischen Vorschriften lassen folgende Konservierungsmittel zu: *Thimerosal* kombiniert mit dem Komplexbildner Natrium-Äthylendiamintetraessigsäure (Versene), *Benzethoniumchlorid* (Phemerol), eine quaternäre Ammoniumbase und *Nipacombin*.

Die mit der Polio-Impfung in Zusammenhang stehenden Impfwischenfälle in den USA sind zur Genüge kommentiert worden. Nachdem der unter der Bezeichnung «*Francis-Report*» bekannte ausführliche Bericht des «*Poliomyelitis Evaluation Center, University of Michigan*» den Erfolg des großen Feldversuches 1954, welcher 1 829 916 Kinder (Geimpfte, Ungeimpfte und Placebos) umfaßte, verkündet hatte und die Massenimpfung 1955 bereits organisiert war, sind eine Reihe von Impfungen (79) im Zeitraum von 4 bis 14 Tagen erkrankt und haben teilweise weitere Personen ihrer Umgebung angesteckt. Der verantwortliche Impfstoff entstammte zum größten Teil aus der gleichen Produktionsstätte, während im selben Zeitraum etwa 4 Millionen Dosen anderer Provenienz ohne Zwischenfälle verabreicht worden sind. Die Überprüfung der Fabrikationstechnik und Kontrollmethoden führte zu folgenden Erwägungen: Gestützt auf die Salkschen Versuche wird angenommen, daß sich die Formalin-Inaktivierung als Reaktion erster Ordnung vollzieht; die Beziehung zwischen dem Logarithmus der Konzentration des lebenden Virus und der Inaktivierungsdauer kann als Gerade dargestellt werden; diese schneidet die Abszisse im allgemeinen am dritten Tag. Wird die Inaktivierung im Sinne einer Sicherheitsmarge bis am 9. Tag verlängert, so durfte auf Grund der *Laboratoriumserfahrungen* eine absolute Sicherheit angenommen werden. In der *industriellen Produktion* verlief nun aber die Inaktivierung nicht immer linear, was nach Auffassung des «*U. S. Technical Committee on Poliomyelitis Vaccine*» auf die Anwesenheit von Virus-Aggregaten (Mitwirkung von Reaktionsprodukten der Nährflüssigkeit, Präzipitate usw.) und damit von durch Formalin nicht erreichbaren Virusteilchen zurückzuführen ist. Das neueste Supplement der offiziellen Prüfungsvorschriften verlangt daher, daß am Ende der ersten Inaktivierungsperiode eine zweite Seitzfiltration eingeschaltet wird; die genannten Präzipitate oder Aggregate sollen beseitigt werden. Die Bestimmungen wurden auch in dem Sinne verschärft, daß pro Herstellungssatz nunmehr mindestens 4½ Liter auf Gewebekulturen verprüft werden müssen, während zu diesem Zweck früher durchwegs 1% des Lots aufgewendet wurde. Das erhöhte Kontrollvolumen soll mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,99999 die Abwesenheit von mehr als fünf infektiösen Einheiten pro Liter garantieren (5 Einheiten als Basis der Berechnung angenommen). Als weitere Neuerung wird beim Unschädlichkeitstest am Affen gleichzeitig 200 mg Cortisonazetat gespritzt, nach-

dem als erwiesen gilt, daß die Anfälligkeit gegenüber gewissen Infektionen, im besonderen Virusinfektionen, durch Cortison gesteigert wird. (Nach anderen Informationen soll eine zeitliche und graduelle Staffelung der Cortisongaben vorzuziehen sein.) Schließlich wurde der Zusatz von Konservierungsmitteln, der vorübergehend aufgegeben war, wieder eingeführt.

Die allgemeine Tendenz geht somit dahin, das zu verprüfende Volumen zu erhöhen, die Empfindlichkeit der Kontrollmethoden zu steigern und besonders virulente Virusstämme, vorab der Mahoney-Stamm, auszuschließen. Die Prüfung des Impfstoffes ist aber nicht nur ein quantitatives Problem – der Aufwand an Nährböden ist außergewöhnlich groß –, sondern steht auch in engem Zusammenhang mit der Empfindlichkeit der Affennierenzellkulturen und Testtieren gegenüber eventuellen Virusresiduen. Es ist daher erstrebenswert, die einzelnen Chargen nicht nur durch den Hersteller, sondern Lot für Lot noch durch mindestens einen zweiten Prüfer kontrollieren zu lassen.

Die in der *Schweiz geltenden Vorschriften* für das Inverkehrbringen von Impfstoffen ganz allgemein verpflichten das Eidgenössische Gesundheitsamt, von jeder HerstellungschARGE, gleichgültig ob sie im Lande hergestellt oder importiert wird, Muster auf Unschädlichkeit und soweit möglich auf Wertigkeit zu prüfen. Das Gesundheitsamt verfügt zur Prüfung des Polio-Impfstoffes über ein kleines Laboratorium, in dem die Prüfung auf Abwesenheit von vermehrungsfähigem Virus in der Affennierengewebekultur durchgeführt werden kann. Die Wertigkeit wird am Meerschweinchen gemessen. Selbstverständlich ist das Laboratorium auch in der Lage, Humanseren auf ihren Gehalt an neutralisierenden Antikörpern zu prüfen (vor und nach der Impfung).

