



Beispiel für Reduce (Projekt 105-06 Ruggli – Summerfield)

---

**Mit Zellen statt Schweinen kann die Virulenz des Erregers der Klassischen Schweinepest abgeschätzt werden.**

**Klassische Schweinepest (KSP) ist eine hochansteckende Krankheit der Schweine. Bricht sie aus, so ist der Schaden gross, weil die betroffenen Schweinebestände vollständig eliminiert werden müssen. Auslöser sind verschiedene Stämme von KSP-Viren. Einige sind äusserst virulent d.h. bösartig, andere lösen kaum Reaktionen aus.**

**Um die Virulenz der Stämme zu bestimmen, mussten bis anhin lebende Schweine mit den Virenproben infiziert werden. Arbeiten am Institut für Viruskrankheiten und Immunprophylaxe (IVI) in Mittelhäusern haben zum Ziel, diese Tierversuche durch ein *in-vitro* System zu ersetzen. Eine Kombination spezialisierter Zellkulturen mit weiteren biologischen Messgrössen verspricht, für die Virulenz-Bestimmung der KSP-Viren geeignet zu sein. Zellen statt Schweine - ein Fortschritt ganz im Sinne der 3R.**

Die Wechselwirkungen zwischen den KSP-Viren und dem Immunsystem der Schweine sind, um es einfach auszudrücken, komplex. Ob ein bestimmter KSP-Virusstamm hochvirulent ist oder nicht, lässt sich bis heute auch nicht an seinem Erbgut ablesen. Es gilt, seine Interaktionen mit Zellen zu untersuchen.

Vorversuche mit Kulturen von Zell-Linien, die routinemässig im Diagnostik-Labor verwendet werden, haben gezeigt, dass die Zellen oft bevorzugt mutierte Viren vermehren, die sich an die Verhältnisse in den Kulturen gut anpassen. Nicht entsprechend mutierte Viren kommen dabei zu kurz, was die Resultate verfälscht. Also galt es erst einmal, Zellen aus Schweinen zu finden, die unverfälscht die einzelnen Stämme vermehren lassen. Es gelang, solche Zellen zu identifizieren, sie mit verschiedenen KSP-Virenstämmen zu infizieren und mit einer Färbung die Folgen unterschiedlicher Virulenz sichtbar zu machen – je grösser die Farbpunkte, umso virulenter der Stamm. Diese Methode liefert einen ersten Hinweis.

Um die Diagnose weiter zu verbessern, muss man zusätzlich wissen, welche Reaktionen die Viren in andern wichtigen Zellen von Schweinen auslösen. Zu diesem Zweck wurden Makrophagen und Interferon produzierende Zellen infiziert, die aus dem Blut von Schweinen stammen. Messungen mit Durchfluss-Zytometrie ergaben, dass virulentere Viren sich in diesen Zellen stärker und schneller vermehren als weniger virulente. Dies kann man messen, indem man Virusproteinmengen und Immunantwort der Zelle misst – hochvirulente Viren führen zu mehr Virusprotein und zu einer stärkeren Antwort der Zelle als weniger virulente. Diese Grössen geben zusätzliche Hinweise darauf, wie virulent ein zu untersuchender Virenstamm ist.

Diese Untersuchungen mit drei verschiedenen Zelltypen ermöglichen es, die Virulenz von KSP-Virenstämmen so gut voraussagen, dass in den meisten Fällen auf die Überprüfung am Schwein verzichtet werden kann. Das System eröffnet in der Grundlagenforschung neue Möglichkeiten, um die Virulenz von KSP-Viren besser zu verstehen – dies alles, ohne ein Schwein zu infizieren.

