

Kultivierung einer permanenten Fischzelllinie in serumfreien Medien: Spezielle Erfahrungen mit einem Zytotoxizitätstest für Abwasserproben

Martin Kohlpoth und Brigitte Rusche
Akademie für Tierschutz, D-Neubiberg

Zusammenfassung

In den vergangenen Jahren wurde ein *in vitro* Zytotoxizitätstest für die Prüfung von industriellen Abwässern mit der permanenten Fischzelllinie RTG-2 etabliert und in ersten Ringversuchen als mögliche Ersatzmethode für den Fischtest mit Goldorfen prävalidiert. Der Zusatz des fötalen Kälberserums (FKS) in das Kultivierungsmedium der RTG-2 Zellen ist sowohl aus Sicht des Tierschutzes als auch aus wissenschaftlichen Gründen kritisch zu hinterfragen. Unter anderem wird durch den Einsatz von FKS die Standardisierung der Versuchsbedingungen beeinträchtigt, da verschiedene Serumchargen in ihrer Zusammensetzung erheblich voneinander abweichen können. Bei der Prüfung von Abwasserproben können darüber hinaus Wechselwirkungen mit den unbekannten Probeninhaltsstoffen entstehen, die kaum abschätzbar sind und Ergebnisse des Toxizitätstests verfälschen können. Um zu überprüfen, ob der FKS-Bestandteil im Medium ersetzt werden kann, ohne das Verhalten der Zelllinie signifikant zu verändern, wurden die RTG-2 Zellen an die Ersatzlösungen Basal Medium Supplement (BMS) und Ultroser-G (U-G) adaptiert und anschließend charakterisiert. Die Prüfung einzelner Chemikalien ergab keine signifikanten Unterschiede in den Zellcharakteristika Wachstum, Anheftung, Vitalität und Sensibilität. Bei der Prüfung von Abwasserproben reagierten die RTG-2 Zellen, die in 10% BMS kultiviert wurden, allerdings deutlich sensibler. Das bestätigt die Vermutung, daß das Serum mit Inhaltsstoffen der Abwasserproben wechselwirken und so die Ergebnisse verändern kann.

Summary: Cultivation of a permanent fish cell line in serum-free media: special experiences with a cytotoxicity test for waste water samples.

*The use of fetal calf serum (FCS) as standard medium additive for the cell cultivation must be regarded critically from the point of view of animal welfare as well as for scientific reasons and makes it necessary to look for alternatives. In the last years an *in vitro* cytotoxicity assay for the testing of industrial waste waters with the permanent fish cell line RTG-2 was established and prevalidated as an alternative to the fish test with the golden orfe.*

The application of FCS is also a special problem with regard to the testing of waste waters in a cytotoxicity test so that FCS-alternatives were tested.

The RTG-2 cells were successfully adapted to the two solvents Basal Medium Supplement (BMS) and Ultroser-G (U-G) that are used to replace serum. The characterisation of these adapted cell lines showed no significant differences in growth rate, adhesion rate, viability and sensitivity to chemicals in comparison to the original RTG-2 cells. On the determination of the cytotoxicity of industrial waste waters the RTG-2 cells adapted to the BMS medium indicated a clearly higher toxicity of the waste water samples than the original RTG-2 cells. This result confirms the thesis that serum components react with waste water elements and thus change the bioavailability of toxic compounds.

Keywords: in vitro-cytotoxicity, RTG-2 fish cell line, FCS replacement, waste water samples, alternative to animal testing

1 Einleitung

In der Bundesrepublik Deutschland ist nach dem Abwasserabgabengesetz zwingend vorgeschrieben, daß zur Festlegung der Abwasserabgabe die Giftigkeit von Abwässern mit Hilfe des Fischtests (DIN 38412 Teil 31) ermittelt werden muß.

