

Labor Dr. Merk und Kollegen (LMK) - Viren unter Kontrolle

Ohne Zellkulturtechnik wäre das Ochsenhausener Labor Dr. Merk und Kollegen (LMK) kaum vorstellbar. Der Mittelständler hat sich neben der Prüfung auf Mikroben- und Virenbefall auch auf die Produktion von Viren zu Prüfwzwecken spezialisiert. Mehr als 20 verschiedene Viren, behüllte und unbehüllte, tier- und humanpathogene Stämme halten die Oberschwaben bei minus 80 Grad Celsius vor.

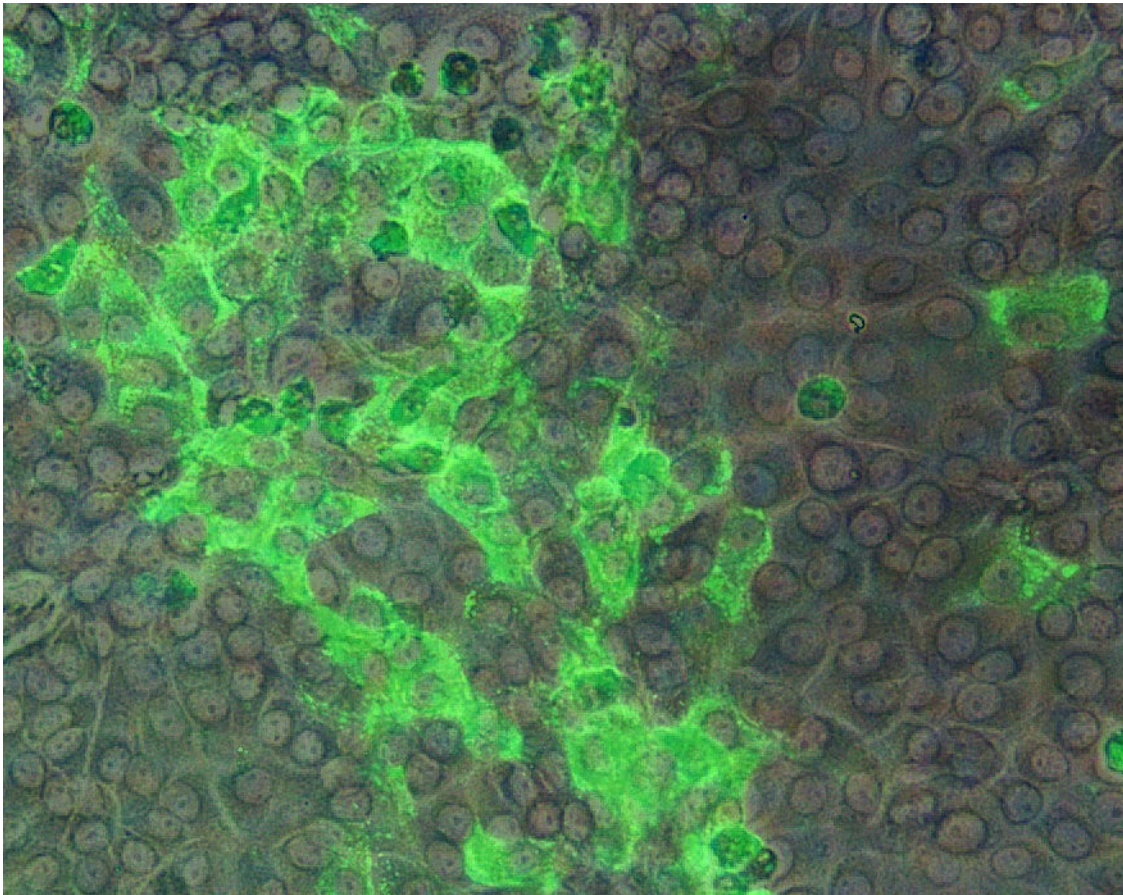
Wer pharmazeutische Herstellungsprozesse oder Medizinprodukte auf virale Kontamination prüft oder inaktive Erreger für Impfstoffe produziert, ist auf Zellkultur angewiesen. Das weiß niemand besser als die promovierte Virologin Ingrid Rapp. „Virale Erreger“, so die LMK-Geschäftsführerin, „können nur in Zellkultur produziert werden“. Als Parasiten ohne eigenen Stoffwechsel sind die 20 bis 100 Nanometer großen Winzlinge auf Wirtszellen angewiesen.



