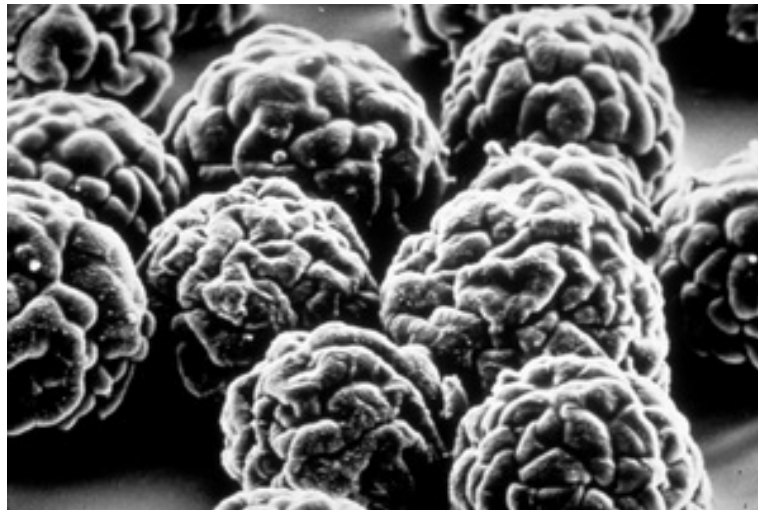


Kwantificatie van de identiteits PCR voor IPV en OPV vaccins

Quantification of the identity PCR for IPV and OPV vaccines



Afstudeerverslag

Timo ter Braak
23 mei 2014
Bilthoven

Bilthoven Biologicals
Cyrus Poonawalla Group
Afdeling: Quality Control Virology
Antonie van Leeuwenhoeklaan 9-11
3721 MA Bilthoven
Stagebegeleidsters: L. Levels & K. Verheijen

Hogeschool Utrecht
Institute for Life Science & Chemistry
Richting: Biomolecular Research
F.C. Dondersstraat 65
3572 JE Utrecht
Schoolbegeleider: R.J. Veldman

Voorwoord

Ter afronding van mijn opleiding Life Science, afstudeerrichting Biomolecular research aan de Hogeschool Utrecht, heb ik mijn afstudeeropdracht uitgevoerd bij Bilthoven Biologicals, afdeling QC-LBV. Ik heb genoten van de tijd die ik hier heb doorgebracht voor het kwantificeerbaar maken van de identiteits PCR voor IPV en OPV vaccins.

Ik wil graag de volgende mensen bedanken voor alle hulp bij het tot stand brengen en beoordelen van mijn experimenten en het schrijven van mijn scriptie. In het bijzonder wil ik mijn stagebegeleidsters Lonneke Levels en Karlijn Verheijen bedanken, voor de tijd die jullie, naast jullie eigen werk, beschikbaar hebben gesteld om mijn afstuderen te begeleiden. Verder wil ik mijn schoolbegeleider Robert Jan Veldman en alle medewerkers binnen QC bedanken voor de hulp en gezelligheid tijdens deze periode, bedankt!

Samenvatting

Het poliovirus bestaat uit drie serotypen. Deze serotypen kunnen poliomyelitis veroorzaken bij mensen en primaten. Dit kan resulteren in spiervlammingen met lichaamsmisvorming of dood tot gevolg. Om poliomyelitis te voorkomen zijn er in de loop der jaren twee soorten vaccins ontworpen. Het geïnactiveerde poliovaccin (IPV) waarbij formaldehyde wordt gebruikt om het virus te inactiveren, waardoor het virus zijn virulentie verliest. Het IPV wordt toegediend d.m.v. injectie en bestaat uit de serotypen 1 (Mahoney), 2 (MEF-1) en 3 (Saukett). Daarnaast is er een makkelijker en goedkoper vaccin ontworpen, het oraal poliovaccin (OPV). Hierbij is het virus, d.m.v. mutaties in het RNA genoom, nog wel virulent alleen kan het geen poliomyelitis meer veroorzaken en door langzamere replicatie heeft het lichaam voldoende tijd om antilichamen tegen het poliovirus te maken. Het OPV wordt toegediend via de orale route en bestaat uit de typen Sabin 1, Sabin 2 en Sabin 3. Tijdens de productie van deze vaccins wordt er gecontroleerd op werkzaamheid, veiligheid en identiteit. Dit gebeurt o.a. met de D-antigeen en virustitratie testen. De virustiter en identiteit kunnen ook d.m.v. een quantitative polymerase chain reaction (qPCR) met hydrolyse probes bepaald worden. Om de qPCR als aanvulling of vervanging te kunnen gebruiken, moet er eerst RNA geïsoleerd worden uit de vaccins. Hiervoor zijn de automatische en de spinkolommen methoden met elkaar vergeleken. De geautomatiseerde methode, met de MagNA pure, is voor het vervolg van dit onderzoek gebruikt vanwege de verminderde kans op contaminatie en voor zijn efficiëntie. Verder laat het gelijkwaardige resultaten zien t.o.v. de spinkolommen. Om de virustiter met de qPCR te kunnen bepalen moeten de typen vaccins met de huidige primersets goed van elkaar te onderscheiden zijn. Hiervoor zijn de verschillende vaccins onderling gemengd en getest. Alleen type 1 van IPV en OPV tonen onderlinge kruisreactiviteit, die wel te onderscheiden is van elkaar. Verder zijn er verdunningsreeksen van de vaccins gemaakt met een bekende virustiter, verkregen uit de CCID₅₀ test, om de PCR resultaten hieraan te kunnen correleren. Vooral bij IPV is een matrixeffect geconstateerd wat invloed heeft op de verdunningsreeks resultaten. De oorzaak van het matrixeffect blijkt o.a. bij medium 199 te liggen waarin de vaccins zich bevinden door het productieproces. Wanneer phosphate buffered saline wordt gebruikt als verdunningsmiddel, dan verminderd dit het matrixeffect bij IPV type 1 en 2, en wordt daarom ook aangeraden om in de toekomst te gebruiken. Voor verdere optimalisering van de qPCR moet de detectie grens worden bepaald en standaards, voor het kwantificeren van onbekende samples, worden gemaakt.

Abstract

The poliovirus consists of three serotypes. These serotypes can cause poliomyelitis in humans and primates. Poliomyelitis can induce muscle paralysis which could result in body disfigurement or death. Over the years, in order to prevent poliomyelitis, two types of vaccines were developed. Firstly the inactivated polio vaccine (IPV). This vaccine contains formaldehyde which inactivate the polio virus. In result the virus loses its virulence. IPV is administered by injection and consists of the serotypes 1 (Mahoney), 2 (MEF -1) and 3 (Saukett). In addition, there is an easier and cheaper vaccine designed, the oral polio vaccine (OPV). This vaccine contains live attenuated poliovirus which has mutations in its RNA genome. Due to these mutation the virus is still virulent but can no longer cause poliomyelitis and because of a reduced replication speed, the body has enough time to make antibodies against the poliovirus. OPV is administered by the oral route, and consists of the Sabin types 1, Sabin 2 and Sabin 3. The production process of these vaccines are monitored for efficacy, safety and identity. This is done for example with the D-antigen and virus titration tests. The virus titer and identity may also be determined by a quantitative polymerase chain reaction (qPCR) with hydrolysis probes. In order to use this qPCR as an additional or alternative test, the viral RNA must be isolated. For this purpose, the automatic and the spin columns methods were compared with each other. The MagNA pure procedure was chosen for RNA isolation to reduce risks of contamination and due its efficiency. Furthermore, it showed similar results compared to the spin columns. In order to determine the virus titer with the qPCR, the different types of primer sets currently used should show high specificity to differentiate the samples from each other. To test the specificity, the samples are mutually mixed. Only type 1 of OPV and IPV showed cross-reactivity, but these strains could still be differentiated from each other. Furthermore, in order to correlate a known viral titer, obtained from the CCID₅₀ test, a series of dilutions of the vaccines have been made and tested by qPCR. The results have shown a matrix effect which influences the outcomes of these serial dilutions. The cause of the matrix effect appeared to be medium 199 which is added during the production process of these vaccines. When phosphate buffered saline is used as the diluent, then the matrix effect of IPV types 1 and 2 is reduced, and therefore phosphate buffered saline is recommended to use in the future. The qPCR needs further optimisation to investigate the limit of detection before creating the standards for quantifying unknown samples.



Afkortingen

CCID ₅₀	- Cel cultuur infectieuze dosis
CD155	- Cluster of differentiation 155
cDNA	- Copy DNA
Ct	- Cycli threshold
dNTPs	- Deoxyribonucleotide triphosphate
DU	- D-antigeen units
ELISA	- Enzyme-linked immunosorbent assay
IPV	- Geïnactiveerd polio vaccin
LAP	- Levend afgezwakt poliovaccin
M199	- Medium 199
MAPREC	- Mutant analysis by PCR and restriction enzyme cleavage
OPV	- Oraal polio vaccin
PBS	- Phosphate buffered saline
QC	- Kwaliteitscontrole
qPCR	- Quantitative polymerase chain reaction
VDPV	- Vaccine-derived poliovirus
VP	- Viraal proteïne
VPg	- Viral protein genome-linked
WHO	- World health organisation

Inhoudsopgave

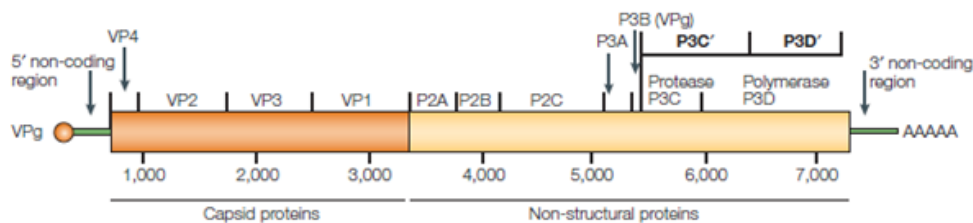
Voorwoord	1
Samenvatting.....	2
Abstract	3
Afkortingen.....	4
1. Achtergrond.....	6
1.1 Poliovirus	6
1.2 Vaccin	7
1.2.1 IPV.....	7
1.2.2 OPV	7
1.3 Kwaliteitscontrole (QC)	8
1.3.1 D-Antigeen ELISA.....	8
1.3.2 Virustitratie in cellen en inactivatie.....	8
1.3.3 Real-time Polymerase chain reaction.....	9
1.4 Doelstelling.....	11
2. Materiaal en methode.....	12
2.1 Poliovirussen	12
2.2 RNA isolatie	12
2.2.1 Spinkolom.....	12
2.2.2 Automatisch	12
2.3 qPCR	12
2.3.1 Positieve waarden	13
2.4 Virustitratie.....	13
3. Uitvoering en resultaten	14
3.1 RNA isolatie methode.....	14
3.2 Identiteit.....	16
3.3 Verdunningsreeks M199	17
3.4 qPCR verloop	19
3.5 Fractie 4.1 en 5.1	20
3.6 Verdunningsmedium PBS	21
4. Conclusie en discussie	22
5. Literatuur.....	24
6. Bijlagen	25

1. Achtergrond

Poliomyelitis is een virusinfectie die zorgt voor de afbraak van motorneuronen bij mensen, die wordt veroorzaakt door het poliovirus. Dit heeft ernstige gevolgen zoals spierverlammingen die op hun beurt zorgen voor lichaamsmisvormingen of zelfs de dood. Om dit te voorkomen worden kinderen al op jonge leeftijd gevaccineerd met een polio vaccin.

