

Infektionsrisiko bei biologischen Materialien

Wodurch werden Infektionserreger eingeschleppt?

Um Versuchstierbestände (insbesondere Nager) auf Dauer frei von unerwünschten Mikroorganismen halten zu können, müssen alle relevanten Einschleppungsquellen berücksichtigt werden. Es besteht kein Zweifel, dass von infizierten Tieren das größte Risiko der Erregereinschleppung ausgeht. Aber auch von solchen Tieren stammende Organe bzw. Teile (z. B. Serum, Ascitesflüssigkeit, monoklonale Antikörper, Tumoren, Zellen, aber auch Eizellen bzw. Embryonen, Sperma, etc.) können mit Infektionserregern kontaminiert sein, wenn sie während einer akuten Infektion aus dem Organismus entnommen wurden. Somit können von Tieren stammende biologische Materialien ebenfalls eine wesentliche Einschleppungsquelle für unerwünschte Mikroorganismen darstellen. Darüber hinaus können selbst Materialien humanen Ursprungs nagerspezifische Mikroorganismen enthalten, wenn sie in Nagern passagiert wurden! Oft ist die Dokumentation über die Passagierung auch von Zelllinien, die von kommerziellen Anbietern oder Stammsammlungen erhältlich sind, lückenhaft, so dass solche Zellen vor der Verwendung unbedingt getestet werden sollten.

Welche Infektionserreger werden eingeschleppt?

Häufiger werden verschiedene Viren mit biologischen Materialien verschleppt, aber auch Bakterien (z. B. *Pasteurella pneumotropica*, *Helicobacter hepaticus*) und Parasiten (*Encephalitozoon cuniculi*) wurden als Kontaminanten nachgewiesen. Viele Nagerviren wie das Mice Minute Virus (MMV), Murine Pneumotropic Virus (MPtV, K Virus), Maus Encephalomyelitis Virus (MEV) und Maus Adenovirus 1 (MAdV-1, FL) wurden sogar ursprünglich aus kontaminierten Viruspools oder, wie z. B. Polyoma Virus, Kilham Rat Virus (KRV) und Toolan's H-1 Virus, erstmalig aus kontaminierten Tumoren isoliert. Gerade die letzten publizierten Ausbrüche von Mäusepocken (Ektromelie) in Labortierhaltungen nach Verwendung eines kontaminierten Mäuseserums weisen auf das immense Infektionsrisiko hin, das von biologischen Proben ausgeht. Auch für Menschen besteht ein Infektionsrisiko. Beispielsweise wurden in Tumoren, die von Nagern stammten, das Virus der Lymphozytären Choriomeningitis und Hantaviren gefunden. Von beiden Erregern gibt es Berichte über Infektionen des Menschen, die mit kontaminierten biologischen Materialien in Verbindung gebracht werden.

Kontaminierte biologische Materialien können tiefgefroren gelagert werden, ohne daß die Infektiosität verloren geht. Somit kann auch bei Lagerung über lange Zeiträume ein Gesundheitsrisiko für Tiere und für Menschen von solchen Proben ausgehen. Aber auch Erreger, die keine klinischen Symptome hervorrufen, können sich auf die Ergebnisse von Tierversuchen auswirken und damit Ursache von Fehlinterpretationen sein oder vermeidbare Wiederholungsuntersuchungen notwendig machen. Dazu gehören in erster Linie die Parvoviren [z. B. Mice Minute Virus (MMV), Mouse Parvovirus (MPV), Kilham Rat Virus (KRV)] und ganz besonders das Laktat-Dehydrogenase-Virus (LDV). Gerade der letztgenannte Erreger ist ein sehr häufiger Kontaminant in biologischen Materialien, die von der Maus stammen. Auch in der letzten Zeit publizierte Untersuchungen belegen, dass das LDV in einem sehr hohen Prozentsatz (70%) von Transplantationstumoren gefunden werden kann. Dieses Virus verursacht eine lebenslange Virämie, ohne dass dabei wesentliche klinische Symptome auftreten. Deshalb sind zwangsläufig alle von LDV-infizierten Tieren stammende Materialien mit diesem Virus kontaminiert.

Können Infektionserreger wieder aus der Probe entfernt werden?

Grundsätzlich ist es in vielen Fällen möglich, viruskontaminierte biologische Materialien zu dekontaminieren. Das Vorgehen ist dabei stark abhängig von der Art des Materials sowie von dem Erreger, der eliminiert werden soll. Bei zellfreien Proben (z. B. Serum, Ascitesüberstände) sind oftmals physikalische oder biochemische Reinigungsmethoden geeignet, um vorhandene Viren oder andere Erreger zu eliminieren. Bei zellhaltigen Materialien (z. B. Tumoren) kann - soweit möglich - die Passagierung in einer für den nachgewiesenen Erreger nicht empfänglichen Tierart für dessen Eliminierung geeignet sein. Insbesondere bei Kontamination mit LDV ist die in-vitro-Kultivierung von kontaminierten Zellen über mehrere Passagen eine zuverlässige Methode, um dieses Virus sicher zu eliminieren. In vielen Fällen wird allerdings ein Entfernen von Viruskontamination in biologischen Materialien nicht oder nur mit erheblichem Aufwand möglich sein.

Wie können biologische Materialien auf Infektionserreger getestet werden?

Einer sicheren Prophylaxe mit dem Ziel, kontaminierte Materialien rechtzeitig zu erkennen, kommt besondere Bedeutung zu. Es wird daher dringend empfohlen, von Tieren stammende Materialien und auch Materialien humanen Ursprungs, von denen ein Risiko der Erregerübertragung ausgeht, vor der Verwendung im Tierexperiment auf mikrobielle Kontamination zu untersuchen. Es sollten nur solche Materialien verwendet werden, bei denen das Freisein von unerwünschten Erregern nachgewiesen ist. Wenn eine Unbedenklichkeitsbescheinigung für das jeweilige biologische Material nicht vorliegt, sollte eine Untersuchung erfolgen.

