



GV-SOLAS

Gesellschaft für Versuchstierkunde
Society for Laboratory Animal Science

Fachinformation

aus dem Ausschuss für Hygiene

Infektionsrisiko bei biologischen Materialien

Stand Juni 2015

**verfasst von:
Werner Nicklas**

Inhaltsverzeichnis

Allgemeines.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Käfigwechselstation (KWS)	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Desinfektionsmittel	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Vorbereitung der IVCs	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Wechseln der IVCs.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Gebrauchte IVCs.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Literatur	6

Wie werden Infektionserreger in eine Tierhaltung eingeschleppt?

Um Versuchstierbestände (insbesondere Nagerhaltungen) frei von unerwünschten Mikroorganismen zu halten, müssen alle relevanten Infektionsquellen berücksichtigt werden. Es besteht kein Zweifel darüber, dass das größte Risiko für eine Erregereinschleppung von infizierten Tieren ausgeht. Auch jegliches biologische Material (z.B. Serum, Aszitesflüssigkeit, Tumore, Organe, Zellen, befruchtete Eizellen, Embryonen, Sperma) kann mit Infektionserregern kontaminiert sein, wenn es von einem infizierten Organismus stammt. Derartige Materialien müssen daher als mögliche Infektionsquellen angesehen werden. Sogar Material menschlichen Ursprungs kann nach der Passage im Tier durch nagerspezifische Mikroorganismen kontaminiert sein. Oft ist die Dokumentation über die Herkunft von biologischem Material, auch wenn es von kommerziellen Anbietern oder Stammsammlungen stammt, lückenhaft. Daher ist es anzuraten, derartiges Material vor der Anwendung am Versuchstier hinsichtlich einer Kontamination zu überprüfen.

Welche Infektionserreger können eingeschleppt werden?

Viren werden häufig durch biologische Materialien übertragen, aber auch Bakterien (z.B. *Pasteurella pneumotropica* (Simpson et al., 1980), *Helicobacter hepaticus* (Goto et al. 2001) und andere (Criley et al., 2001)) sowie Parasiten (*Encephalitozoon cuniculi*; Petri 1965) wurden als Kontaminanten nachgewiesen. Einige bei der Maus vorkommende Viren wie das Minute Virus of Mice (MVM), K Virus, Theiler's Murines Encephalomyelitisvirus und Maus Adenovirus wurden aus kontaminierten Viruspools erstisoliert. Auch das Polyoma Virus, Maus Parvovirus (MPV), Kilham Rat Virus (KRV) und Toolan's H-1 Virus wurden erstmalig in kontaminierten Tumoren oder Zellen gefunden. Die letzten publizierten Ausbrüche von Ektrmelie (Mäusepocken) bei Versuchsmäusen nach Verwendung kontaminierter Seren unterstreichen das immense Infektionsrisiko durch biologisches Material (Dick et al. 1996, Lipman et al. 2000b, Labelle et al. 2009).

Auch für den Menschen besteht ein Infektionsrisiko. Beispielsweise wurden in von Nagern stammenden Tumoren das lymphozytäre Choriomeningitisvirus (LCMV) (Bhatt et al. 1986; Dykewicz et al. 1992) und Hantaviren (Yamanishi et al. 1983) nachgewiesen. Von beiden Viren sind Infektionen des Menschen bekannt, die durch Kontakt mit biologischem Material hervorgerufen wurden (Biggar et al. 1977; Bowen et al. 1975; Kawamata et al. 1987). Nicht nur beim Umgang mit biologischen Materialien, auch beim therapeutischen Einsatz von biologischen Materialien (z. B. monoklonalen Antikörpern) ist ein Infektionsrisiko für Menschen nicht auszuschließen (Carthew 1986, Harbour und Woodhouse 1990). Sie müssen deshalb vor ihrem Einsatz auf Virusfreiheit geprüft sein.