1.1 Poliovirus

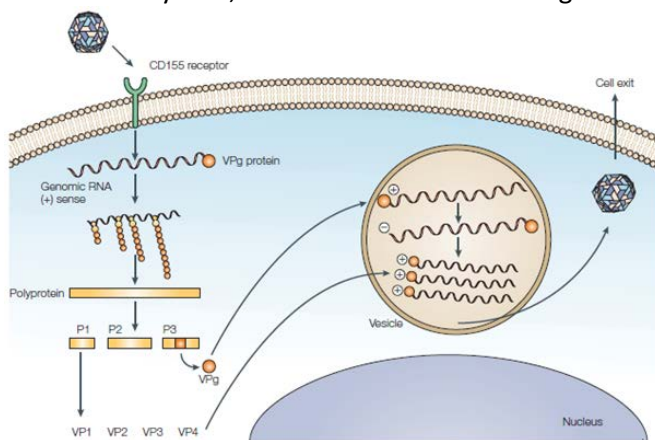
Het poliovirus is een enterovirus en behoort tot de familie van de *Picornaviridae*. Dit virus heeft een diameter van 28nm en is daarmee het kleinste virus waar alleen mensen en primaten vatbaar voor zijn. Het virus heeft een capside, bestaande uit vier verschillende virale proteïnen (VP1, VP2, VP3 en VP4), wat kan binden aan de CD155 receptor op het celmembraan. Binnenin het capside bevindt zich het erfelijke materiaal wat bestaat uit enkelvoudig positief sense RNA zoals mRNA (**figuur1**). Een verschil met mRNA is de 5'zijde, hier bevindt zich het VPg(viral protein genome-linked) eiwit dat werkt als primer voor de RNA synthese. En aan de 3'zijde een poly(A) staart voor de translatie van het RNA naar virus eiwitten. Dit genoom bestaat in totaal uit ongeveer 7440 basen. Het eerste gedeelte van het genoom codeert voor 60 kopieën van de VPs. Variaties in dit gebied zorgen voor een licht verschil in de eiwitmantel. Dit resulteert in 3 serotypes met verschillende virulentie.^{1,2,3,4}



Figuur 1 Het poliovirus genoom.⁵

Na infectie van één serotype zal het lichaam geen bescherming opbouwen tegen de andere twee serotypen. Eenmaal binnenin het lichaam kan polio zich hechten aan de CD155 receptor op cellen en de cel binnengaan (**figuur 2**). Hierna volgt translatie en replicatie waaruit nieuwe virussen voort komen. 4 tot 6 uur na infectie van een cel kunnen tot ongeveer 10.000 polio virussen vrijkomen.⁶ Eenmaal geïnfecteerd zal er in zo'n 95% van de gevallen nauwelijks tot geen symptomen optreden. Treden er wel symptomen op, dan worden deze in drie fasen verdeeld:

1. Prodromaal, een tijdelijk ziek gevoel zonder neurologische verschijnselen.
2. Pre paralytisch, naast een ziek gevoel ontstaat er ook pijn in spieren.
3. Paralytisch, motorneuronen raken aangetast en verlamming treed op.



Figuur 2 Infectie van een cel door het poliovirus waarna het virale genoom codeert voor de benodigde eiwitten en repliceert om weer nieuwe virussen te maken.⁵

1.2 Vaccin

Om infectie te voorkomen zijn er in de loop der jaren twee vaccins ontworpen, waaronder het geïnactiveerde polio vaccin (IPV) en het oraal polio vaccin (OPV), bestaande uit verzwakte virussen. Deze vaccins bestaan uit een trivalente mix van de drie serotypen voor volledige bescherming. Sinds 1988 is het Global Polio Eradicatie Initiatief opgezet door de Wereld Gezondheids Organisatie (WHO) om polio in de hele wereld uit te roeien. Dit heeft ervoor gezorgd dat vandaag de dag in nog maar enkele landen in Afrika en Azië polio als ziekte voorkomt.⁷

1.2.1 IPV

IPV is voor het eerst ontwikkeld in 1952 door Jonas Salk en wordt hierdoor ook wel het Salk vaccin genoemd. De vaccins, Salk type 1 (Mahoney), 2 (MEF-1) en 3 (Saukett), zijn gebaseerd op drie wildtypen (**tabel 1**). De virusstammen worden gecultiveerd in Vero cellen. Dit zijn cellen die onder bepaalde condities *in vitro* groeien. Om te voorkomen dat deze cellen stoppen met delen door een te hoge cel dichtheid worden er subculturen gemaakt. Met deze passages wordt er een kleine hoeveelheid cellen overgezet in een nieuwe fles. Om vervolgens verder te groeien. Vero cellen kunnen veel passages ondergaan voordat er verandering optreedt en zij tumorigeen worden. Hierdoor zijn deze cellen zeer geschikt voor de productie van vaccins. Na het oogsten van het virus vinden er een aantal zuiveringstappen plaats voordat het geïnactiveerd wordt. Deze inactivatie wordt gedaan door toevoeging van formaldehyde. Hierna is het virus niet meer in staat cellen te infecteren maar het bevat nog steeds antigeniciteit.⁸ De toedieningsroute van het Salk vaccin is via een injectie.

1.2.2 OPV

OPV ook wel levend afgezwakt poliovaccin (LAP) is ontwikkeld in 1958 door o.a. Albert Sabin. De drie wild typen hebben, door passage in niet humane cellen, spontane mutaties gekregen in het virale genoom. De virusstammen worden door deze mutaties minder virulent. Vervolgens worden de gemuteerde stammen, genaamd Sabin type 1, 2 en 3, net zoals de wild typen stammen voor IPV gecultiveerd in Vero cellen. In tegenstelling tot IPV wordt er bij OPV niet geïnactiveerd. Tussen elk wild type en OPV type zijn een verschillend aantal mutaties. In **tabel 1** zijn de verschillende typen weergegeven en de homologie die OPV nog heeft met IPV, waarbij type 1 het meest homoloog is. Door deze mutaties is het virus niet in staat om efficiënt te repliceren in zenuw weefsel, waardoor er geen poliomyelitis kan ontstaan. OPV wordt toegediend via de orale route en is hierdoor sneller en gemakkelijker toe te dienen dan IPV. Doordat OPV nog repliceert in de darmen kan het via de ontlasting zich verspreiden binnen een gemeenschap en zo meer mensen beschermen. Een probleem bij OPV is dat het mogelijk terug kan muteren naar een virulent virus dat verlamming kan veroorzaken, het zogeheten vaccine-derived poliovirus (VDPV). Voor kwaliteits controle kunnen er verschillende testen gebruikt worden om mutaties te vinden, welke verantwoordelijk zijn voor virulentie, zoals de mutant analysis by PCR and restriction enzyme cleavage (MAPREC) en massively parallel sequencing.^{9, 10, 11}

Tabel 1

Serotypes met de daarbij behorende IPV en OPV vaccines en de sequentie homologie daartussen.⁹

Type	IPV (Salk)	OPV (Sabin)	Homology
1	Mahoney	Sabin 1	99,2%
2	MEF-1	Sabin 2	82,5%
3	Saukett	Sabin 3	88,1%

1.3 Kwaliteitscontrole (QC)

Tijdens het productie proces van poliovaccins worden er verschillende controles uitgevoerd om ervoor te zorgen dat het vaccin veilig is om toegediend te worden. Er wordt getest op o.a. werkzaamheid, veiligheid en identiteit van de vaccins. De testen die hieronder vallen verschillen voor IPV en OPV en zijn weergegeven in **tabel 2**.⁹

Tabel 2

Overzicht van de controles met de daarbij behoorde testen per soort vaccin.

Controles	IPV	OPV
Werkzaamheid	D-antigeen	Virustitratie
Veiligheid	Inactivering	MAPREC
Identiteit	D-antigeen	Inactivering/PCR

1.3.1 D-Antigeen ELISA

Twee duidelijk te onderscheiden antigeen structuren zijn de C en D antigenen. D antigeen is immunogeen en komt tot expressie op het wild type. D antigeen conformeert in C antigeen door een hitte behandeling en is dan niet meer immunogeen. Antilichamen reageren vooral op D-antigeen wanneer het lichaam hersteld van de ziekte en is daarom een belangrijke meetwaarde in QC voor de werkzaamheid van poliovaccins. Daarnaast verschillen de 3 typen onderling in het aantal D-antigeen units (DU):

Type

1. 40 DU
2. 8 DU
3. 32 DU

De D-antigeen ELISA wordt uitgevoerd d.m.v. een enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Waarbij het antigeen op een met antilichaam gecoate plaat wordt gebracht en hieraan bind. Vervolgens wordt de plaat geïncubeerd met D-antigeen specifieke antilichamen met daaraan een enzym. Dit enzym kan dan een substraat omzetten wat zorgt voor een kleur verandering waarvan de extinctie gemeten kan worden. Doordat de antilichamen ook specifiek voor het type zijn kan hierdoor de identiteit ook aan afgeleid worden.^{12, 13, 14}

