

Reverse transcriptase activity in chicken-cell derived vaccine

WHO consultation, April 1998

A group of experts in virology, quality control of vaccines and epidemiology, met in Geneva on 24 to 25 April 1998, to review additional data regarding the presence of low levels of the enzyme reverse transcriptase (RTase) in some viral vaccines produced in chicken cells. This meeting was a follow-up of a previous consultation held in Geneva in October 1995 on the same topic.¹

WHO requirements for measles and mumps vaccines state that the chicken embryo cells used for production should be derived from closely monitored specific pathogen free (SPF) flocks and should be free of infectious avian retroviruses. The tests for retroviruses include assays for reverse transcriptase. In the past few years, several laboratories have developed assays with improved sensitivity for RTase based on nucleic acid amplification techniques. They have variously been termed PERT, Amp-RT or PBRT assays. The application of such sensitive assays detected low levels of RTase in vaccines produced using chicken embryo cells, including live attenuated vaccines for measles, mumps and yellow fever, manufactured in compliance with WHO requirements. The findings are consistent with data published 20 years ago demonstrating the presence of RTase-containing particles in chicken allantoic fluid in the absence of infectious avian retroviruses. No such activity has been reported in vaccines produced using human diploid cells.

The enzyme reverse transcriptase (RTase) is an RNA-dependent DNA polymerase characteristic of the group of viruses known as retroviruses, although such enzyme activity can also derive from other sources. Because the replication cycle of these viruses involves a double stranded DNA copy of the viral genome which integrates into the chromo-

¹ See No 14, 1996, pp 105-108.

Activité transcriptase inverse dans les vaccins préparés sur tissus de poulet

Consultation OMS, avril 1998

Un groupe d'experts en virologie, contrôle de la qualité des vaccins et épidémiologie, s'est réuni à Genève les 24 et 25 avril 1998, pour examiner les données complémentaires concernant la présence d'une faible activité transcriptase inverse dans certains vaccins viraux produits à partir de cellules de poulet. Cette réunion faisait suite à une consultation antérieure ayant eu lieu à Genève en octobre 1995 sur le même sujet.¹

Les normes de l'OMS concernant les vaccins contre la rougeole et les oreillons établissent que les cellules d'embryons de poulets utilisées pour la production doivent provenir d'élevages étroitement surveillés et exempts d'agents pathogènes spécifiques et qu'elles doivent être exemptes de rétrovirus aviaires infectieux. Les épreuves concernant les rétrovirus incluent des essais pour rechercher la transcriptase inverse. Au cours des dernières années, plusieurs laboratoires ont développé des épreuves présentant une sensibilité améliorée et reposant sur une technique d'amplification de l'acide nucléique. On leur a donné plusieurs dénominations : PERT, Amp-RT ou PBRT. La mise en œuvre d'épreuves aussi sensibles a permis de détecter de faibles niveaux d'activité transcriptase inverse dans des vaccins produits à partir de cellules d'embryons de poulets, dont les vaccins vivants atténués contre la rougeole, les oreillons et la fièvre jaune, produits selon les normes OMS. Ces résultats correspondent aux données publiées il y a 20 ans sur la présence de particules renfermant une activité transcriptase inverse dans le liquide allantoïdien de poulet en l'absence de rétrovirus aviaires infectieux. On n'a pas signalé cette activité dans les vaccins produits à partir de cellules diploïdes humaines.

La transcriptase inverse est une ADN-polymérase ARN-dépendante, enzyme caractéristique du groupe des virus connus sous le nom de rétrovirus, bien que cette activité enzymatique puisse dériver d'autres sources. Comme le cycle de réplication de ces virus implique l'intégration d'une copie ADN double brin du génome viral dans les chromosomes de la cellule hôte, la plupart

¹ Voir N° 14, 1996, pp 105 - 108.

some of the host, most animal and avian species contain evolutionary remnants of ancient infections as part of their genetic makeup. These remnants are known as endogenous proviral genomes or retroviral-like elements and generally they no longer encode a functional viral genome. Thus, the presence of genes for reverse transcriptase in the absence of infectious virus has been established for a variety of mammalian and avian cells.