Die Lagerung von kontaminiertem biologischem Material bei niedrigen Temperaturen reduziert die Infektiosität nicht. Daher können über lange Zeiträume gelagerte Materialien gesundheitsgefährdend für Mensch und Tier sein. Andere Erreger können sich auf die Ergebnisse der Tierversuche auswirken und damit Ursache von Fehlinterpretationen sein oder eine Wiederholung der Experimente notwendig machen, obwohl sie keine klinischen Symptome bei Tier oder Mensch hervorrufen (Peterson, 2008). Dazu gehören die Parvoviren (z.B. MVM, MPV, KRV, Rat minute Virus (RMV)) (Guetta et al. 1986; Moody et al. 2011) und besonders das Laktatdehydrogenase Virus (LDV) (Riley 1974). LDV kontaminiert häufig von der Maus stammendes biologisches Material. Es wurde nachgewiesen, dass LDV in einem sehr hohen Prozentsatz (bis zu 70%) transplantiertbarer Tumoren vorkommen kann (Collins

und Parker 1972, Nicklas et al. 1993). Da dieses Virus eine lebenslange Virämie verursacht, sind zwangsläufig alle Materialien von LDV-infizierten Mäusen mit diesem Virus kontaminiert.

Können Infektionserreger aus kontaminiertem Material eliminiert werden?

Grundsätzlich kann mit Viren kontaminiertes biologisches Material dekontaminiert werden. Die Wahl der Methode hängt dabei stark von der Art des Materials sowie von dem zu eliminierenden Virus ab. Bei zellfreiem Material, z.B. Serum oder Aszitesflüssigkeit, sind häufig physikalische oder biochemische Methoden ausreichend, um vorhandene Viren oder andere Erreger zu eliminieren. Bei zellhaltigem Material, wie z.B. Tumoren, können die entsprechenden Viren durch Transplantation der Tumoren in eine Tierart, die nicht empfänglich für das kontaminierende Virus ist, eliminiert werden (Rülicke et al. 1991; Dagnaes-Hansen und Horsman 2005; Takakura et al. 2000; Nakai et al. 2000). Bei LDV ist die in vitro-Kultivierung der kontaminierten Zellen die verlässlichste Methode zur Eliminierung (Plagemann und Swim 1966), aber auch andere Methoden sind beschrieben (Liu et al. 2011). In vielen Fällen wird allerdings ein Entfernen des Erregers nicht oder nur mit erheblichem Aufwand und Kosten möglich sein.

Wie können biologische Materialien auf Infektionserreger getestet werden?

Der Prophylaxe zur Verhinderung einer Einschleppung von Infektionserregern sowie den Nachweismethoden zum frühen Nachweis einer Kontamination kommt eine besondere Bedeutung zu. Daher wird dringend empfohlen, von Tieren stammende Materialien, von denen ein Risiko der Erregerübertragung ausgehen kann, vor der Verwendung im Tierversuch hinsichtlich einer mikrobiellen Kontamination zu überprüfen. Das gilt ebenso für vom Menschen stammende, potenziell kontaminierte Materialien. Es sollte lediglich biologisches Material, das nachweislich frei von unerwünschten Erregern ist, verwendet werden. Ist keine Unbedenklichkeitserklärung für das biologische Material vorhanden, sollte eine Untersuchung erfolgen.

Der sogenannte „*mouse/rat antibody production test*“ (MAP/RAP Test) wird seit Jahrzehnten für den Nachweis einer Kontamination mit Infektionserregern (Viren, Bakterien, Parasiten) eingesetzt (Collins und Parker 1972; Nicklas et al. 1993; Lewis und Clayton 1971). Dieser Test basiert auf der Antikörperproduktion gegen in der Probe enthaltene Infektionserreger. Das zu untersuchende Material wird dazu in erreger- und antikörperfreie Tiere injiziert. Nach drei bis vier Wochen werden Blutproben dieser Tiere auf Antikörper gegen entsprechende Erreger untersucht.

Neben dem MAP/RAP Test kommen eine Vielzahl verschiedener Methoden zur Anwendung. Dazu gehören z.B. Zellkulturtechniken (Desouza und Smith 1989) und molekulare Methoden (insbesondere PCR; Bauer et al. 2004; Blank et al. 2004; Bootz und Sieber 2002; Bootz et al. 2003; Morse 1990; Yagami et al. 1995; Bootz und Wolf, 2007). Der Nachweis bzw. Ausschluss von Erregern mittels PCR ist schneller und kostengünstiger durchführbar als ein MAP/RAP Test. Darüber hinaus müssen keine Tiere dafür eingesetzt werden. Dennoch sind diese Methoden noch nicht überall etabliert und der MAP/RAP Test mag in bestimmten Fällen der PCR-Methode überlegen sein (Lipman et al. 2000a). Ein Nachteil der PCR ist, dass keine Aussage über die Infektiosität des kontaminierenden Erregers getroffen werden kann, da sowohl aktive als auch inaktive Erreger nachgewiesen werden. Der Nachweis einer bakteriellen Kontamination ist mittels kultureller Untersuchungen leicht möglich. Der

Ausschluss humanpathogener Erreger aus humanen Proben (z.B. Hepatitis Virus, HIV) sollte selbstverständlich sein.