1.3.2 Virustitratie in cellen en inactivatie

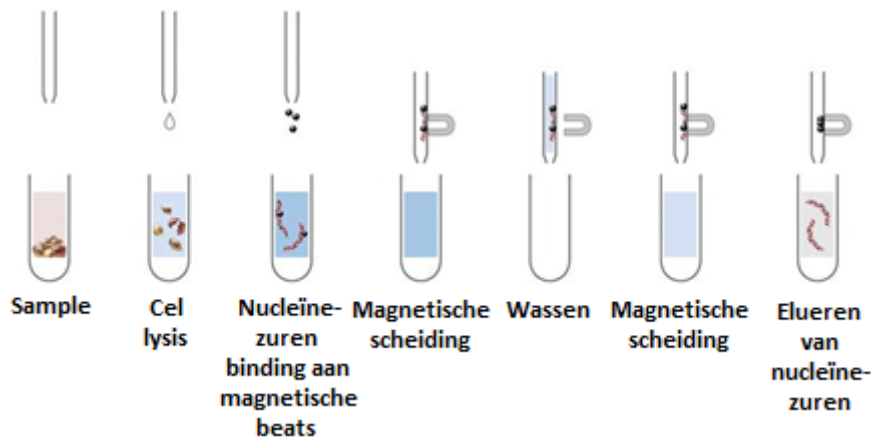
De cel cultuur infectieuze dosis (CCID₅₀) wordt gebruikt om de titer te bepalen van levend polio. Bij IPV zal dit plaatsvinden voordat het geïnactiveerd is en in het geval van OPV kan dit op ieder moment gebeuren. Eerst worden er platen gecultiveerd met Vero cellen, vervolgens worden er verdunningsreeksen van het virus toegevoegd en geïncubeerd. Na 7 dagen wordt er microscopisch gekeken naar de cellen. Wanneer er afgestorven cellen worden gevonden is de verdunning positief qua virus. En de cellen die nog volledig intact zijn worden als negatief beschouwd. Deze gegevens worden m.b.v. de Reed & Münch rekenmethode omgezet in een titer waarde voor elk type vaccin. De titer is nodig voor het uiteindelijke trivalente vaccin waarin een bepaalde hoeveelheid van elk type in terecht komt. Ook bepaald de virustiter de werkzaamheid van OPV. Naast de titer wordt er tevens gekeken naar de identiteit van het virus door, op een met cellen gecultiveerde plaat, antistoffen toe te voegen tegen één van de typen en vervolgens het virus. Waar er geen celdood plaatsvindt, kan er verband worden gelegd tussen het toegevoegde antilichaam en dus welk type virus er geneutraliseerd is. Ook wordt de inactivering ofwel veiligheid van IPV getest met samples van 5 op een volgende dagen uit het inactiveringsproces. De curve die hieruit komt moet eindigen in een inactief vaccin waarbij geen cellen meer afsterven.

1.3.3 Real-time Polymerase chain reaction

Met de real-time polymerase chain reaction, ook wel quantitative polymerase chain reaction (qPCR) genoemd, is het mogelijk om zowel het virus te identificeren als te kwantificeren. Dit is mogelijk om in één test tegelijk te doen en in een veel kortere tijd dan met de D-antigeen of CCID50 test. Bij de qPCR worden veel kopieën van één specifiek DNA of cDNA fragment gemaakt. Tijdens deze reactie is het mogelijk om via een hybridisatie probe een lichtsignaal te verkrijgen wanneer het DNA verdubbeld is. Hiermee kan m.b.v. dit lichtsignaal het start materiaal gekwantificeerd en geïdentificeerd worden.

RNA isolatie

Voor de qPCR is zuiver RNA sample nodig. Het virus RNA in de vironen uit het productie proces kan geïsoleerd worden d.m.v. een spinkolom of automatisch. In beide gevallen moeten de virussen eerst gelyseerd worden waardoor het RNA vrijkomt. Eventuele RNasen worden bij deze stap geïnhibeerd. In het geval van de spinkolom methode zal het lysaat op een kolom worden gebracht waar het RNA specifiek aan het silica membraan hecht. Andere contaminanten worden volledig weggewassen. Voor het automatisch isoleren (**figuur 3**) worden er magnetische glasdeeltjes toegevoegd waaraan nucleotide zuren kunnen hechten. Het eventuele DNA wordt d.m.v. DNase gedigesteerd. Daarna wordt het sample magnetisch gescheiden en gewassen om tot slot zuiver geëluëerd te worden. ^{16, 17}



Figuur 3 Automatisch isoleren met behulp van magnetische glasdeeltjes.

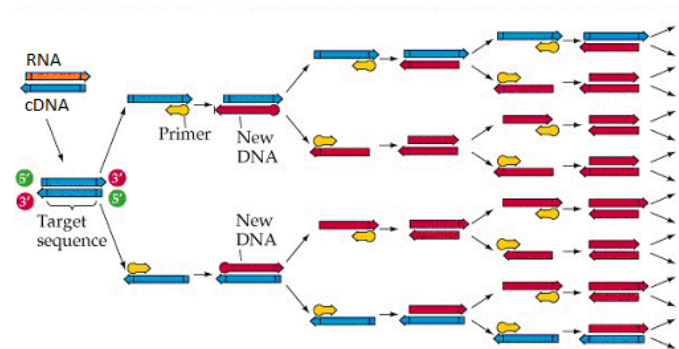
cDNA synthese

Wanneer het genoom van het poliovirus geïdentificeerd of gekwantificeerd moet worden kan er ook gebruik gemaakt worden van de qPCR. Omdat dit genoom bestaat uit RNA en de qPCR alleen DNA kan amplificeren wordt er vooraf gaande aan de qPCR eerst het RNA omgezet in copy DNA(cDNA). cDNA maken is mogelijk d.m.v. reverse transcriptie, dit kan in een aparte stap worden gedaan maar ook in één reactie met gebruik van Tth DNA Polymerase. Dit enzym is in staat om RNA om te zetten in cDNA in de aanwezigheid van Mn^{2+} bij een temperatuur van $61^{\circ}C$ en heeft daarnaast ook DNA polymerase activiteit in aanwezigheid van Mg^{2+} , om het verkregen cDNA te amplificeren. Eventuele mismatch in nucleotiden gebeurt zelden en is verwaarloosbaar. ^{15, 19, 20}

Amplificatie

Na synthese van cDNA wordt onder hoge temperatuur van 95°C gedurende 5min het RNA losgebonden van het cDNA. Het cDNA fungeert nu als template voor de amplificatie. Er volgen meerdere amplificatie cycli (**figuur 4**) en elke cyclus bestaat uit drie fases: denaturatie, anealen en extensie. Na elke cyclus is het DNA verdubbeld. Tijdens de denaturatie fase wordt het nieuw gevormde dubbelstrengs DNA omgezet naar enkelstrengs DNA. Dit gebeurt bij een verhoogde temperatuur van 95°C waardoor de waterstof bindingen tussen de twee strengen verbreken. Hierop volgt de anealing fase waarbij twee oligonucleotide primers, met een specifieke sequentie voor één van de typen poliovirussen, hechten aan het template DNA. Deze primers variëren van 18 tot 26 nucleotiden lang. De optimale temperatuur voor anealing hangt af van de hoeveelheid en type nucleotiden waaruit de primers bestaan. De forward primer kan hechten aan het cDNA en zorgt ervoor dat de polymerase de nieuwe streng kan synthetiseren. Deze nieuwe streng heeft na denaturatie ook een primer nodig, dit is de reversed primer. Het synthetiseren vindt plaats in de extensie fase. Hier worden door Tth polymerase nieuwe nucleotiden(dNTPs) uit de reactiemix aan het enkelstrengs DNA gehecht. De werking van het Tth polymerase is van 5' naar 3'. Uiteindelijk is er een dubbelstrengs DNA sequentie ontstaan en klaar voor de nieuwe cycli waarbij het weer gedeneureerd wordt.

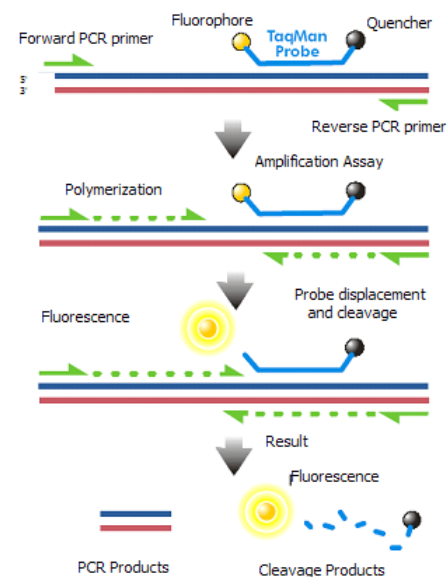
9,18, 19, 20



Figuur 4 Schematische weergave van de PCR. Viraal RNA (oranje), cDNA (blauw) en nieuw geamplificeerd DNA (rood)

Probe detectie

Tijdens de anealing fase kunnen TaqMan probes met een complementaire sequentie, voor een specifiek stukje DNA, hybridiseren aan de nieuw gesynthetiseerde amplicons. De TaqMan probes zijn gelabeld met een fluorofoor aan de 5' zijde en een quencher aan de 3' zijde. Wanneer de probe intact is zorgt de quencher ervoor dat de fluorofoor geen signaal geeft. (**figuur 5**) Doordat de Tth polymerase van 5' naar 3' exonuclease activiteit heeft zal het enzym tijdens het synthetiseren van de nieuwe streng, in de extensie fase, de probe stuk knippen en hierdoor de fluorofoor en quencher van elkaar scheiden. Deze scheiding zorgt ervoor dat het fluorofoor signaal kan geven. Het signaal zal tijdens de gehele qPCR aanwezig blijven en per cyclus, ofwel verdubbeling van het DNA, toenemen. Het signaal is dus recht evenredig aan het gevormde product. Voor elke extensie stap wordt de fluorescentie gemeten door de computer zodat de toename van het product na elke cyclus kan worden waargenomen. Tot slot berekent de computer, binnen de exponentiele fase van de PCR, bij welke cycli threshold (Ct) het gevormde product waarneembaar is. De Ct betekend dan de hoeveelheid cycli(product verdubbelingen) die nodig is om een sterk genoeg signaal van de probes te krijgen om te meten. ^{9,18}



Figuur 5 De TaqMan probe hecht aan een specifieke DNA sequentie. De polymerase knipt tijdens extensie de probe stuk wat een fluorescentie signaal tot gevolg geeft.