Für den Nachweis von Kontaminationen (Viren, Bakterien, bestimmte Parasiten) in Materialien aus Nagern wird schon seit Jahrzehnten der "mouse/rat antibody production test" (MAP/RAP Test) eingesetzt. Bei diesem Test wird das Untersuchungsmaterial in erreger- und antikörperfreie Tiere injiziert. Drei bis vier Wochen später werden Blutproben dieser Tiere auf Antikörper gegen die entsprechenden Erreger untersucht.

Neben dem MAP/RAP Test kommen andere Methoden zum Ausschluss von Viruskontaminationen in Frage. Dazu gehören z. B. Virusnachweise über Zellkulturen oder mit molekularbiologischen Methoden (insbesondere PCR). Der Nachweis bzw. Ausschluss von Erregern durch PCR ist schneller und kostengünstiger durchführbar als ein MAP Test. Außerdem müssen keine Tiere dafür eingesetzt werden. Nachteilig ist jedoch, daß diese Methode noch nicht überall etabliert ist und daß durch die PCR keine Information über die Infektiosität eines Erregers erhältlich ist, da sowohl inaktivierte als auch infektiöse Erreger detektiert werden. Der Nachweis bzw. Ausschluss von bakterieller Kontamination ist für die meisten zu erwartenden Keime durch kulturelle Untersuchungen leicht möglich. Der Ausschluss humanpathogener Viren aus humanen Proben (z. B. Hepatitisviren, HIV) sollte selbstverständlich sein.

Bei den in Zellkulturen (incl. ES-Zellen) häufiger vorkommenden Mykoplasmen handelt es sich überwiegend um bovine, porcine oder humane Arten. Sie sind für Versuchstiere (Maus, Ratte) üblicherweise apathogen und werden normalerweise, selbst bei immundefizienten Tieren wie z. B. Nacktmäusen, bei Tierpassagen von Makrophagen eliminiert. Es wurden allerdings auch nagerrelevante Mykoplasmen (z. B. *M. pulmonis*) nach in vitro-Passagen in biologischen Materialien nachgewiesen. Aber auch andere Mykoplasmenspezies sollten nicht toleriert werden, da sie eine Vielzahl von Zellfunktionen beeinflussen und auch Auswirkungen auf Tiere bzw. an Tieren vorgenommene Manipulationen (z. B. die Angehrate von Blastozysten nach Injektion kontaminierter ES-Zellen) nicht ausgeschlossen werden können. Für den Nachweis von Mykoplasmen sollte bevorzugt eine PCR eingesetzt werden.

Weiterführende Literatur

- Bhatt, P. N., R. O. Jacoby, and S. W. Barthold (1986). Contamination of transplantable murine tumors with lymphocytic choriomeningitis virus. *Lab. Anim. Sci.* **36**, 136-139.
- Bootz, F., I. Sieber, D. Popovic, M. Tischhauser, and F. R. Homberger (2003). Comparison of the sensitivity of in vivo antibody production tests with in vitro PCR-based methods to detect infectious contamination of biological materials. *Lab. Anim.* **37**, 341-351.
- Collins, M. J., and C. Parker (1972). Murine virus contamination of leukemia viruses and transplantable tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **49**, 1139-1143.
- Dick, E. J., C. L. Kittell, H. Meyer, P. L. Farrar, S. L. Ropp, J. J. Esposito, R. M. L. Buller, H. Neubauer, Y. H. Kang, and A. E. McKee (1996). Mousepox outbreak in a laboratory mouse colony. *Lab. Anim. Sci.* **46**, 602-611.
- Dykewicz C. A., V. M. Dato, S. P. Fisher-Hoch, M. V. Howarth, G. I. Perez-Oronoz, S. M. Ostroff, H. Gary, L. B. Schonberger, and J. B. McCormick (1992). Lymphocytic choriomeningitis outbreak associated with nude mice in a research institute. *J. Am. Med. Assoc.* **267**, 1349-1353.
- Goto, K., K.-I. Ishihara, A. Kuzuoka, Y. Ohnishi, and T. Itoh (2001). Contamination of transplantable human tumor-bearing lines by *Helicobacter hepaticus* and its elimination. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 3703-3704.
- Lipman, N. S., S. Perkins, H. Nguyen, M. Pfeffer, and H. Meyer (2000). Mousepox resulting from use of ectromelia virus-contaminated, imported mouse serum. *Comp. Med.* **50**, 425-435.
- Nakai, N., C. Kawaguchi, K. Nawa, S. Kobayashi, Y. Katsuta, and M. Watanabe (2000). Detection and elimination of contaminating microorganisms in transplantable tumors and cell lines. *Exp Anim.* **49**, 309-313.
- Nicklas, W., V. Kraft, and B. Meyer (1993). Contamination of transplantable tumors, cell lines, and monoclonal antibodies with rodent viruses *Lab. Anim. Sci.* **43**, 296-300.
- Plageman, P. G. W., and H. E. Swim (1966). Relationship between the lactic dehydrogenase-elevating virus and transplantable murine tumors. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **121**, 1142-1146.
- Simpson, W., D. J. Simmons, and A. J. Davies (1980). Effect of *Pasteurella pneumotropica* on the growth of transplanted Walker sarcoma cells. *Brit. J. Cancer* **42**, 473-476.

Autor: Werner Nicklas, DKFZ Heidelberg