The detection of low levels of RTase in vaccines derived from chicken cells gave rise to concern that a previously unidentified avian retrovirus could be present in vaccines prepared using chicken cells. The results of laboratory and other types of investigations were first reviewed by a group of experts at the WHO Consultation in 1995 and by the WHO Expert Committee on Biological Standardization (ECBS). After considering all the available evidence, they concluded that WHO Requirements for the manufacture and control of vaccines produced in chicken cells continue to be appropriate and there was no evidence to suggest that the presence of this enzyme has any medical significance for humans.¹ They also recommended that chicken cell-derived vaccines, which had a major role in international immunisation programmes, should continue to be used to prevent the diseases against which they are directed. Vaccines, such as those against measles, have a long and safe record of extensive international use and their beneficial effects in preventing the mortality and morbidity associated with the infections in the absence of vaccination are well established. Nevertheless, it was recommended that further studies should be undertaken to put into perspective the presence of low levels of RTase activity in cell substrates used for the manufacture of vaccines and other biological products.

Much work has been undertaken internationally over the past 2 years and the WHO meeting held in April 1998 was called to review both previous and recent scientific data. It is now clear that the RTase activity found in chicken cells and in vaccines derived from them is associated with particles. This particle-associated RTase activity is common to all chicken cells and is not related specifically to vaccine production.

Summary of Data

The data presented at the meeting can be summarised as follows:

- Low levels of particle-associated RTase activity are secreted from chicken embryo cells and consequently viral vaccines produced using chicken cells potentially may contain these particles.
- A variety of sensitive assays can be used to detect the RTase activity and results were in general consistent between laboratories.
- There is evidence for the presence of both Endogenous Avian Virus (EAV) and Avian Leukosis Virus (ALV) related sequences associated with the particles.
- Preliminary sequence studies of the EAV RNA reveal potential reading frames for the gag and pol genes, but not for an env gene. This latter gene is essential for retroviral infectivity.
- Extensive studies in 3 independent laboratories have investigated the infectivity of the particles for a variety of human and other mammalian cells. This had included the use of more than 14 different cell types, including human peripheral blood mononuclear cells in tests involving extensive passaging and co-cultivation. In no

des espèces animales et aviaires renferment, dans leur patrimoine génétique, des restes d'évolution provenant d'anciennes infections. On appelle ces reliques des génomes proviraux endogènes ou éléments semblables à des rétrovirus mais, en général, ils ne codent plus de génome viral fonctionnel. On a ainsi établi la présence de gènes pour la transcriptase inverse en l'absence d'infection virale dans diverses cellules de mammifères et d'oiseaux.

La détection d'une faible activité transcriptase inverse dans des vaccins obtenus à partir de cellules de poulet a suscité des inquiétudes: un rétrovirus aviaire, inconnu jusqu'à présent, ne pouvait-il pas être présent dans les vaccins préparés sur tissus de poulet ? Les résultats de laboratoire et de recherches d'autres types ont été tout d'abord examinés par un groupe d'experts lors de la consultation OMS de 1995 et par le Comité OMS d'experts de la Standardisation biologique. Après avoir considéré tous les faits disponibles, ils ont conclu que les normes OMS concernant la fabrication et le contrôle des vaccins produits à partir de cellules de poulet convenaient toujours et que rien ne laissait supposer que la présence de cette enzyme pouvait avoir une signification médicale pour l'être humain.¹ Ils ont également recommandé que l'utilisation des vaccins préparés sur tissus de poulet, qui ont joué un rôle majeur dans les programmes internationaux de vaccination, se poursuive pour lutter contre les maladies pour lesquelles ils sont produits. Des vaccins, comme celui contre la rougeole, ont fait l'objet d'une utilisation extensive depuis longtemps et sans problème et leurs effets bénéfiques dans la prévention de la mortalité et de la morbidité associées à ces infections en l'absence de vaccination sont bien établis. Les experts ont néanmoins recommandé d'entreprendre de nouvelles études pour mettre en perspective la présence de faibles niveaux d'activité transcriptase inverse dans les substrats cellulaires utilisés pour la fabrication de vaccins et d'autres produits biologiques.