Bei den in Zellkulturen (inkl. ES-Zellen) häufig nachgewiesenen Mykoplasmen-Arten handelt es sich überwiegend um bovine, porcine und humane Stämme. Sie sind üblicherweise für Versuchstiere (Maus, Ratte) apathogen und werden normalerweise während der Passage durch das Tier, selbst bei immundefizienten Tieren wie z.B. Nacktmäusen, von Makrophagen eliminiert. Es wurden allerdings auch nagerrelevante Mykoplasmen (*Mycoplasma pulmonis*) nach in vitro-Passagen in biologischen Materialien nachgewiesen (Nicklas et al. 1993). Auch andere nicht-nagerrelevante Mykoplasmen-Spezies sollten jedoch nicht toleriert werden, da diese eine Vielzahl an Zellfunktionen beeinflussen und auch Auswirkungen auf die Tiere oder an Tieren vorgenommene Manipulationen (z.B. Zuchterfolg) haben können (Markoullis et al. 2009; Boslett et al. 2014). Für den Nachweis von Mykoplasmen sollte bevorzugt die PCR eingesetzt werden.

Literatur

- Bauer BA, Besch-Williford CL, Riley LK. 2004. Comparison of the mouse antibody production (MAP) assay and polymerase chain reaction (PCR) assays for the detection of viral contaminants. *Biologicals* 32:177-182.
- Bhatt PN, Jacoby RO, Barthold SW. 1986. Contamination of transplantable murine tumors with lymphocytic choriomeningitis virus. *Lab Anim Sci* 36:136-139.
- Biggar RJ, Schmidt TJ, Woodall JP. 1977. Lymphocytic choriomeningitis in laboratory personnel exposed to hamsters inadvertently infected with LCM virus. *J Am Vet Med Assoc* 171:829-832.
- Blank WA, Henderson KS, White LA. 2004. Virus PCR assay panels: An alternative to the mouse antibody production test. *Lab Anim* 33:26-32.
- Bootz F, Sieber I. 2002. Replacement of mouse and rat antibody production test; comparison of sensitivity between the in vitro and in vivo methods. *ALTEX* 19 Suppl 1:76-86.
- Bootz F, Sieber I, Popovic D, Tischhauser M, Homberger FR. 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.
- Bootz FO, Wolf FR. 2007. Animalfree screening of biological materials for contamination by rodent viruses. *ALTEX* 24 Spec No, 19-21.
- Boslett B, Nag S, Resnick A. 2014. Detection and antibiotic treatment of *Mycoplasma arginini* contamination in a mouse epithelial cell line restore normal cell physiology. *Biomed Res Int* 532105.
- Bowen GS, Calisher CH, Winkler WG, Kraus AL, Fowler EH, Garman RH, Fraser DW, Hinman AR. 1975. Laboratory studies of a lymphocytic choriomeningitis virus outbreak in man and laboratory animals. *Am J Epidemiol* 102:233-240.
- Carthew P. 1986. Is rodent virus contamination of monoclonal-antibody preparations for use in human therapy a hazard. *J Gen Virol* 67:963-974.
- Collins M, Parker J. 1972. Murine virus contaminants of leukemia viruses and transplantable tumors. *J Nat Cancer Inst* 49:1139.
- Criley JM, Carty AJ, Besch-Williford CL, Franklin CL. 2001. *Coxiella burnetii* infection in C.B-17 scid-bg mice xenotransplanted with fetal bovine tissue. *Comp Med* 51:357-360.
- Dagnaes-Hansen F, Horsman MR. 2005. Experience with mouse hepatitis virus sanitation in three transplantable murine tumour lines. *Lab Anim* 39:394-399.
- Desouza M, Smith AL. 1989. Comparison of isolation in cell-culture with conventional and modified mouse antibody-production tests for detection of murine viruses. *J Clin Microbiol* 27:185-187.
- Dick EJ Jr, Kittell CL, Meyer H, Farrar PL, Ropp SL, Esposito JJ, Buller RM, Neubauer H, Kang YH, McKee, A. E. 1996. Mousepox outbreak in a laboratory mouse colony. *Lab Anim Sci*, 46:602-611.
- Dykewicz CA, Dato VM, Fisher-Hoch SP, Howarth MV, Perez-Oronoz GI, Ostroff SM, Gary H Jr, Schonberger LB, McCormick JB. 1992. Lymphocytic choriomeningitis outbreak associated with nude mice in a research institute. *JAMA* 267:1349-1353.
- Goto K, Ishihara KI, Kuzuoka A, Ohnishi Y, Itoh T. 2001. Contamination of transplantable human tumor-bearing lines by *Helicobacter hepaticus* and its elimination. *J Clin Microbiol* 39:3703-3704.
- Guetta E, Graziani Y, Tal J. 1986. Suppression of Ehrlich ascites tumors in mice by minute virus of mice. *J Nat Cancer Inst* 76:1177-1180.
- Harbour C, Woodhouse G. 1990. Viral contamination of monoclonal-antibody preparations - potential problems and possible solutions. *Cytotechnology* 4:3-12.