1.4 Doelstelling

De productie van IPV monovalente bulken type 1, 2 en 3 worden in dezelfde productiestraten gemaakt, gebruik makend van dezelfde apparaten. Daarnaast gaat het bedrijf ook OPV produceren. Deze productieprocessen zullen in de toekomst langs elkaar gaan lopen. Er moet dan uitgesloten kunnen worden dat er vermenging heeft plaats gevonden, door bijvoorbeeld niet goed reinigen. Om dit te onderzoeken worden er tijdens het productieproces samples genomen uit diverse productie stappen voor kwaliteitscontrole. De beschikbaarheid van een test die onderscheidt kan maken tussen Salk en Sabin is dan ook noodzakelijk. Onderzocht wordt dan of het mogelijk is om met de qPCR zowel de identiteit als de kwantiteit te bepalen van het virus. Het voordeel hiervan is dat er 2 testen in 1 kan worden uitgevoerd. Ook is deze test binnen één dag uit te voeren t.o.v. de virustitratie. De virustitratie heeft een week nodig om te incuberen en vervolgens is het aflezen een intensieve en subjectieve bezigheid. Door gebruik van de qPCR zijn de uitslagen sneller binnen, zijn er minder arbeidsuren en dus lagere kosten. Dit is zeker van belang voor een winstgevend bedrijf. Voor de uitvoering van de qPCR moet het RNA materiaal uit de monsters geïsoleerd worden. Om te voorkomen dat hier menselijke fouten worden gemaakt zoals pipetteer of contaminatie fouten wil het bedrijf overgaan op de geautomatiseerde procedure. Hiervoor moet er wel gekeken worden of de verandering van methode wel een meerwaarde heeft en het niet ten koste gaat van de efficiëntie. Wanneer de virustiter met de qPCR moet worden bepaald zal er een standaard voor Salk en Sabin moeten worden gemaakt die correleert aan de virustiter van de CCID₅₀. Hierbij moet er worden gekeken wat de detectiegrens is voor zowel het kwantificeren als het identificeren.

Belangrijke punten om te onderzoeken zijn:

- De manier van RNA isoleren: spinkolom of automatisch.
- De identiteit van poliovaccins, Salk en Sabin, goed te onderscheiden is van elkaar, en of er geen kruisreactiviteit plaats vindt.
- Een reproduceerbare standaardreeks voor elk type maken.
- De detectiegrens van de qPCR.
- Of de verkregen qPCR waarden te correleren zijn aan de virustitratie.

2. Materiaal en methode

2.1 Poliovirussen

Poliovirus samples zijn afkomstig van verschillende stappen uit het productieproces van IPV en OPV. De in Vero cellen gecultiveerde virusstammen bestaan uit Mahoney (type 1), MEF-1 (type 2) en Saukett (type 3) voor IPV. En voor OPV bestaande uit Sabin type 1, 2 en 3. IPV virusstammen worden eerst gekweekt in Vero cellen en daarna vindt, oogsten, klaring, concentreren, gelfiltratie en ionenuitwisselingschromatografie plaats. Op dit punt (fractie 4.1) wordt de D-antigeen getest. De vervolg stappen zijn: steriele filtratie en toevoeging van formaldehyde, om het virus te inactiveren. Op dit punt (fractie 5.1) wordt de IPV virustiter bepaald. Voor OPV geldt een eenvoudiger proces waarbij de virusstammen na kweken, oogsten en klaring de virustiter wordt bepaald (fractie 5.1). Virus samples zijn opgelost in medium 199. Fractie 4.1 van IPV en 5.1 van IPV en OPV zijn gebruikt voor de RNA isolatie en de qPCR.

2.2 RNA isolatie

Om het RNA uit poliovirus te isoleren kunnen er verschillende methodes gebruikt worden. Dit kan zowel d.m.v. kolommen als automatisch worden uitgevoerd. Voor de isolatie is een 7-voudige logaritmische verdunningsreeks van het virus in verdunningsmedia gemaakt. De reeksen zijn getest met verschillende verdunningsmedia: medium 199, gedestilleerd water en PBS.

2.2.1 Spinkolom

Voor RNA isolatie met behulp van spinkolommen is gebruik gemaakt van de QIAamp Viral RNA Mini Kit van Qiagen. Volgens het handboek van de kit wordt 420 µl sample gelyceerd en 60 µl RNA geëluëerd in AVE buffer. **(zie bijlage 1)** Samples zijn direct gebruikt en/of opgeslagen in de -20°C.

2.2.2 Automatisch

De MagNA pure compact van Roche is gebruikt voor automatische RNA isolatie. Hierbij is de MagNA pure compact nucleic acid isolation kit I – Large volume van Roche gebruikt volgens het nucleic acid isolation protocol. **(zie bijlage 2)** 500 µl sample is opgebracht en 50 µl gezuiverd RNA is geëluëerd. Samples zijn direct gebruikt en/of opgeslagen in de -20°C.

2.3 qPCR

De synthese van cDNA en amplificatie daarvan is gedaan met een real-time PCR apparaat, de LightCycler 2.0 van Roche. Een reactie mix is bereid met de LightCycler RNA Master HybProbe kit van Roche. De mix bevat o.a. Tth polymerase wat zowel cDNA kan synthetiseren als amplificeren en bestaat uit de verhouding:

- 7,5 µl RNA master
- 3,2 µl PCR grade H₂O
- 1,3 µl 50mM Mn(OAc)₂
- 2 µl 5.0 µM forward primer
- 2 µl 5.0 µM reversed primer
- 2 µl 2.0 µM Taqman probe (voor MEF-1 4,0 µM)
- 2 µl geïsoleerd RNA

Voor de detectie van de verschillende poliovirus typen zijn de onderstaande primers en probes gebruikt van Isogen **(tabel 3)**.⁹ Het programma dat gebruikt is voor cDNA synthese en amplificatie is één stap van 20min 61°C voor reverse transcriptie, 1x 30s 95°C denatureren. Daarna 45 amplificatie cycli [5s 95°C denatureren, 15s 58°C annealen, 5s 72°C extensie]. Alle stappen zijn met een opwarmingssnelheid van 20°C/s. En tot slot afgekoeld 30s 40°C.

2.3.1 Positieve waarden

Er is een eis vast gesteld voor betrouwbare data van de qPCR. Hiervoor moet elke curve een vloeiende s-vorm hebben. Zonder s-curve kan de exponentiële fase van de qPCR niet worden vastgesteld wat nodig is voor de berekening van de Ct waarde. De Ct waarde zelf mag niet hoger dan 30 zijn, veelal valt deze waarde dan in het afvlakkende deel van de verdunningsreeks of heeft het geen vloeiende S-curve meer. Daarnaast moet de minimaal haalbare fluorescentie waarde van de curve boven de 0,5 uitkomen. Waarden buiten deze eisen worden als vals-positief beschouwd en worden voor berekeningen niet meegenomen. Voor een verdunningscurve moeten minimaal 5 waarden positief zijn.

Tabel 3

De forward en reversed primers en probes gebruikt voor type 1, 2 en 3 van IPV en OPV. Type 1 reversed primer en probe zijn hetzelfde voor IPV en OPV.

Virus Type	Naam	Sequentie
Type 1	Sabin 1 F	ATgATTCCCTTTgACTTAAgTgCAAA
	Mahoney F	gATTCCCTTTgACTTAAgTgCCAC
	Polio 1 R	gATCCTgCCCAGTgTgTgTAg
	Polio 1 TM	FAM-AgggTTCggTTAAgTgACAAACCACATAC-BBQ
Type 2	Sabin 2 F	AAggAATTggTgACATgATTgAgg
	Sabin 2 R	CTCggCTTTgTgTCAggC
	Sabin 2	FAM-TggAAgTCgggggAACCAATgC-BBQ
	MEF F	ggTTgTTgAgggAgTCACgAgA
	MEF R	CCCTgTCTCTACggCTgTTAgC
	MEF TM	YAK-ACACCACTgACACCTgCCAACAACCT-BBQ
Type 3	Sabin 3 F	AATgACCAgATTggTgATTCCCTTg
	Sabin 3 R	gTAAATgCggACTTTggAggTTACT
	Sabin 3 TM	FAM-TgTgATCATTgACAACACgAACTgCCAA-BBQ
	Saukett F	gCAATTACgCCgCAAAGC
	Saukett R	gTgTAggTgCTCCTggAggT
	Saukett TM	YAK-TTCgTggTAACAgCCAACCTCACCA-BBQ

2.4 Virustitratie

De virustitratie bepaling is een standaard procedure die door collega's binnen het bedrijf is gedaan. Dit is uitgevoerd volgens het protocol (**zie bijlage 3**). Waarbij de titer van fractie 5.1 wordt bepaald. Waardes hiervan zijn gebruikt voor correlatie met Ct waarden van de qPCR.

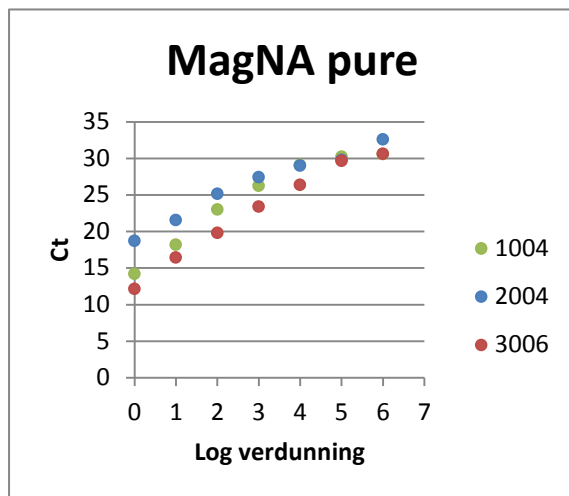
3. Uitvoering en resultaten

3.1 RNA isolatie methode

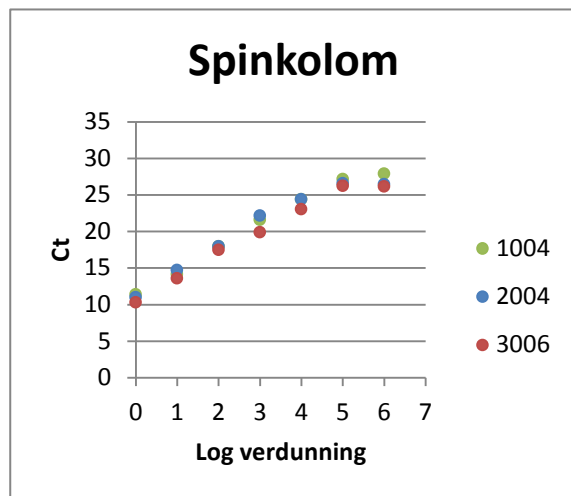
Doordat er bij het gebruik van de spinkolommen af en toe contaminatie van de samples is opgetreden, is er onderzocht of het mogelijk is om in de toekomst de RNA isolatie via de geautomatiseerde methode van Roche met de MagNA pure te doen.