Die Ereignisse der letzten Monate und die Verbesserung der Herstellungstechnik bzw. Kontrollvorschriften haben zu einer Verlangsamung der Produktion und der Verteilung des Salk-Impfstoffes geführt. Epidemiologen und Statistiker sind zu einer kritischen Würdigung der bisherigen Resultate und der weiteren Entwicklung geschritten, die noch nicht in allen Teilen abgeklärt ist. Insbesondere werden in nächster Zeit Fragen der Impfschutzdauer, der Sensibilisierung der untern Altersklassen und des Einflusses auf die natürliche Durchseuchung Anlaß zu ausgedehnten Studien geben.

#### *Zusammenfassung:*

Man erwartet von der aktiven Immunisierung mit Poliomyelitis-Impfstoff eine Blockierung des Virus im transitorischen Zustand der Virämie und, im Hinblick auf spätere Infektionen, eine ausreichende Sensibilisierung. Die Frage nach der Form des Impfstoffes – lebend oder inaktiviert – kann heute nur zugunsten der formalinaktivierten Vakzine nach der Methode *Salk* ausfallen. Die Gewinnung brauchbarer Viruskonzentrationen erfolgt aus der überstehenden Nährlösung von Affennieren-Zellkulturen. An Hand einer Inaktivierungskurve, deren linearer Verlauf zur Diskussion steht, ist die Inaktivierungsgeschwindigkeit festzustellen. Die Inaktivierung entscheidet über die Sicherheit der Vakzine (Abwesenheit von vermehrungsfähigem Virus) und den Verlust

an antigener Wirkung. Eine strenge Sicherheits- und Wirksamkeitskontrolle mit größeren Muster-Volumina jedes Herstellungssatzes ist angezeigt; der Sicherheitstest wird sowohl am lebenden Affen als auch auf Gewebekulturen über drei Passagen geführt. Der personelle und materielle Aufwand ist groß. Die in letzter Zeit vorgenommenen technischen Verbesserungen bezüglich Fabrikation und Kontrolle werden in großen Zügen beschrieben.

*Résumé:*

L'immunisation active au moyen du vaccin antipoliomyélique est appelée à bloquer le virus dans l'état transitoire de la virémie et, eu égard aux infections ultérieures, à produire une sensibilité suffisante. La question du vaccin – vivant ou inactivé – doit être réglée actuellement en faveur du vaccin inactivé à la formaline, d'après la méthode Salk. Des concentrations adéquates de virus sont récupérées du milieu surnageant de cultures de reins de singes. La rapidité d'inactivation est établie au moyen d'une courbe d'inactivation dont le tracé linéaire est encore en discussion. L'inactivation décide de la sécurité du vaccin et de la perte de capacité d'immunisation. Un contrôle serré au moyen de quantités considérables prélevées sur chaque lot de fabrication est indiqué; l'épreuve de sécurité (absence de virus actif) est faite sur des singes vivants et sur des cultures de tissus avec trois passages consécutifs. Le contrôle demande un effort considérable aussi bien en ce qui concerne le matériel que le temps. Les dernières améliorations techniques dans la fabrication et dans les laboratoires de contrôle sont décrites à grands traits.

**Bibliographie.**

*Bodian D.:* Background for active immunization against poliomyelitis, *Pediatrics*, 15, 107 (1955).

*Salk E. et alii:* Studies in human subjects on active immunization against poliomyelitis, *Am. J. Publ. Health* 44, 994 (1954).

*Salk E., I. S. Youngner and E. N. Ward:* Use of color change of phenol red as the indicator in titrating poliomyelitis virus or its antibody in a tissue-culture system, *Am. J. of Hygiene* 60, 214 (1954).

*Evaluation of 1954 field trial of poliomyelitis vaccine, summary report;* Vaccine evaluation center, University of Michigan, April 12 (1955) (Francis-Report).

*Brownlee K. A.:* Statistics of the 1954 Polio Vaccine Trials, *J. Am. Statistical Assoc.* 50, 1005 (1955).

*Minimum Requirements:* U. S. Department of Health, Education, and Welfare National Institutes of Health Bethesda, 1st Revision April 12 (1955).

*Minimum Requirements:* U. S. Department of Health, Education, and Welfare National Institutes of Health Bethesda, Amendments 1-4.

*Technical Report on Salk poliomyelitis vaccine:* U. S. Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service (1955).

*Poliomyelitis Vaccination, a preliminary Review:* Wld Hlth. Org. Techn. Rep. Ser. 1956, 101 (Feb.).