[http://www.forschung3r.ch/de/projects/pr\\_105\\_06.html](http://www.forschung3r.ch/de/projects/pr_105_06.html)

nicolas.ruggli@ivi.admin.ch

Münsingen, 20. November 2012

\* \* \* \* \*



Beispiel für Reduce, Refine (Projekte 114-08 und 123-10 Rufli)

---

### **Akute Toxizitätsprüfung mit Fischen: Weniger Fische weniger lang belasten.**

**Für die ökotoxikologischen Abklärungen der Auswirkungen einer Substanz auf die Umwelt muss der Fisch-Letalitätstest zur Bestimmung der akuten Toxizität nach OECD-Richtlinie 203 durchgeführt werden.**

**Statistische Analysen des Basler Ökotoxikologen Hans Rufli von tausenden von Datensätzen aus Fischtests ergaben, dass mit sechs statt der sieben vorgeschriebenen Fische qualitativ gleichwertige Ergebnisse resultieren. Überdies könnten auf Grund eines anerkannten Kriteriums „moribund“ statt „tot“ die Fische viel früher aus dem Test genommen werden, was das Leiden der Tiere verkürzen würde. Um diese Vorschläge im Sinne von Reduction und Refinement umzusetzen, müssen sie noch in die weltweit gültigen OECD-Protokolle aufgenommen werden.**

Die Toxizität chemischer Substanzen wird oft mit dem  $LC_{50}$  – Wert angegeben. Er entspricht der Konzentration der zu prüfenden Substanz in Wasser, Boden oder Luft, bei der 50 Prozent der Versuchsorganismen innerhalb eines bestimmten Beobachtungszeitraumes sterben. Beim Fisch-Letalitätstest (engl.: Acute fish toxicity test) müssen mindestens fünf Mal sieben Fische unterschiedlichen Konzentrationen der Prüfsubstanz ausgesetzt werden, um herauszufinden, bei welcher Konzentration 50 Prozent der Tiere innert 96 Stunden sterben. Bereits in den Vorversuchen, in denen der ungefähre Bereich der kritischen Konzentration ermittelt wird, braucht es zudem Tiere. Jährlich werden bei derartigen Versuchen Zehntausende Fische eingesetzt.

Hans Rufli von der Basler Firma ecotoxsolutions und seine Forschungspartner setzten sich zum Ziel, effizientere Testdesigns zu finden, welche bei reduzierter Fischzahl Ergebnisse gleicher Qualität erbringen. Anhand retrospektiver Analysen von mehr als 4000 Datensätzen aus Fischtests wurde der Verlauf typischer Dosis - Wirkungskurven beschrieben. Basierend auf diesen Resultaten wurden danach Simulationen von Tests durchgeführt und die Resultate mit jenen der Tests nach den geltenden Richtlinien verglichen. Es zeigte sich, dass pro Testgruppe à 7 Fischen 1 Fisch eingespart werden kann, ohne dass es bei den Resultaten zu einem Qualitätsverlust kommt. Dies entspricht 14 % der Tiere. Das tönt nach einem kleinen Unterschied, fällt aber bei der hohen Anzahl jährlich durchgeführter Versuche ins Gewicht.

Die im Rahmen des Projektes durchgeführten Expertentreffen ergaben weiter, dass für die Vorversuche, bei denen der kritische Bereich der Konzentration für den akuten Toxizitätstest ermittelt wird, d.h. bei welchem entweder kein Tier oder alle Tiere rasch sterben, ebenso gut Fischembryonen statt ausgewachsene Fische verwendet werden können.

### **„Moribund“ statt „tot“**

Während dem normalerweise 96 Stunden dauernden Test siechen die Fische bei den höchsten Konzentrationen oft dahin und sind dann irgendwann tot. Gäbe es ein anerkanntes Kriterium für „moribunde“, also gesundheitlich schwer angeschlagene Fische, so liesse sich nach

viel kürzerer Versuchsdauer der 50 Prozent Grenzwert ermitteln. Das Leiden der Tiere liesse sich um bis zu 92 Stunden verkürzen.

Aber was ist „moribund“? Rufli hat mögliche Beobachtungs-Kriterien zusammengestellt, wie gestörtes Schwimmverhalten, Gleichgewichtsverlust, starkes Ventilieren, hervorquellende Augen.

Auch für diese tierschonende Weiterentwicklung der Testmethode ist vorerst eine internationale Einigung auf das Kriterium „moribund“ erforderlich und dann seine Integration in die OECD Richtlinie 203. Angestrebtes Endziel ist es, einen Antrag aus einem OECD-Land (z.B. Schweiz) zu initiieren, um eine entsprechende Abänderung der weltweit gültigen OECD-Richtlinien zu erwirken.

