

# **Fachinformation**

**aus dem Ausschuss für Hygiene**

## **Infektionsrisiko bei biologischen Materialien**

**Stand: Juni 2015**

**Autor: Werner Nicklas, DKFZ Heidelberg**

## Haftungsausschluss

Die Benutzung der Hefte (Veröffentlichungen) und Stellungnahmen der GV SOLAS und die Umsetzung der darin enthaltenen Informationen erfolgt ausdrücklich auf eigenes Risiko. Die GV-SOLAS und auch die Autoren können für etwaige Unfälle und Schäden jeder Art, die sich durch die Nutzung der Veröffentlichung ergeben (z.B. aufgrund fehlender Sicherheitshinweise), aus keinem Rechtsgrund eine Haftung übernehmen. Haftungsansprüche gegen die GV SOLAS und die en 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. Rechts- und Schadenersatzansprüche sind daher ausgeschlossen. Das Werk inklusive aller Inhalte wurde unter größter Sorgfalt erarbeitet. Die GV SOLAS und die Autoren übernehmen jedoch keine Gewähr für die Aktualität, Korrektheit, Vollständigkeit und Qualität der bereitgestellten Informationen. Druckfehler und Falschinformationen können nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die GV SOLAS und die Autoren übernehmen keine Haftung für die Aktualität, Richtigkeit und Vollständigkeit der Inhalte des Buches, ebenso nicht für Druckfehler. Es kann keine juristische Verantwortung sowie Haftung in irgendeiner Form für fehlerhafte Angaben und daraus entstandenen Folgen von der GV SOLAS und den Autoren übernommen werden. Für die Inhalte von den in diesen Veröffentlichungen abgedruckten Internetseiten sind ausschließlich die Betreiber der jeweiligen Internetseiten verantwortlich. Die GV SOLAS und die Autoren haben keinen Einfluss auf Gestaltung und Inhalte fremder Internetseiten. Die GV SOLAS und die Autoren distanzieren sich daher von allen fremden Inhalten. V.i.S.d.P. der Vorstand der GV SOLAS