Dr. Ingrid Rapp, Spezialistin für Viren.
© LMK

Zwar lassen sich virale Erreger auch ohne Zellen nachweisen, beispielsweise über das molekularbiologische Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Ob es sich um einen lebenden, infektiösen Erreger oder einen toten handelt, von dem nur noch Nukleinsäurebruchstücke vorhanden sind, erkennt diese Methode allerdings nicht. Sobald man am infektiösen Material interessiert ist, sei es in Produktion, Nachweis oder Prüfung, gehe nichts ohne Zellkultur, sagt Ingrid Rapp.

Das Labor hat deshalb immer ein kombiniertes Viruszellsystem vorrätig, das für mehrere Viren empfänglich ist. Für spezielle Viren sind auch spezielle Zellsysteme erforderlich, die LMK auf Kundenwunsch neu produziert.



Zellkultur, die mit Tollwutviren infiziert ist. Die Aufnahme besteht aus zwei aufeinandergelegten Aufnahmen, einer lichtmikroskopischen und einer fluoreszierenden.
© LMK

Zum LMK-Portfolio gehört beispielsweise die Prüfung auf inaktivierende respektive virusabtötende Wirkung von Desinfektionsmitteln. Dazu wird die Desinfektionslösung mit Prüfviren inkubiert und in Zellkultur gegeben. Die möglicherweise verbliebenen Viren werden dabei vermehrt. Auf diese Weise lässt sich überprüfen, welche der Viren das Desinfektionsbad „überlebt“ haben. Aus der Differenz vorher/nachher wird klar, wie viele Logstufen an infektiösen Viren sich mit dem Mittel abtöten lassen. Mit Logstufen beschreibt man die Veränderung der Viruslast in Zehnerlogarithmen. Bei der Prüfung eines Desinfektionsmittels kommen genau vorgeschriebene Modellviren zum Einsatz. Sie decken das biochemische Spektrum möglichst vieler Erreger ab; also behüllte wie unbehüllte, stark resistente und weniger resistente; Viren mit DNA und solche mit RNA als Nukleinsäure, erklärt Ingrid Rapp. Befindet sich das Mittel in der Entwicklung, werden Dutzende von Substanzen geprüft.

Auch tierisches Material wird auf virale Kontaminationen überprüft. Das ist vor allem im pharmazeutischen Bereich von großer Bedeutung, denn dort muss tierisches Material vor jedem Einsatz in der Produktion auf Kontaminationen untersucht werden, beispielsweise wenn Antikörper aus bovinem Plasma hergestellt werden. „Der Hersteller eines solchen Produktes“, erklärt Geschäftsführer Werner Dangel, „muss in seinem Herstellungsprozess in der Lage sein, Viren abzureichern, sprich zu töten oder durch Filtration zu eliminieren.“ Die Viren werden dem tierischen Ausgangsmaterial zugesetzt, dann wird der im Prozess implementierte Reinigungsschritt vollzogen und in der Zellkultur wird anschließend überprüft, was an Viren abgereichert wurde. Das kann beispielsweise die Nanofiltration betreffen, bei der kontrolliert wird, ob das extrem kleine Parvovirus „durchrutscht“. Die vom Hersteller gelieferte Lösung wird mit einer hohen Viruskonzentration mit extra gezüchteten Parvoviren versetzt und durch den Nanofilter filtriert. Das Filtrat wird anschließend in Zellkultur auf Viren kontrolliert. So wird jeder einzelne Schritt eines Herstellungsprozesses nachvollzogen und die Reduktion an Viren kann aufsummiert werden.