De nombreux travaux ont été entrepris au niveau international au cours des 2 dernières années et la réunion de l'OMS en avril 1998 a été organisée afin d'examiner les données scientifiques antérieures et récentes. Il est clair désormais que l'activité transcriptase inverse découverte dans les cellules de poulet et dans les vaccins qui en dérivent s'associe à la présence de particules. Cette activité associée aux particules est commune à toutes les cellules de poulet et elle n'est pas liée spécifiquement à la production de vaccins.

Résumé des données

Les données présentées à la réunion peuvent être résumées comme suit :

- Une faible activité transcriptase inverse associée à des particules est sécrétée par les cellules d'embryons de poulet et, en conséquence, les vaccins viraux produits à partir de ces cellules peuvent renfermer ces particules.
- On peut utiliser divers essais sensibles pour détecter cette activité et les résultats se retrouvent en général d'un laboratoire à l'autre.
- La présence de séquences provenant du virus aviaire endogène (EAV: Endogenous Avian Virus) et du virus de la leucose aviaire (ALV: Avian Leukosis Virus) associées aux particules est établie.
- Les études préliminaires portant sur les séquences d'ARN de l'EAV révèlent des cadres de lecture potentiels pour les gènes gag et pol, mais pas pour le gène env, ce dernier jouant pourtant un rôle essentiel dans l'infectiosité du rétrovirus.
- Des études poussées dans 3 laboratoires indépendants se sont intéressées à l'infectiosité des particules pour diverses cellules provenant de l'homme ou de mammifères. On a eu recours à plus de 14 types différents de cellules, dont des mononucléaires dans le sang périphérique humain, pour des épreuves impliquant l'utilisation extensive du repiquage et de la co-culture.

¹ See No 14, 1996, pp. 105-108.

¹ Voir N° 14, 1996, pp. 105-108.

case could transmission of RTase activity or productive infection be demonstrated.

- Epidemiological studies have revealed no association between the use of chicken cell derived vaccines and an increased rate of detection of cancers, including those of childhood.
- Limited studies of the sera of vaccinees following several doses of measles vaccine did not reveal any antibodies to avian retroviral antigens. In addition, in a separate study, no retroviral genome sequences were detected in the peripheral blood mononuclear cells of vaccinees. In contrast, it has been reported that poultry workers, who are potentially exposed to infectious avian retroviruses, and some individuals in the general population, have antibodies to avian retroviral antigens in their blood.

Conclusions and Recommendations

Taking into account past and more recent information, the group came to the following conclusions, and made recommendations, regarding the use of chicken cells for the production of live viral vaccines:

- I. As a broad recommendation, WHO should establish an International Task Force involving scientists from academia, regulatory authorities and industry to coordinate collaborative research relevant to the characterisation, quality control and safety assessment of *all* cell substrates intended for vaccine production. A major priority of the Task Force should be to plan and execute collaborative studies and promote the development and exchange of reagents between laboratories involved in this work.
- II. The cell substrate used in the production of a live vaccine is a critical parameter in the level of attenuation or virulence of live vaccine viruses. If the cells used for production were to be changed, there could be entirely unknown effects on the safety and efficacy of these vaccines. Thus, any switch to an alternative cell substrate for the production of a live viral vaccine would be akin to the development of a novel vaccine with all the implications that that would bring.
- III. In the current state of knowledge, based on our understanding of avian retroviruses and endogenous retroviral genomes, together with the available epidemiological studies, the risk of vaccine-preventable disease is real and quantifiable, whereas the risk posed by the chicken cell derived particles is theoretical and remote.
- IV. Vaccines prepared on chicken cells or embryonated eggs continue to play a major role in immunisation programmes world-wide and have a long history of safe usage and efficacy. They should continue to be used, taking account of existing WHO requirements for their production and quality control.
- V. It was clear to the group of experts that additional information was required on certain points and it was considered that priority should be given to the following:
 - Surveillance related to issues of the safety of viral vaccines should continue, including sero-epidemiological studies of vaccine recipients and studies for the presence of avian genetic material in vaccine recipients.
 - Further studies on the incidence of cancer or other possible adverse effects, including the analysis of existing data, should be undertaken and the age range extended.

Aucun cas de transmission de l'activité transcriptase inverse ou d'infection productive n'a pu être démontré.