---

## 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 biologisches 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 Ektromelie (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 and 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%) transplantierbarer Tumoren vorkommen kann (Collins and 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 and 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 and 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 erheblichen 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, potentiell 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 and Parker, 1972, Nicklas et al., 1993, Lewis and 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 and Smith, 1989) und molekulare Methoden (insbesondere PCR) (Bauer et al., 2004, Blank et al., 2004, Bootz and Sieber, 2002, Bootz et al., 2003, Morse, 1990, Yagami et al., 1995, Bootz and 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 Erregern 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, B. A., BESCH-WILLIFORD, C. L. & RILEY, L. K. 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, P. N., JACOBY, R. O. & BARTHOLD, S. W. 1986. Contamination of transplantable murine tumors with lymphocytic choriomeningitis virus. *Lab Anim Sci*, 36, 136-9.
- BIGGAR, R. J., SCHMIDT, T. J. & WOODALL, J. P. 1977. Lymphocytic choriomeningitis in laboratory personnel exposed to hamsters inadvertently infected with LCM virus. *J Am Vet Med Assoc*, 171, 829-32.
- BLANK, W. A., HENDERSON, K. S. & WHITE, L. A. 2004. Virus PCR assay panels: An alternative to the mouse antibody production test. *Lab Animal*, 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, F. R. 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, 341-51.
- BOOTZ, F. O. & WOLF, F. R. 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*, 2014, 532105.
- BOWEN, G. S., CALISHER, C. H., WINKLER, W. G., KRAUS, A. L., FOWLER, E. H., GARMAN, R. H., FRASER, D. W. & HINMAN, A. R. 1975. Laboratory studies of a lymphocytic choriomeningitis virus outbreak in man and laboratory animals. *Am J Epidemiol*, 102, 233-40.
- CARTHEW, P. 1986. Is Rodent Virus Contamination of Monoclonal-Antibody Preparations for Use in Human Therapy a Hazard. *Journal of General Virology*, 67, 963-974.
- COLLINS, M. & PARKER, J. 1972. Murine virus contaminants of leukemia viruses and transplantable tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, 49, 1139.
- CRILEY, J. M., CARTY, A. J., BESCH-WILLIFORD, C. L. & FRANKLIN, C. L. 2001. Coxiella burnetii infection in C.B-17 scid-bg mice xenotransplanted with fetal bovine tissue. *Comparative Medicine*, 51, 357-360.
- DAGNAES-HANSEN, F. & HORSMAN, M. R. 2005. Experience with mouse hepatitis virus sanitation in three transplantable murine tumour lines. *Lab Anim*, 39, 394-9.
- DESOUZA, M. & SMITH, A. L. 1989. Comparison of Isolation in Cell-Culture with Conventional and Modified Mouse Antibody-Production Tests for Detection of Murine Viruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 27, 185-187.
- DICK, E. J., JR., KITTELL, C. L., MEYER, H., FARRAR, P. L., ROPP, S. L., ESPOSITO, J. J., BULLER, R. M., NEUBAUER, H., KANG, Y. H. & MCKEE, A. E. 1996. Mousepox outbreak in a laboratory mouse colony. *Lab Anim Sci*, 46, 602-11.
- DYKEWICZ, C. A., DATO, V. M., FISHER-HOCH, S. P., HOWARTH, M. V., PEREZ-ORONNOZ, G. I., OSTROFF, S. M., GARY, H., JR., SCHONBERGER, L. B. & MCCORMICK, J. B. 1992. Lymphocytic choriomeningitis outbreak associated with nude mice in a research institute. *JAMA*, 267, 1349-53.
- GOTO, K., ISHIHARA, K. I., KUZUOKA, A., OHNISHI, Y. & ITOH, T. 2001. Contamination of transplantable human tumor-bearing lines by Helicobacter hepaticus and its elimination. *J Clin Microbiol*, 39, 3703-4.
- GUETTA, E., GRAZIANI, Y. & TAL, J. 1986. Suppression of Ehrlich Ascites Tumors in Mice by Minute Virus of Mice. *Journal of the National Cancer Institute*, 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., TAKAHASKI, M., YAMANISHI, K., KURATA, T. & LEE, H. W. 1987. Control of laboratory acquired hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) in Japan. *Lab Anim Sci*, 37, 431-6.
- LABELLE, P., HAHN, N. E., FRASER, J. K., KENDALL, L. V., ZIMAN, M., JAMES, E., SHASTRI, N. & GRIFFEY, S. M. 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, 180-6.
- LEWIS, V. J. & CLAYTON, D. M. 1971. Evaluation of Mouse Antibody Production Test for Detecting 3 Murine Viruses. *Laboratory Animal Science*, 21, 203-&.
- LIPMAN, N. S., 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, 255-6.
- LIPMAN, N. S., PERKINS, S., NGUYEN, H., PFEFFER, M. & MEYER, H. 2000b. Mousepox resulting from use of ectromelia virus-contaminated, imported mouse serum. *Comp Med*, 50, 426-35.
- LIU, H., BOCKHORN, J., DALTON, R., CHANG, Y. F., QIAN, D., ZITZOW, L. A., CLARKE, M. F. & GREENE, G. L. 2011. Removal of lactate dehydrogenase-elevating virus from human-in-mouse breast tumor xenografts by cell-sorting. *J Virol Methods*, 173, 266-70.
- MARKOULLIS, K., BULIAN, D., HOLZLWIMMER, G., QUINTANILLA-MARTINEZ, L., HEILIGER, K. J., ZITZELSBERGER, H., SCHERB, H., MYSLIWIETZ, J., UPHOFF, C. C., DREXLER, H. G., ADLER, T., BUSCH, D. H., 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, 580-8.
- MORSE, S. S. 1990. Comparative Sensitivity of Infectivity Assay and Mouse Antibody-Production (Map) Test for Detection of Mouse Thymic Virus (Mtlv). *Journal of Virological 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, 309-13.
- 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, N. C. 2008. From Bench to Cageside: Risk Assessment for Rodent Pathogen Contamination of Cells and Biologics. *Ilar Journal*, 49, 310-315.
- PETRI, M. 1965. A Cytolytic Parasite in Cells of Transplantable Malignant Tumours. *Nature*, 205, 302-&.
- PLAGEMANN, P. G. & SWIM, H. E. 1966. Relationship between the lactic dehydrogenase-elevating virus and transplantable murine tumors. *Proc Soc Exp Biol Med*, 121, 1142-6.
- RILEY, V. 1974. Biological Contaminants and Scientific Misinterpretations. *Cancer Research*, 34, 1752-1754.
- RÜLICHE, 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, 127-31.
- SIMPSON, W., SIMMONS, D. J. & DAVIES, A. J. 1980. Effect of Pasteurella pneumotropica on the growth of transplanted Walker sarcoma cells. *Br J Cancer*, 42, 473-76.
- 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. *Experimental Animals*, 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. *Laboratory Animal Science*, 45, 326-328.

YAMANISHI, K., DANTAS, J. R., TAKAHASHI, M., YAMANOUCI, 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 Journal*, 26, 155-160.