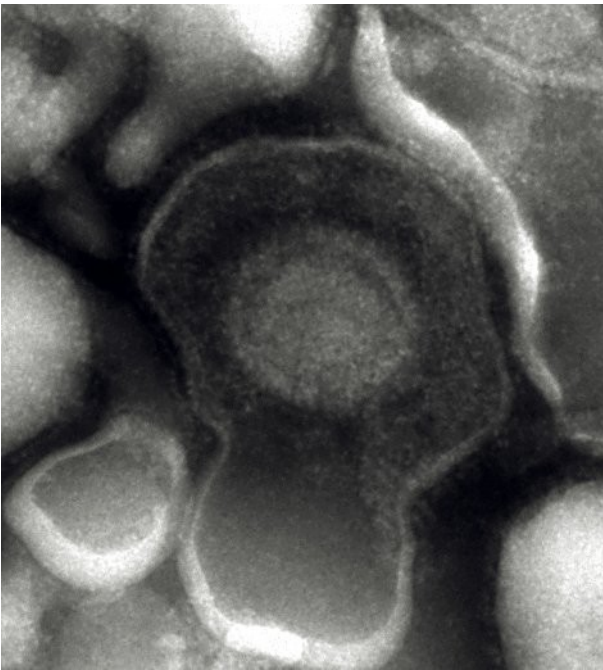
Ein Hersteller von Biopharmaka kann aber schon früher den Weg nach Ochsenhausen suchen, wenn er ein Problem mit seiner Zellkultur hat, diese beispielsweise keinen Wirkstoff mehr produziert oder zugrunde geht. Dann beginnt die Detektivarbeit, die Hersteller gerne extern bei Spezialisten wie LMK erledigen lassen. Dann schlägt die Stunde der Zell- und Virenspezialisten. Für 70 Prozent solcher Fälle halten die Oberschwaben Prüfmöglichkeiten vor.