- Les études épidémiologiques n'ont révélé aucun lien entre l'utilisation de vaccins préparés sur tissus de poulet et une augmentation du taux de dépistage des cancers, y compris ceux de l'enfance.
- Des études limitées sur le sérum des sujets ayant reçu plusieurs doses de vaccin antirougeoleux n'ont pas montré la présence d'anticorps contre des antigènes rétroviraux aviaires. De plus, une étude séparée n'a détecté aucune séquence génomique rétrovirale dans les mononucléaires du sang périphérique des sujets vaccinés. En revanche, on a observé la présence d'anticorps dirigés contre les antigènes rétroviraux aviaires dans le sang des personnes qui travaillent avec la volaille et sont exposées potentiellement aux rétrovirus aviaires infectieux. Cela arrive aussi pour certains sujets dans la population générale.

Conclusions et recommandations

En tenant compte des informations obtenues dans le passé et de celles plus récentes, le groupe est arrivé aux conclusions suivantes et a fait des recommandations concernant l'utilisation des cellules de poulet pour la production de vaccin viraux vivants.

- I. Une recommandation générale a consisté à demander à l'OMS de créer un Groupe spécial international rassemblant des scientifiques venant de l'Université, des autorités de réglementation et de l'industrie pour coordonner les efforts de recherche sur la caractérisation, le contrôle de qualité et l'évaluation de l'innocuité pour *tous* les substrats cellulaires destinés à la production de vaccins. Ce groupe devrait avoir dans ses priorités principales la planification et l'exécution d'études en collaboration, ainsi que la promotion du développement et de l'échange des réactifs entre les laboratoires engagés dans ce travail.
- II. Le substrat cellulaire utilisé pour la production d'un vaccin vivant est un paramètre essentiel pour le niveau d'atténuation ou la virulence des virus qu'il renferme. Si les cellules utilisées pour la production doivent être changées, cela peut avoir des effets totalement inconnus sur l'innocuité et l'efficacité du vaccin concerné. Ainsi, l'adoption d'un autre substrat cellulaire pour la production d'un vaccin viral vivant revient à développer un nouveau vaccin avec toutes les conséquences que cela implique.
- III. Dans l'état actuel des connaissances, reposant sur notre compréhension des rétrovirus aviaires et des génomes rétroviraux endogènes, et compte tenu des études épidémiologiques disponibles, le risque posé par les maladies évitables par la vaccination est réel et quantifiable, tandis que celui entraîné par les particules provenant des cellules de poulet reste théorique et faible.
- IV. Les vaccins préparés sur des cellules de poulet ou des œufs embryonnés continuent de jouer un rôle majeur dans les programmes de vaccination du monde entier et leur innocuité et leur efficacité à l'utilisation se démontrent depuis de longues années. Il convient donc de continuer à les employer en tenant compte des normes OMS existant pour leur production et le contrôle de qualité.
- V. Il est apparu clairement au groupe d'experts que des informations complémentaires étaient requises sur certains points et il a considéré que les éléments suivants étaient prioritaires:
 - La surveillance relative aux questions d'innocuité des vaccins viraux doit se poursuivre et comprendre des études séro-épidémiologiques des sujets vaccinés et la recherche de la présence de matériel génétique aviaire chez ces sujets.
 - Il convient d'entreprendre de nouvelles études sur l'incidence du cancer ou d'autres effets indésirables possibles, avec l'analyse des données existantes, et d'élargir les âges étudiés.

- Studies on the biological properties of the particles including their ability to establish non-productive infection, should be undertaken.
- The ability of the particles to form pseudotypes with vaccine viruses grown in the chicken cells should be investigated.
- Further information on the characteristics of the EAV family of endogenous retroviral genomes should be obtained. Investigations of the EAV and ALV endogenous genomes in flocks used for vaccine production are encouraged.

- Il convient d'entreprendre des études sur les propriétés biologiques des particules, y compris leur aptitude à créer des infections non productives.
- Il faut étudier la possibilité des particules de former des pseudotypes avec les virus vaccinaux cultivés dans les cellules de poulet.
- Il faudrait obtenir d'autres renseignements sur les caractéristiques de la famille EAV des génomes rétroviraux endogènes. On encourage la recherche des génomes endogènes EAV et ALV dans les élevages utilisés pour la production vaccinale.