3.1.1 Uitvoering

Om te onderzoeken wat het lineaire verloop is van de Ct curven, zijn Sabin type 1(1004), 2(2004) en 3(3006) samples in een serie van 7 logaritmische stappen verdund. Vervolgens is het RNA van deze verdunningsreeksen geïsoleerd met de MagNA pure en de spinkolommen. Van deze verdunningen is met de qPCR de Ct waarden bepaald en zijn deze resultaten grafisch weergegeven in **figuur 6 en 7**. De Ct waarden zijn bepalend voor de hoeveelheid RNA dat geïsoleerd is.



Figuur 6 Sabin type 1, 2 en 3 zijn met de MagNA pure geïsoleerd in een 7-staps logaritmische verdunningsreeks.



Figuur 7 Sabin type 1, 2 en 3 zijn met de spinkolommen geïsoleerd in een 7-staps logaritmische verdunningsreeks.

3.1.2 Resultaten

In **figuur 6 en 7** zijn de Ct waarden tegen de log verdunningsreeks uitgezet. Voor alle typen bij zowel MagNA pure als de spinkolommen zijn afvlakkingen te zien bij grotere log verdunningen. Daarnaast is te zien dat de Ct waarden van de MagNA pure hoger liggen dan die van de spinkolom. In **tabel 4** zijn de berekende correlatie coëfficiënt (R^2) waardes van de samples weergegeven. In de berekening zijn de afvlakkende waardes weggelaten. Wanneer de R^2 waarden per type met elkaar worden vergeleken is er nagenoeg geen verschil tussen de twee methoden. Dit betekent dat beide methoden met een zelfde variatie aan Ct waarden een verdunningsreeks isoleren.

Tabel 4

De R^2 waarden van Sabin type 1(1004), 2(2004) en 3(3006) zijn weergegeven voor de MagNA pure en spinkolom.

Sample	MagNA pure (R^2)	Spinkolom (R^2)
1004	0,99	1,00
2004	0,98	0,99
3006	1,00	1,00

3.1.3 Conclusie

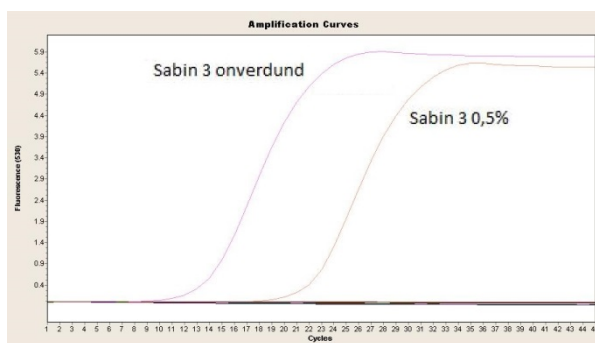
De MagNA pure heeft hogere Ct waarden wat betekent dat er iets minder RNA geïsoleerd wordt dan de spinkolommen. Doordat de MagNA pure geautomatiseerd is, is de kans op contaminatie aanzienlijk kleiner. Daarnaast bespaart de MagNA pure tijd. Omdat de contaminatie problemen zwaarder wegen dan de verminderde hoeveelheid RNA wat geïsoleerd wordt en de R^2 waarden nagenoeg gelijk zijn, is ervoor gekozen om verder te gaan met de MagNA pure. Beide methoden voldoen aan de eis voor minimaal 5 positieve waarden (zie materiaal en methode) t/m een log verdunning van 4 voor type 1 en 2, en 5 log voor type 3 bij de MagNA pure. Voor de spinkolom zijn alle waarden nog betrouwbaar t/m 5 log verdunning.

3.2 Identiteit

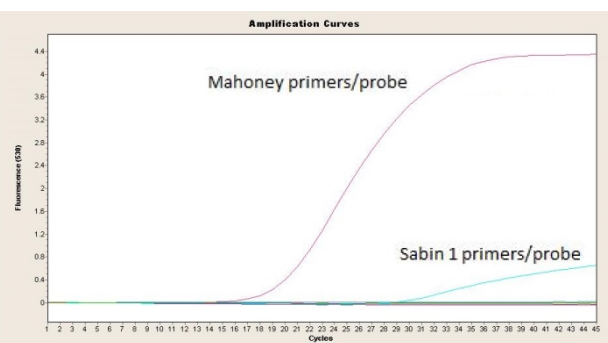
Om te bepalen of de primers en probes specifiek genoeg zijn moeten deze in de qPCR duidelijk onderscheid kunnen maken tussen de verschillende typen poliovaccins, zodat de identiteit kan worden bepaald. Ook bij mengsamples, bijvoorbeeld wanneer er eventuele contaminatie heeft plaats gevonden tussen IPV en OPV of de 3 typen stammen onderling, moeten alle typen van elkaar te onderscheiden zijn.

3.2.1 Uitvoering

Voor de experimenten zijn alle typen van zowel IPV als OPV onderling met elkaar gemengd. Hierbij is gekozen voor een lage bijmeng concentratie van 0,5%, om te zien of de verschillende typen dan ook nog goed te onderscheiden zijn. Een mengsel bestaat bijvoorbeeld uit verschillende types, 1µl onverdund Mahoney met 1µl 1% MEF-1 of verschillende vaccins, 1µl onverdund Mahoney met 1µl 1% Sabin 1, enz.. Deze samplengsels zijn vervolgens getest tegen alle primers en probe sets van ieder type. Voor elk type is er ook een onverdund, ongemixt 2µl sample als controle getest.



Figuur 8 Sabin 3 sample getest in combinatie met primers en probes voor Sabin 1, 2, 3, Mahoney, MEF-1 en Saukett.



Figuur 9 Mahoney sample getest in combinatie met primers en probes voor Sabin 1, 2, 3, Mahoney, MEF-1 en Saukett.

3.2.2 Resultaten

In **figuur 8 en 9** is de fluorescentie(y-as) tegen het aantal cycli(x-as) uitgezet. In **figuur 8** is het onverdunde en verdunde Sabin type 3 sample getest met alle typen primers en probe sets. Er is te zien dat Sabin type 3 onverdund opkomt bij een Ct waarde van 12,87 en dat de andere typen geen fluorescentie geven. Wanneer het sample verdund wordt tot 0,5% zal dit theoretisch overeen moeten komen met een Ct waarde van 21,17. De fluorescentie blijkt duidelijk te meten en geeft een Ct waarde van 21,19. Alle typen geven een soortgelijke grafiek en geven geen afwijkende resultaten door het mengen. Één uitzondering is Mahoney en Sabin 1, te zien in **figuur 9**. De primers en probes van Sabin 1 geven een a-specifieke binding, in de vorm van een curve, met Mahoney sample. De Ct waarde is 28,37. 9 van de 10 keer gaf Mahoney a-specifieke binding met Sabin 1 primers en probes. Andersom geeft Sabin 1 met de primers en probes van Mahoney niet tot nauwelijks een curve. Mahoney met Mahoney primers en probes laat een lagere Ct waarde zien van 18,80. Uit de literatuur is gebleken dat deze twee virusstammen een homologe sequentie van 99,2% hebben ofwel Sabin 1 heeft 58 mutaties op 7441 nucleotiden. Hiervan zitten 2 mutaties in de forward primer met één extra mismatch t.o.v. Mahoney.

3.2.3 Conclusie

De primers en probes voor alle 6 type vaccins vallen binnen de eis van een vloeiende Ct curve die eerder dan 30 Ct opkomt en boven de 0,5 fluorescentie uitkomt. De curven zijn duidelijk van elkaar te onderscheiden. De primers en probes voor alle typen zijn specifiek genoeg voor identificatie.

3.3 Verdunningsreeks M199

Aangetoond is dat de primers en probes specifiek genoeg zijn voor een identificatie test, nu doett de mogelijkheid zich voor om het kwantificerende aspect van de PCR te bepalen. Hiervoor is het belangrijk dat de uitkomsten van de PCR gecorreleerd kunnen worden aan de virustiter en later ook de D-antigeen waarde. En moet er gezocht worden naar een standaard voor type 1, 2 en 3 van Salk en Sabin die hiervoor gebruikt kan worden. Gestart is met het gebruik van IPV en OPV type 1, 2 en 3 waarbij de verdunningsreeks gemaakt is in medium 199(M199), waarin de onverdunde samples zich bevinden vanuit het productie proces.

3.3.1 Uitvoering

Om de standaarden te maken is er gebruik gemaakt van de virustiters uit de CCID₅₀ test, zie **tabel 5**. Vervolgens zijn voor alle typen verdunningsreeksen gemaakt met M199 als verdunningsmiddel in een serie van 7 logaritmische stappen. Daarna zijn voor alle series de Ct waarden bepaald met de qPCR en zijn minimaal 5 waarden in het lineaire gebied, die aan de eis voldoen, gebruikt voor de R² waarde te bepalen. De eis voor de R² zelf is dat deze minimaal 0,97 moet zijn. Daarbij moeten de Ct waarden ±3,32 van elkaar verschillen per verdunning.

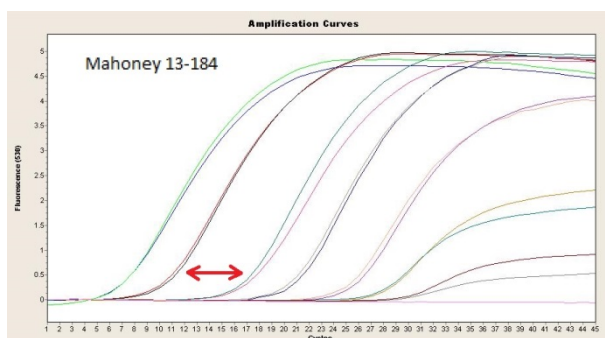
Tabel 5

De virustiters, van type 1, 2 en 3 van IPV en OPV, bepaald door de CCID₅₀.