26 Zellsysteme: Von Affenzellen bis Mausschwanzzellen

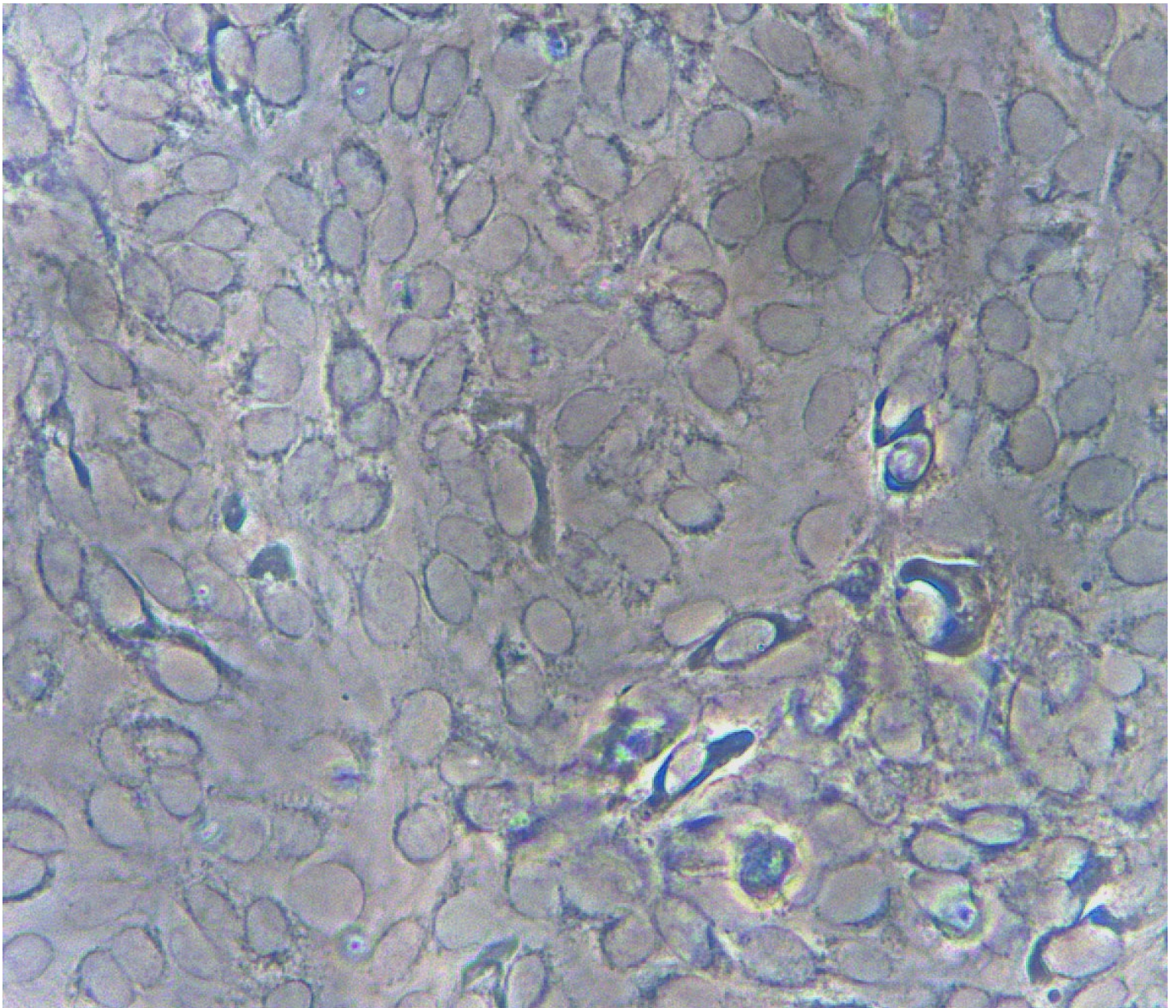
Allein für diese vielstufige biopharmazeutische Sicherheitsprüfung auf Viren (Mikroben prüft das Labor natürlich auch) sind viele Virusstämme nötig. Dazu zählen humanpathogene (Hepatitis-A-Virus, Influenza A und B oder Rotavirus) sowie tierpathogene Erreger wie SV49, bovines Parvovirus oder Vaccinia Virus; letztere werden teilweise als Testviren für humane Viren eingesetzt. Die rund zwei Dutzend Prüfviren werden in speziesspezifischen Zellsystemen vermehrt. Momentan verfügt das Ochsenhausener Unternehmen über 26 Zell-Systeme von elf Arten. Bis auf eine Zelllinie (SF9) von Insekten (Eizellen eines Nachtfalters) handelt es sich um Säugerzellen. Es sind darunter menschliche Zellen wie Lungenfibroblasten oder vom Lungenkarzinom, Nierenzellen vom Schwein (PK 13) genauso wie Zellen aus Affen (CV-1) oder Mausschwanz-Zellen (MA 23).

Beim Kauf eines Virus (vorausgesetzt ist natürlich eine Erlaubnis) erhält man zwar Empfehlungen, in welchem Zellsystem dieses kultiviert werden könnte, tatsächlich aber hilft am besten reichlich Erfahrung, so wie sie Ingrid Rapp in 30 Jahren Arbeit mit Viren erlangt hat. Und die kann man durch Lernen, Austausch mit Kollegen erwerben, in Lehrbüchern sucht man vergebens.

Es gibt einfache Viren, die man zusammen mit den Zellen kauft, gut wachsen, hohe Titer bringen, sich gut einfrieren und problemlos auftauen lassen. „Die schwierigen müssen Sie pöppeln“, weiß Ingrid Rapp. Sie wachsen schlecht an und vermehren sich langsam im Indikatorsystem, wie Virologen die Zellkultur auch nennen. Jedes Virus hinterlässt an der Zelle unter dem Lichtmikroskop andere Spuren. Die einen wie das Poliovirus (das man in Affenzellen kultiviert) zerstören binnen Stunden den gesamten Zellrasen, andere Viren wie Herpesviren durchlöchern den Zellrasen und blasen die Zellwirte nach einigen Tagen förmlich auf. All diese morphologischen viruspezifischen Veränderungen muss man beobachten können.