- Kawamata J, Yamanouchi T, Dohmae K, Miyamoto H, Takahashi M, Yamanishi K, Kurata T, Lee HW. 1987. Control of laboratory acquired hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) in Japan. *Lab Anim Sci* 37:431-436.
- Labelle P, Hahn NE, Fraser JK, Kendall LV, Ziman M, James E, Shastri N, Griffey SM. 2009. Mousepox detected in a research facility: case report and failure of mouse antibody production testing to identify Ectromelia virus in contaminated mouse serum. *Comp Med* 59:180-186.
- Lewis VJ, Clayton DM. 1971. Evaluation of mouse antibody production test for detecting 3 murine viruses. *Lab Anim Sci* 21:203-206.
- Lipman NS, Henderson K, Shek W. 2000a. False negative results using RT-PCR for detection of lactate dehydrogenase-elevating virus in a tumor cell line. *Comp Med* 50:255-256.
- Lipman NS, Perkins S, Nguyen H, Pfeffer M, Meyer H. 2000b. Mousepox resulting from use of ectromelia virus-contaminated, imported mouse serum. *Comp Med* 50:426-435.
- Liu H, Bockhorn J, Dalton R, Chang YF, Qian D, Zitzow LA, Clarke MF, Greene GL. 2011. Removal of lactate dehydrogenase-elevating virus from human-in-mouse breast tumor xenografts by cell-sorting. *J Virol Methods* 173:266-270.
- Markoullis K, Bulian D, Holzwimmer G, Quintanilla-Martinez L, Heiliger KJ, Zitzelsberger H, Scherb H, Mysliwicz J, Uphoff CC, Drexler HG, Adler T, Busch DH, Schmidt J, Mahabir E. 2009. Mycoplasma contamination of murine embryonic stem cells affects cell parameters, germline transmission and chimeric progeny. *Transgenic Res* 18:71-87.
- Moody M, Alves W, Varghese J, Khan F. 2011. Mouse Minute Virus (MMV) contamination--a case study: detection, root cause determination, and corrective actions. *PDA J Pharm Sci Technol* 65:580-588.
- Morse SS. 1990. Comparative sensitivity of infectivity assay and mouse antibody-production (MAP) test for detection of mouse thymic virus (MTLV). *J Virol Methods* 28:15-24.
- Nakai N, Kawaguchi C, Nawa K, Kobayashi S, Katsuta Y, Watanabe, M. 2000. Detection and elimination of contaminating microorganisms in transplantable tumors and cell lines. *Exp Anim* 49:309-313.
- Nicklas W, Kraft V, Meyer B. 1993. Contamination of transplantable tumors, cell lines, and monoclonal antibodies with rodent viruses. *Lab Anim Sci* 43:296-300.
- Peterson NC. 2008. From bench to cageside: risk assessment for rodent pathogen contamination of cells and biologics. *Ilar J* 49:310-315.
- Petri M. 1965. A cytolytic parasite in cells of transplantable malignant tumours. *Nature*, 205:302-306.
- Plagemann PG, Swim HE. 1966. Relationship between the lactic dehydrogenase-elevating virus and transplantable murine tumors. *Proc Soc Exp Biol Med* 121:1142-1146.
- Riley V. 1974. Biological contaminants and scientific misinterpretations. *Cancer Res* 34:1752-1754.
- Rülicke T, Hassam S, Autenried P, Briner J. 1991. The elimination of mouse hepatitis virus by temporary transplantation of human tumors from infected athymic nude mice into athymic nude rats (rnuN/rnuN). *J Exp Anim Sci* 34:127-131.
- Simpson W, Simmons DJ, Davies AJ. 1980. Effect of *Pasteurella pneumotropica* on the growth of transplanted Walker sarcoma cells. *Br J Cancer*, 42, 473-476.
- Takakura A, Ohnishi Y, Itoh T, Yoshimura M, Urano K, Ueyama Y. 2000. Decontamination of human xenotransplantable tumor with mouse hepatitis virus by implantation in nude rat: A case report. *Exp Anim* 49, 39-41.
- Yagami K, Goto Y, Ishida J, Ueno Y, Kajiwara N, Sugiyama F. 1995. Polymerase chain-reaction for detection of rodent parvoviral contamination in cell-lines and transplantable tumors. *Lab Ani Sci* 45:326-328.