Type	IPV virustiter (log/ml)	OPV virustiter (log/ml)
1	10,05	8,90
2	9,80	8,51
3	9,23	8,94

3.3.2 Resultaten

In **figuur 11** zijn van IPV en OPV de typen 1,2 en 3 de Ct waarden tegen de virustiter uitgezet. In **figuur 11A, C en E** zijn de verdunningsreeksen van IPV te zien. In type 1, 2 en 3 is een sprong in Ct waarde te zien tussen de 2^e en 3^e waarde rond de virustiter van 7-8log/ml. In plaats van ± 3,32 Ct verhoging per factor 10 verdunning is de Ct waarde eerder 2x hoger. In **figuur 10** waar de fluorescentie van de Mahoney verdunningsreeks tegen het aantal cycli is uitgezet is de Ct sprong duidelijker te zien. Dit Ct waarden en het verschil zijn ook terug te vinden in **tabel 6**. Deze sprong is in meer of mindere mate terug te vinden voor MEF-1 en Saukett. Vervolgens is te zien dat bij elke type de laagste concentratie een afvlakking geeft, deze is dan ook niet meegenomen in de R² waarde berekening. In **figuur 11E** is te zien dat Saukett de laagste R² waarde geeft en ook het meest duidelijk de sprong in Ct waarde laat zien.

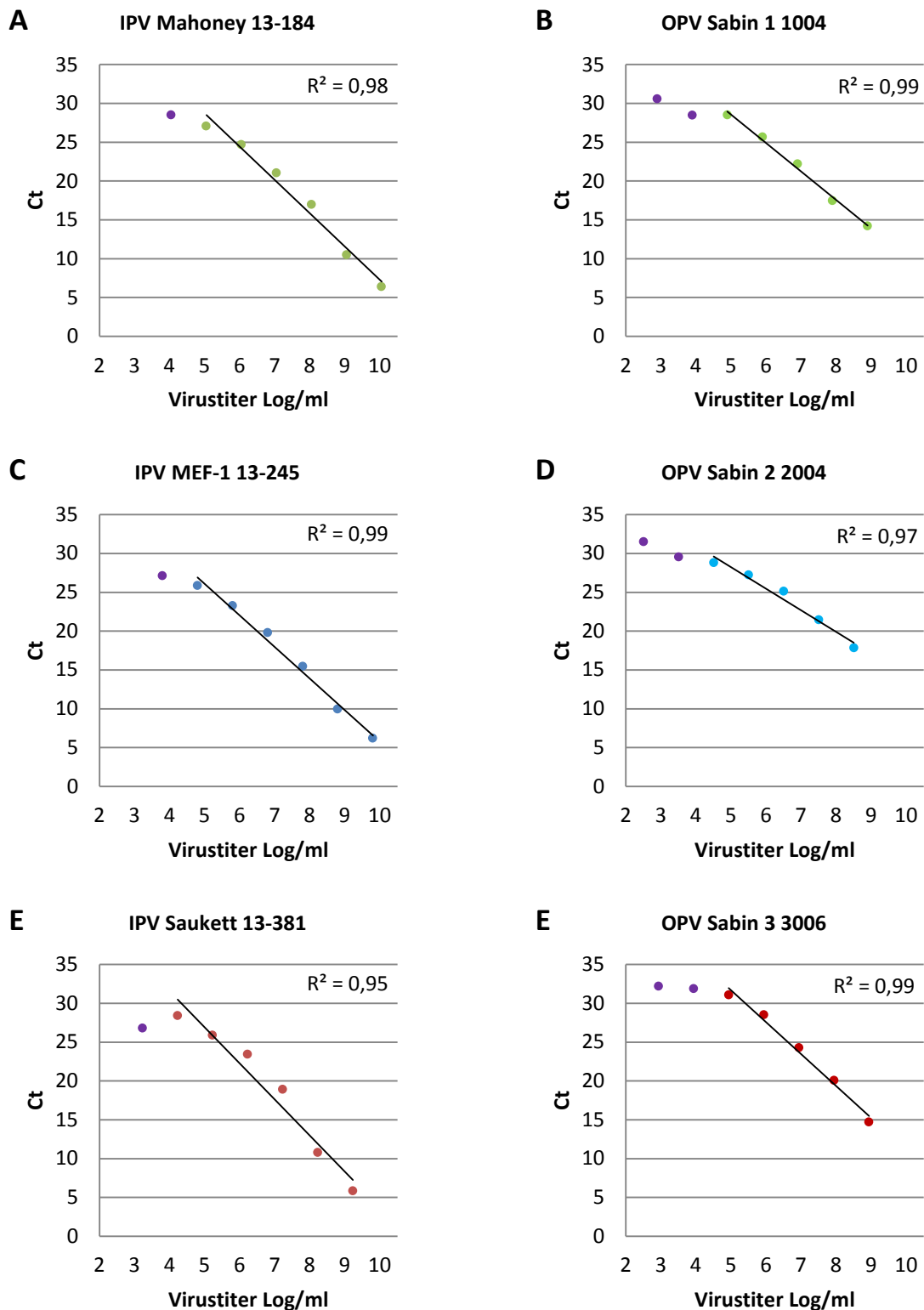


Figuur 10 De verdunningsreeks van IPV type 1. Met rode pijl aangegeven de sprong in Ct waarde.

Tabel 6 Verdunningsreeks van Mahoney 13-184 met Ct waarden en het verschil in Ct tussen elke verdunningsstap. Sprong in Ct met rood aangegeven

Titer	Ct M199	ΔCt M199
10,05	6,38	
9,05	10,48	4,09
8,05	16,99	6,51
7,05	21,04	4,06
6,05	24,69	3,64
5,05	27,08	2,40
4,05	28,51	1,43

In **figuur 11B, C en D** zijn de verdunningsreeksen voor OPV te zien. De virustiters van OPV zijn lager dan die van IPV (**tabel 5**). Dit is terug te zien in de grafieken als hogere Ct waarden voor OPV t.o.v. IPV. De grafieken van OPV hebben een eerdere afvlakking waardoor de laatste 2 waarden met de laagste concentraties niet mee zijn genomen in de R² berekening. Er is in tegenstelling tot IPV, minder duidelijk een sprong in Ct waarde te zien. Sabin 2 geeft de laagste R² van deze 3 typen.



Figuur 11 De verdunningsreeksen met M199 voor type 1, 2 en 3 van IPV(A,C,E) en OPV(B,D,F). De paarse punten zijn niet meegenomen voor de R^2 waarde.

3.3.3 Conclusie

Het is mogelijk dat bij alle typen IPV en OPV een matrixeffect optreedt. Wat ervoor zorgt dat de verdunningsreeks niet optimaal gemaakt kan worden met M199. De verwachte 3,32 Ct verschil tussen iedere verdunning wijkt vooral bij een virustiter van 7-8log/ml af. De lage R^2 waarde van IPV type 3 is hiervan een gevolg. De eerdere afvlakking, van OPV t.o.v. IPV, lijkt de oorzaak van een lagere virustiter. Doordat de virustiter lager is en dus minder virus in hetzelfde volume bevindt is hierdoor mogelijk een kleinere kans op aggregaat vorming dus een minder groot matrixeffect. De lineaire range bevindt zich voor alle typen IPV en OPV tussen $\pm 4,5\log$ en $10\log$. Andere mogelijke oorzaken, zoals het verloop van de qPCR zelf of verschillen in productie proces, moeten nog onderzocht worden.

3.4 qPCR verloop

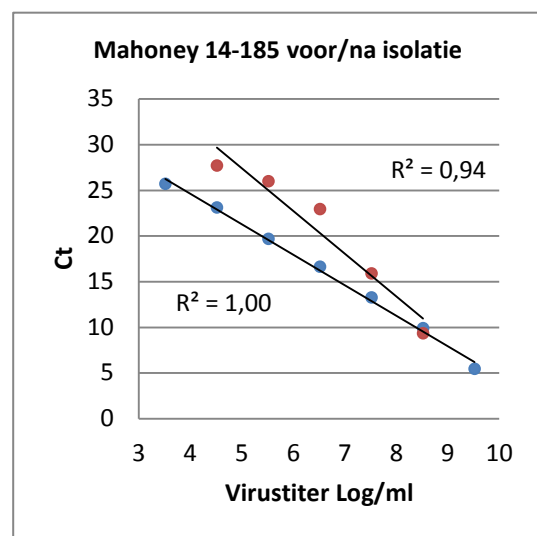
Doordat er een mogelijk matrixeffect is opgetreden bij de verdunningsreeksen van IPV en OPV en omdat alle typen een afvlakking laten zien bij een lage concentratie, is er onderzocht of het probleem, na isolatie, bij de PCR ligt of voor de isolatie bij de maken van de verdunningsreeks. Door voor beide een verdunningsreeks met elkaar te vergelijken kan er uitgesloten worden of het aan de PCR ligt.

3.4.1 Uitvoering

Er zijn twee verdunningsreeksen gemaakt voor één type van zowel IPV als OPV. De eerste verdunningsreeks is gemaakt voor de isolatie zoals eerder een serie van 7 in M199. De tweede verdunningsreeks is met het gezuiverde RNA van het onverdunde sample gemaakt in PCR graded water. Vervolgens zijn van beide series de Ct waarden bepaald met de qPCR.

3.4.2 Resultaten

In **figuur 12** zijn de verdunningsreeksen, gemaakt voor en na isolatie met een nieuwe batch(14-185), van IPV type 1 te zien. De waardes van na isolatie liggen in een lineaire lijn $R^2 = 1$ die met $\pm 3,32$ Ct per verdunning verschillen (**tabel 7**), waarbij alle 7 waardes meegenomen kunnen worden. De reeks na isolatie geeft geen opvallende sprong in Ct waarden. De verdunningsreeks die voor de isolaties is gemaakt laat een sprong in Ct waarde zien en geeft een R^2 van 0,94. Het onverdunde sample gaf geen waarde bij de qPCR evenals de meest verdunde. Een soort gelijk verloop van de verdunningsreeks voor (R^2 0,97) en na (R^2 0,98) isolatie is ook te zien bij OPV type 2. Een afvlakking bij de laagste 2 concentraties was voor beide curven te zien.



Figuur 12 IPV type 1 verdunningsreeks gemaakt voor de isolatie stap(rood) en na de isolatie(blauw).

Tabel 7 Ct waarden van IPV type 1 verdunningsreeks verdund voor en na isolatie. En Ct verschillen tussen verdunningsstappen.

Titer	Ct voor	Ct na	Δ Ct voor	Δ Ct na
9,52		5,42		
8,52	9,29	9,85	9,29	4,43
7,52	15,85	13,24	6,57	3,39
6,52	22,91	16,58	7,06	3,34
5,52	25,94	19,66	3,03	3,08
4,52	27,67	23,09	1,73	3,44
3,52		25,66		2,57

3.4.3 Conclusie

De verdunningsreeks na isolatie toont aan dat de sprong in Ct waarde het gevolg is van een matrixeffect op de verdunningsreeks, omdat een verdunningsreeks met alleen puur RNA verdund in PCR kwaliteit water wel een lineaire lijn geeft.