Das Varizella-Virus, das bei Erstinfektion Windpocken und bei Zweiterkrankung Gürtelrose auslöst. Gut erkennbar das runde Viruscapsid, das von einer geschwungenen Hülle umgeben ist.
© LMK



Reoviren, die sich in Verzellen, den Nierenzellen von grünen Meerkatzen, eingekapselt haben.
© LMK

Bezieht LMK ein Referenzvirus, wird dieses in Zellkultur vermehrt, erst die dritte Subkultur wird für den Gebrauch genommen, die erste dient als Back-up, aus der zweiten (ebenfalls konservierten) Passage bedient man sich, wenn die dritte Gebrauchskultur zur Neige gegangen ist. Anders als Zellen, die bei Stickstoff in Gasphase (zum Ausschluss von Kontamination) bei minus 196 Grad Celsius konserviert werden, können Viren bei minus 80 Grad Celsius aufbewahrt werden. Im Laufe der vielen Projekte hat Ingrid Rapp viel Wissen angesammelt und das Zellkultursystem stetig erweitert. So weiß sie, dass das Herpesvirus VZV, das in humanen Lungenfibroblastenzellen kultiviert wird, in der Zelle gebunden ist und nicht von dieser ausgeschieden wird. Das bedeutet für die Vermehrung, dass Folgekulturen mit Zellen beimpft werden müssen, im Gegensatz zu Polioviren, die sich allein mit dem Überstand übertragen lassen.

Die von Viren verursachten morphologischen Zellveränderungen sind unterschiedlich schnell erkennbar. Um sicher zu gehen, setzt Rapp fluoreszierende Antikörper ein. Ob ein Ergebnis eindeutig positiv oder negativ ist, lässt sich meist problemlos erkennen. "Bei schwächeren Lösungen fällt die Beurteilung schwer; dieser Grenzbereich erfordert genaue Einarbeitung und Absprachen mit dem technischen Personal", erläutert Rapp.

Wie reagieren Zellen auf Implantate?

LMK setzt die Zellkulturtechnik auch ein, um Medizinprodukte auf ihre Toxizität hin zu prüfen. Im Falle eines Implantats können so erste Hinweise auf die Verträglichkeit im Körper gewonnen werden. Dazu wird das Implantat in eine bestimmte Flüssigkeit gegeben, wobei sich Stoffe, die das Implantat möglicherweise abgibt, anreichern. Das gewonnene Extrakt wird mit Zellen kultiviert, die auch im Körper mit dem Implantat in Kontakt stehen. Mit Hilfe verschiedener Tests kann nun beobachtet werden, ob und wie die Stoffe die Zellen im Vergleich zu unbehandelten beeinflussen. Wichtige Messgrößen sind dabei die Stoffwechselaktivität und Vermehrungsrate der Zellen. Die Zellkulturtests, die nach europäischen und internationalen Standards durchgeführt werden, stellen eine geeignete Alternative zu Tierversuchen dar.

Nicht auf die Zellkultur verzichten kann man auch bei der Gehaltsbestimmung von Impfstoffen im Rahmen der Qualitätskontrolle. Und in der In-vitro-Diagnostik kommt die Zellkultur ebenfalls zum Einsatz. LMK liefert Systeme für den Laborarzt, die beispielsweise Antikörper im Blut nachweisen. Allerdings, so Rapps Erfahrung, gerät die Zellkultur bei Laborärzten immer mehr in den Hintergrund, weil sie aufwändig, zeit- und erfahrungsintensiv ist. Oft wird sie durch molekularbiologische oder immunologische Methoden ersetzt.

LMK produziert auch Viren wie das sehr schwierig zu vermehrende Rotavirus im Maßstab bis zu 60 Litern und ist damit nach Unternehmensangaben europaweit führend. Diese Expertise hat sich sogar bei Mitbewerbern herumgesprochen. So mancher In-vitro-Diagnostikhersteller lässt Entwicklungsprojekte in Ochsenhausen durchführen.

Ergänzende Information:

Das Unternehmen Labor Dr. Merk & Kollegen GmbH erhielt im April 2013 die GLP-Zertifizierung. Damit kann es sein umfangreiches Dienstleistungsspektrum um analytische Prüfungen an biologischen Materialien und biologische und mikrobiologische Sicherheits- und Wirksamkeitsprüfungen an Medizinprodukten und Arzneimitteln nach GLP-Grundsätzen erweitern.