Yamanishi K, Dantas JR, Takahashi M, Yamanouchi T, Domae K, Kawamata J, Kurata T. 1983. Isolation of hemorrhagic-fever with renal syndrome (HFRS) virus from a tumor specimen in a rat. *Biken J* 26:155-160.

Haftungsausschluss

Die Nutzung und Verwendung der Veröffentlichungen (Fachinformationen, Stellungnahmen, Hefte, Empfehlungen, u. ä.) der Gesellschaft für Versuchstierkunde GV-SOLAS und die Umsetzung der darin enthaltenen Informationen und Inhalte erfolgt ausdrücklich auf eigenes Risiko der jeweiligen Nutzer*innen oder Verwender*innen.

Die GV-SOLAS und auch die Autor*innen können für etwaige Unfälle und Schäden jeder Art, die sich durch die Nutzung der Veröffentlichung ergeben, keine Haftung übernehmen.

Die GV-SOLAS übernimmt keine Haftung für Schäden jeglicher Art, die durch die Nutzung der Webseite und das Herunterladen der Vorlagen entstehen. Ebenfalls haftet die GV-SOLAS nicht für unmittelbare oder mittelbare Folgeschäden, Datenverlust, entgangenen Gewinn, System- oder Produktionsausfälle.

Haftungsansprüche gegen die GV-SOLAS und die Autor*innen für Schäden materieller oder ideeller Art, die durch die Nutzung oder Nichtnutzung der Informationen bzw. durch die Nutzung fehlerhafter und/oder unvollständiger Informationen verursacht wurden, sind grundsätzlich ausgeschlossen.

Schadenersatzansprüche sind daher sowohl gegen die Gesellschaft für Versuchstierkunde GV-SOLAS wie auch gegen die Autor*innen ausgeschlossen.

Die Werke inklusive aller Inhalte wurden unter größter wissenschaftlicher Sorgfalt erarbeitet. Gleichwohl übernehmen die GV-SOLAS und die Autor*innen keinerlei Gewähr und keine Haftung für die Aktualität, Korrektheit, Vollständigkeit und Qualität der bereitgestellten Informationen, ebenso nicht für Druckfehler.

Es kann keine juristische Verantwortung sowie Haftung in irgendeiner Form für fehlerhafte Angaben und daraus entstandene Folgen von der GV-SOLAS und den Autor*innen übernommen werden.

Für die Inhalte von den in diesen Veröffentlichungen abgedruckten Internetseiten sind überdies ausschließlich die Betreiber der jeweiligen Internetseiten verantwortlich.

Die GV-SOLAS und die Autor*innen haben keinen Einfluss auf Gestaltung und Inhalte fremder Internetseiten und distanzieren sich daher von allen fremden Inhalten.