3.5 Fractie 4.1 en 5.1

Omdat er een matrixeffect lijkt te zijn wat zorgt voor de verstoring in de verdunningsreeks. Is er onderzocht wat hieraan ten grondslag kon liggen. Na onderzoek is gebleken dat bij de 5.1 fracties van IPV, die tot nu toe zijn getest, formaldehyde inzet. Omdat er geen formaldehyde in fractie 5.1 van OPV zit en hierbij een minder duidelijk matrixeffect getoond wordt. Zorgt formaldehyde mogelijk voor verstoring van de verdunningsreeks. Om dit te testen is de 4.1 fractie, zonder formaldehyde, getest.

3.5.1 Uitvoering

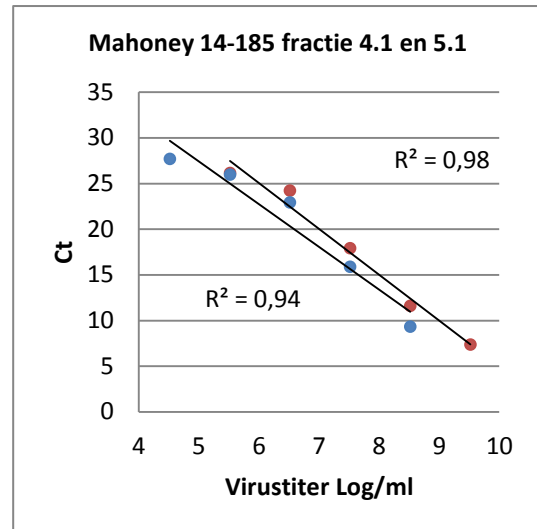
Er is een verdunningsreeks gemaakt voor fractie 4.1 en vergeleken met een eerdere reeks uit 5.1 van dezelfde batch 14-185. Er is voor fractie 4.1 aangenomen dat deze dezelfde virustiter heeft als 5.1. Voor 4.1 wordt er namelijk geen virustiter bepaald.

3.5.2 Resultaten

In **figuur 13** is te zien dat de Ct waarden van de 5.1 fractie hoger liggen dan die van de 4.1 fractie. Beide fracties geven het matrixeffect weer. De R^2 van 4.1 is 0,94 en van 5.1 is 0,98. Meer Ct waarden van 4.1 hebben een grotere afwijking t.o.v. de theoretische bepaalde 3,32 Ct verschil. Beide fracties laten het matrix effect zien.

3.5.3 Conclusie

Het matrixeffect is bij fractie 4.1 nog steeds te zien, waardoor er geconcludeerd kan worden dat formaldehyde niet de oorzaak hiervan is. Daarnaast kan gezegd worden dat de virustiter van 4.1 hoger ligt dan die van 5.1 omdat alle Ct waarden lager liggen.



Figuur 13 IPV type 1 verdunningsreeks van fractie 4.1 (blauw) zonder formaldehyde en fractie 5.1 (rood) met formaldehyde.

3.6 Verdunningsmedium PBS

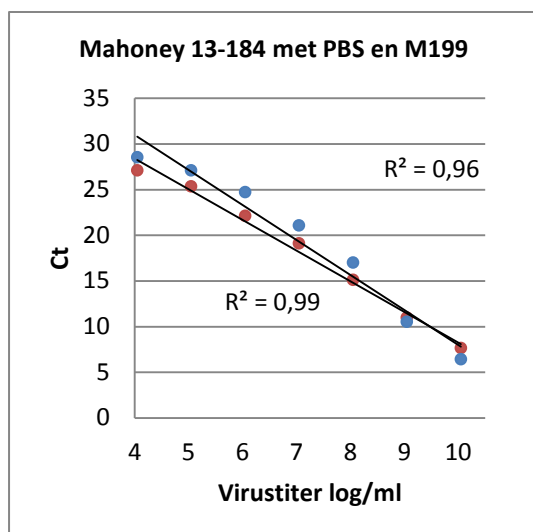
Doordat formaldehyde niet direct het probleem lijkt te zijn is er gekeken of een ander component in M199 het matrixeffect veroorzaakt. Hiervoor is PBS gebruikt i.p.v. M199 om te verdunnen.

3.6.1 Uitvoering

IPV samples Mahoney en MEF-1 zijn getest met PBS als verdunningsmiddel voor de verdunningsreeks. De Ct waarden zijn vervolgens vergeleken met de verdunningsreeksen die verdund zijn met M199.

3.6.2 Resultaten

In **figuur 14** zijn de curven van Mahoney verdund met M199 en PBS weergegeven. Bij PBS voldoen alle waarden aan de eis (zie materiaal en methode). Bij M199 alleen de laagste concentratie door afvlakking niet. Deze waarde is wel weergegeven om beide curven met elkaar te vergelijken. De reeks met M199 gaf een R^2 van 0,98 nu met alle waardes 0,96. De reeks met PBS geeft een R^2 van 0,99. In **tabel 8** zijn de verschillen in Ct waarde per verdunning te zien van M199 en PBS. Het verschil in Ct waarden van PBS ligt dicht bij de theoretische 3,32 Ct dan M199. Soortgelijke waarden zijn terug te vinden voor IPV type 2 verdund met PBS.



Figuur 14 IPV type 1 verdunningsreeks met M199 verdund (blauw) en verdund met PBS (rood).

Tabel 8 Virustiters uitgezet tegen de Ct waarden van de verdunning met M199 en PBS. En het verschil in Ct tussen elke verdunningsstap.

Titer	Ct M199	Ct PBS	Δ Ct M199	Δ Ct PBS
10,05	6,38	7,61		
9,05	10,48	10,96	4,09	3,35
8,05	16,99	15,07	6,51	4,11
7,05	21,04	19,06	4,06	3,99
6,05	24,69	22,08	3,64	3,02
5,05	27,08	25,33	2,40	3,25
4,05	28,51	27,06	1,43	1,73

3.6.3 Conclusie

PBS als verdunningsmiddel heeft een positief effect op het maken van een verdunningsreeks voor IPV samples type 1 en 2. Ondanks PBS blijft de afvlakking van de laagste concentratie in stand en komt dit mogelijk door een andere oorzaak. Maar zelfs met deze afvlakking verloopt de curve van PBS meer lineair dan met M199 zonder de laagste concentratie.

4. Conclusie en discussie

Om te onderzoeken of de PCR die gebruikt wordt als identiteitstest voor polio samples te correleren is aan de virustiter van de CCID₅₀, en hiermee zowel de identiteit als de kwantiteit te kunnen bepalen binnen 1 test, zijn er verschillende experimenten uitgevoerd. Er is onder andere gekeken naar een geautomatiseerde methode om RNA te isoleren. Om vervolgens vanuit daar een zo optimaal mogelijke standaard te maken met een bekende virustiter zodat daarmee onbekende samples gekwantificeerd kunnen worden.

De geautomatiseerde methode voor RNA isolatie met de MagNA pure van Roche blijkt een goede en snelle methode te zijn t.o.v. de manuele manier met spinkolommen. Ondanks dat er meer RNA wordt opgezuiverd d.m.v. de spinkolommen, wegen de voordelen van minder arbeidstijd en een kleinere kans op contaminatie zwaarder. Wanneer de efficiëntie voor de gehele verdunningsreeks bij elke test hetzelfde blijft kan de virustiter daar zonder probleem aan gekoppeld worden.

Om de verdunningsreeks ofwel standaard zo optimaal mogelijk te krijgen om daarmee een onbekend sample te kunnen kwantificeren zijn er verschillende testen gedaan om o.a. het gevonden matrixeffect weg te krijgen. Het matrixeffect zorgt voor afwijkende Ct waarden wat een lineaire verdunningsreeks verstoort. Een verschil van 3,32 Ct bij een factor 10 verdunning wijkt bij hoge virustiters (>±6 log) naar boven af, en bij lagere concentraties (<±6 log) verschillen de verdunningen minder dan 3,32 Ct. Het matrixeffect is niet direct door formaldehyde ontstaan maar eerder door medium 199. In de toekomst kan het beste gewerkt worden met PBS als verdunningsmedium. Hierbij moet wel meegenomen worden dat het onverdunde sample zich al in M199 bevindt. Ook moet er gekeken worden of PBS een positief effect heeft voor de overige typen: IPV type 3 en alle OPV typen. Er is daarnaast ook getest met gedestilleerd water wat zeer afwijkende resultaten gaf. Ook uit de literatuur blijkt dat poliovirussen gemakkelijker aggregaten vormen in water.²¹ Er is nog gekeken naar de manier van mengen tijdens het door verdunnen, ook dit bleek met langdurig vortexen geen verbeterd effect te hebben.

OPV blijkt een veel minder groot matrixeffect te hebben dan IPV. Een mogelijk oorzaak hiervan kan zijn dat de manier waarop OPV geproduceerd wordt, een eenvoudiger proces is, waardoor de matrix minder complex is dan voor IPV. Daardoor zijn de virustiters van OPV over het algemeen lager dan IPV wat ook een mogelijk positief effect heeft op een betere verdunningsreeks. Echter bereikt OPV met deze lagere virustiter eerder de detectiegrens. De lineaire range lijkt voor alle typen tussen de virustiters van ±4 log en ±10 log te liggen. De exacte grens zou nog onderzocht moeten worden.

Wat betreft de identiteitsbepaling is het voor kwantificeren niet nodig dat er van IPV type 1 en OPV type 1 een betere primers en probe set wordt ontwikkeld. Mocht er contaminatie van één van deze typen met de ander plaats hebben gevonden, dan wordt de batch afgekeurd.

Vervolgens zijn er nog kleine testen uitgevoerd om te kijken of verschillende typen polio betere Ct waarden geven door het aanpassen van de hoeveelheid probe, extensie tijd en anealing temperatuur. Geen van deze aanpassingen lieten een duidelijke verandering zien. Verder is het mogelijk verstandig voor de kwantificatie om te onderzoeken wat de verhouding van volledige virussen t.o.v. los RNA is bij de replicatie van het Poliovirus in Vero cellen. Uit de literatuur blijkt dat bijvoorbeeld volledige mond en klauwzeer virussen tegen RNA kopieën een ratio heeft van ± 1:1000.²²

Wanneer de optimalisatie van deze PCR is afgerond, door bijvoorbeeld gebruik van PBS als verdunnings buffer. Kan men gaan kijken of de virustiter van een nieuwe batch te bepalen is aan de hand van een ijklijn. Van de nieuwe batch kan dan ook een verdunningsreeks worden gemaakt om te zien hoeveel Ct waarden correleren, en op basis hiervan een gehalte bepaald worden. Wanneer de virustiter, bepaald door de qPCR, nog steeds afwijkend is, kan er onderzocht worden of er optimalere

verdunningsmedia zijn. Ook kan er gekeken worden of er een extra zuiveringsstap nodig is om zoveel mogelijk interfererende stoffen, niet-virusdeeltjes, kwijt te raken.