[http://www.forschung3r.ch/de/projects/pr\\_114\\_08.html](http://www.forschung3r.ch/de/projects/pr_114_08.html)

[http://www.forschung3r.ch/de/projects/pr\\_123\\_10.html](http://www.forschung3r.ch/de/projects/pr_123_10.html)

rufli@ecotoxsolutions.ch

Münsingen, 20. November 2012

\* \* \* \* \*



Beispiel für Refine, Reduce (Projekt 82-02 Beckmann)

---

## Ratten im Kernspintomographen beobachten

**Seit einigen Jahrzehnten wird die Kernspintomographie (MRI) als diagnostisches Verfahren in der Medizin eingesetzt, z.B. auf der Suche nach Tumoren. Wie Nicolau Beckmann und seine Mitarbeitenden an den Novartis Institutes for BioMedical Research in Basel zeigen konnten, ist diese Methode auch bei Kleintieren in der Forschung zweckmässig, um Organe wiederholt und ohne Eingriffe zu beobachten. Die Resultate sind aussagekräftiger als bei älteren Versuchsmethoden, bei denen in jeder Versuchsphase Tiere getötet werden mussten. Dadurch werden bis zu 90% weniger Tiere in den Versuchen eingesetzt – ein Fortschritt ganz im Sinne der 3R.**

Während ungefähr 10 Minuten liegt eine Ratte in der Röhre eines Kernspintomographen (engl. Magnetic Resonance Imaging MRI). Ihr Herz schlägt normal und sie atmet, aber sie bewegt sich nicht, weil ein Narkosegas sie vorübergehend ruhig stellt. So kann das MRI die Wechselwirkung zwischen Wasserstoffkernen im Körper der Ratte und dem starken Magnetfeld sowie den hochfrequenten Radiowellen präzise erfassen. Aus diesen Signalen errechnet das MRI-Gerät Bilder, die ohne Eingriff Einsicht ins Innere des Tieres ermöglichen. Zehn Minuten nach Versuchsende hat sich die Ratte von der Narkose wieder erholt.

Die Tiere in dieser Versuchsanordnung haben eine künstlich erzeugte Lungenentzündung. Sie sind damit ein „Modell“ für Atemwegserkrankungen. Als Folge der Entzündung hat sich im Lungengewebe Flüssigkeit angesammelt, die auf dem MRI-Bild als Signal erkennbar ist. Einige Tiere bleiben unbehandelt. Bei ihnen beginnt die Entzündung im Verlaufe einiger Tage natürlich abzuheilen – die Signale im MRI-Bild werden dann allmählich kleiner. Andere Tiere erhalten nach Ausbruch der Entzündung eine einmalige Dosis eines Wirkstoffes, von dem man wissen möchte, ob er entzündungshemmend wirkt. Bei einem der von Nicolau Beckmann eingesetzten Wirkstoffe setzt die Wirkung rasch und offensichtlich ein – das Signal verliert innert Stunden deutlich an Grösse. Das macht den Wirkstoff möglicherweise auch für die Behandlung von Lungenentzündungen beim Menschen interessant.

Mit der früher üblichen Lungenspülung am toten Tier konnten nie so differenzierte Resultate erhoben werden. Insbesondere war es nicht möglich, die Prozesse zeitlich so fein aufgelöst an ein und demselben Tier zu beobachten.

Die auf den MRI-Bildern erkennbaren Veränderungen geben zwar lediglich pauschale Hinweise über das Geschehen im Lungenmodell; sie sagen nichts aus über beispielsweise die biochemischen und zellbiologischen Vorgänge, die zu den sichtbaren Veränderungen führen. Trotzdem liefert das Bildgebungsverfahren einen statistisch gesicherten Hinweis darauf, dass eine bestimmte Substanz eine gewünschte Wirkung hat. Die Information wird mit Versuchen erreicht, die einen Bruchteil der bisher benötigten Tiere erfordern und das einzelne Tier nur einer geringen Belastung aussetzen – das ist ein bemerkenswerter Fortschritt im Sinne von 3R.

[http://www.forschung3r.ch/de/projects/pr\\_82\\_02.html](http://www.forschung3r.ch/de/projects/pr_82_02.html)

nicolau.beckmann@novartis.com

Münsingen, 20. November 2012

\* \* \* \* \*