Wanneer de virustiter bepaald kan worden met de qPCR, kan er gekeken worden of de hoeveelheid D-antigeen correleert aan de virustiter, zodat tevens de D-antigeen bepaald kan worden met de qPCR. Hiervoor moet er ook een literatuuronderzoek worden gedaan om te kijken of het bekend is hoeveelheid virusdeeltjes met het D-antigeen gehalte correleren.

5. Literatuur

1. P.D. Minor. *Poliomyelitis*. Third edition. Encyclopedia of Virology. 2008; p. 242-249
2. D.J. Wood, A.J. Macadam. *Laboratory tests for live attenuated poliovirus vaccines*. Biologicals. 1997; 25: 3–15
3. James M. Hogle. *Poliovirus Cell Entry: Common Structural Themes in Viral Cell Entry Pathways*. Annu Rev Microbiology. 2002; 56: 677-702
4. P.D. Minor et al. *Antigenic structure of polioviruses of serotype 1, 2 and 3*. The EMBO Journal. 1986; vol. 8 nr. 5 p. 1567-1579
5. P.D. Minor. *Polio eradication, cessation of vaccination and re-emergence of disease*. Nat Rev Microbiology. 2004; 2: 473-82
6. O.M. Kew et al. *Vaccine-derived polioviruses and the endgame strategy for global polio eradication*. Annu Rev Microbiology. 2005; 59: 587-635
7. <http://www.polioeradication.org/Dataandmonitoring.aspx>; 13-05-2014
8. S. Gard. *Inactivation of poliovirus by formaldehyde*. Bull World Health Organisation. 1957; 17(6): 979–989
9. O.E. Nijst et al. *Rapid and accurate identification of poliovirus strains used for vaccine production*. Journal Virological Methods. 2013; 189(1): 189-95
10. V.R. Racaniello. *One hundred years of poliovirus pathogenesis*. Virology. 2006; 344(1): 9-16
11. S.B. Troy et al. *Real-time polymerase chain reaction analysis of sewage samples to determine oral polio vaccine circulation duration and mutation after Mexican national immunization weeks*. Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society. 2012; 1(3): 223-229
12. M. Ferguson et al. *Antigenic structure of poliovirus in inactivated vaccines*. Journal of General Virology. 1993; 74: 685-90
13. L.A. Sawyer et al. *Quantitation of D antigen content in inactivated poliovirus vaccine derived from wild-type or sabin strains*. Biologicals. 1993; 21(2): 169-77
14. G. Rezapkin et al. *Improved ELISA test for determination of potency of Inactivated Poliovirus Vaccine (IPV)*. Biologicals. 2005; 33(1): 17-27
15. M.J. Moser et al. *Thermostable DNA Polymerase from a Viral Metagenome Is a Potent RT-PCR Enzyme*. PloS One. 2012; 7(6): e38371
16. L. Pichl et al. *Magnetic bead technology in viral RNA and DNA extraction from plasma minipools*. Transfusion. 2005; 45(7): 1106-10
17. A. Nicosia et al. *Regeneration of total RNA purification silica-based columns*. Biomedical Chromatography. 2010; 24(12): 1263-4
18. C.A. Heid et al. *Quantitative Real Time PCR*. Genome Res. 1996; 6: 986-994
19. S.A. Bustin. *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays*. Journal Molecular Endocrinology. 2000; 25(2): 169-93
20. D.R. Kilpatrick. *Rapid group-, serotype-, and vaccine strain-specific identification of poliovirus isolates by real-time reverse transcription-PCR using degenerate primers and probes containing deoxyinosine residues*. Journal Clinical Microbiology. 2009; 47(6): 1939-41
21. B. Gassilloud et al. *Adhesion-Aggregation and Inactivation of Poliovirus 1 in Groundwater Stored in a Hydrophobic Container*. Applied and Environmental Microbiology. 2005; 71(2): 912-20
22. J.D. Callahan. et al. *Use of a portable real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for rapid detection of foot-and-mouth disease virus*. Journal AVMA. 2002; 220(11): 1636-42

6. Bijlagen

Bijlage 1 RNA isolatie spinkolommen

Materiaal

- Steriele handschoenen
- Ethanol (96-100%)
- Buizen (10ml)
- Pipetten
- Steriele pipetpunten met filtertips
- Eppendorf cupjes (1,5ml)
- Fractie 5.1 Vaccin samples
- Qiagen QIAamp Viral RNA Mini Kit (buffer AVL, buffer AW1, buffer AW2, carrier RNA, buffer AVE, kolommen, opvangtubes)
- Medium 199
- CleanAir Biohazard kast
- Vortex
- Microcentrifuge

Methode

1. Maak de buffers AW1 en AW2 volgens voorschrift door ethanol toe te voegen
2. Los carrier RNA op door 310µl buffer AVE eraan toe te voegen (carrier RNA-AVE)
3. Maak buffer AVL door 70µl carrier RNA-AVE aan 7ml AVL toe te voegen
4. Markeer 8 buizen voor de verdunningsreeks
5. Pipetteer 1680µl carrier RNA bevattende buffer AVL in iedere buis
6. Maak verdunningsreeks van het monster (100/10/1/0,1/0,01/0,001/0,0001% en blanco) met medium 199
7. Voeg 420µl van de verdunningsreeks toe aan de met buffer AVL gevulde buizen
8. Mix de inhoud en incubeer voor 10min bij kamertemperatuur
9. Voeg 1680µl ethanol toe aan iedere buis en vortex
10. Voeg 630µl uit iedere buis, toe aan een eigen kolom met een opvangtube en centrifugeer de kolom op 8000rpm voor 1min
11. Vervang de opvangtube voor een schone en herhaal stap 10 tot de buizen leeg zijn
12. Vervang de opvangtube en voeg 500µl buffer AW1 toe en centrifugeer op 8000rpm voor 1min
13. Vervang de opvangtube en voeg 500µl buffer AW2 toe en centrifugeer op 14000rpm voor 3min
14. Vervang de opvangtube en centrifugeer op 14000rpm voor 1min
15. Vervang de opvangtube voor een eppendorf cup en voeg 60µl buffer AVE toe op het membraan en centrifugeer op 8000rpm voor 1min
16. Verwijder het kolom en sla het epje met RNA op in de -20°C tot verder gebruik

Bijlage 2 RNA isolatie automatisch

Materiaal

- Steriele handschoenen
- Pipetten
- Steriele pipetpunten met filtertips
- Draaidopjes (wanneer virus transport nodig is)
- Microcentrifuge
- MagNA pure compact nucleic acid isolation kit I – Large volume (Reagent cartridge, tip tray, sample tube, elution tube, elution tube cap)
- Medium 199
- PBS
- MagNA pure compact
- CleanAir Biohazard kast

Methode

1. Markeer 8 sample tubes voor de verdunningsreeks
2. Maak verdunningsreeks van het monster(100/10/1/0,1/0,01/0,001/0,0001% en blanco) met medium 199 of PBS, totaal volume 500µl
3. Sluit de tubes af en centrifugeer kort
4. Zet de MagNA pure aan en druk op “Run” voor Sample Ordering Screen 1
5. Verwijder de verpakking van de reagent cartridges, scan de barcodes en plaats de cartridges in het rek, één voor ieder monster
6. Ga verder naar Sample Ordering Screen 2
7. Selecteer het protocol “Total nucleic acid plasma 500” met sample volume 500µl en elution 50µl
8. Plaats de tip trays, voor elk monster één, in het tip rek
9. Ga verder naar Sample Ordering screen 3
10. Voer de monsternamen in, plaats vervolgens de monsters in de eerste rij
11. Ga verder naar Sample Ordering screen 5(screen 4 wordt overgeslagen)
12. Scan de barcodes van de elution tubes en plaats ze in het elutie rek
13. Verwijder de transportdopjes en ga verder
14. Bevestig de informatie op het scherm
15. Sluit de MagNA pure en start de run
16. Wanneer de isolatie klaar is controleer op PASS of FAIL van het proces
17. Sluit de elution tubes en bewaar bij -20°C tot verder gebruik
18. Ga terug naar het menu en druk op “Maintenance” vervolgens op “UV decontamination” en start het proces

Bijlage 3 Virustitratie

Materiaal

- Steriele handschoenen
- Pipetten
- 96-wells en 6-wells microtiterplaten
- Controle monsters, type 1,2 en 3
- Medium M199
- Antibiotica
- Glutamine
- Foetaal kalverserum
- Vero cellen
- CO₂ Incubator +36°C (±1°C)/5% CO₂ (±1,5%)

Methode

1. Maak gebruiksmidium door 5% FBS, 1% glutamine en 1% antibiotica toe te voegen aan M199
2. Merk en vul buizen met 4,5ml onderhoudsmidium
3. Maak een 10-voudige verdunningsreeks door 500µl virusmonster toe te voegen, vortex en breng 500µl over naar de volgende buis
4. Maak Vero celsuspensie met concentratie 100.000 cellen/ml
5. Pipetteer 100µl celsuspensie in alle welletjes van een 96-wellsplaat
6. Beënt de plaat met 50µl virusverdunding
7. Incubeer 7 dagen bij 36°C
8. Lees de platen microscopisch af op cytoplasmatisch effect(CPE) en berekend de virusconcentratie in CCID₅₀/ml met de Reed & Muenh methode

[Inactiveringscurve]

9. Pipetteer 100µl celsuspensie in alle welletjes van de 96-wells plaat
10. Pipetteer 4ml celsuspensie in alle welletjes van de 6-wells plaat
11. Beënt de platen vervolgens met 50µl (96-wells plaat) en 100µl (6-wells plaat) virusverdundingen
12. Incubeer de platen 7 dagen bij 36°C
13. Lees de geïncubeerde platen microscopisch af op CPE en bereken de uiteindelijke virusconcentratie in CCID₅₀ per ml, gebruikmakend van de Reed & Muench methode.