Die Bestimmung der Abwasserabgabe mit dem Fischtest kollidiert jedoch mit dem deutschen Tierschutzgesetz (Schmitz und Rusche, 1988), so daß sich die Notwendigkeit ergibt, nach Wegen zu suchen, für die Bestimmung von toxischen Inhaltsstof-

fen in Abwasserproben das *in vivo* System durch ein validiertes *in vitro* System abzulösen. Mit dem Ziel, eine Ersatzmethode für den Fischtest zu evaluieren, wurde im Zellkulturlabor der Akademie für Tierschutz 1989 der von Ahne entwickelte Zytotoxizitätstest mit der R1-Fischzelllinie (Ahne, 1985) etabliert. Mehrjährige Vergleichsuntersuchungen mit Abwasserproben, die vom Bayerischen Landesamt für Wasserwirtschaft, wo routinemäßig der Fischtest durchgeführt wird, zur Verfügung gestellt wurden, zeigten eine hohe Übereinstimmung zwischen den beiden Testsys-

temen (Rusche und Kohlpoth, 1993).

In einem Prävalidierungsprojekt wurde eine standardisierte Testvorschrift zur Prüfung von Chemikalien und von Abwasserproben entwickelt (Schulz et al., 1995). Für den laufenden Ringversuch wurde die Fischzelllinie RTG-2 als Standardzelllinie für den Zytotoxizitätstest bestimmt. Die RTG-2 Zelllinie wurde als erste permanente Zelllinie aus Fischgewebe isoliert (Wolf and Quimby, 1962) und wird seit vielen Jahren für ökotoxikologische Fragestellungen verwendet (Bols et al., 1985).

Die Kultivierung von RTG-Zellen er-

folgte bislang analog zu der von Säugerzellen mit einem Anteil von 10% fötalem Kälberserum (FKS) im Nährmedium (Wolf and Mann, 1980). Der FKS-Zusatz im Medium der RTG-2 Zellen hat sich aus Sicht des Tierschutzes ebenso wie aus wissenschaftlichen Gründen als problematisch erwiesen.

Die Tierschutzrelevanz ergibt sich aus dem Verfahren zur Herstellung des FKS. Die Gewinnung des dazu notwendigen fötalen Kälberblutes erfolgt durch eine Punktion des schlagenden Herzens. Dieser Eingriff findet ohne Betäubung statt, so daß zumindest bei älteren Föten von erheblichen Schmerzempfindungen ausgegangen werden muß. Da der Bedarf an fötalem Kälberblut nicht durch Schlachthofabgänge abgedeckt werden kann, ist zudem damit zu rechnen, daß zu diesem Zweck Aborte künstlich eingeleitet werden.

Einer der Hauptkritikpunkte aus wissenschaftlicher Sicht besteht darin, daß es sich bei FKS um ein nicht genau definiertes Naturprodukt handelt. Zum einen sind dessen Bestandteile nicht vollständig bekannt, zum anderen unterliegen die Konzentrationen der bislang identifizierten Inhaltsstoffe einer erheblichen Schwankungsbreite (Lindl and Bauer, 1994). Eine Zellkultivierung unter definierten und kontrollierten Bedingungen wird dadurch erschwert.

Bei der Prüfung von industriellen Abwasserproben tritt darüber hinaus die besondere Problematik auf, daß nicht nur im Kälberserum, sondern auch in den Abwasserproben unbekannte Substanzen enthalten sind. Dadurch können unerkannte synergistische und antagonistische Wechselwirkungen auftreten, die die Bioverfügbarkeit von Schadstoffen beeinflussen und so die Ergebnisse im Toxizitätstest verfälschen können.

Aus diesen Gründen wurde geprüft, ob der Einsatz von FKS-Ersatzlösungen möglich ist, ohne daß die Charakteristika der RTG-2 Zellen durch die serumfreie Kultivierung beeinträchtigt werden.

Die RTG-2 Zellen wurden dazu an die 2 Serumersatzlösungen Basal Medium Supplement (BMS) von BIOCHROM und Ultraser-G (U-G) von LIFE TECHNOLOGIES adaptiert. Nach der erfolgreichen Adaptation wurden die RTG-2 Zellen charakterisiert.

Zur Ermittlung einer möglichen Sensibilitätsveränderung wurden Zytotoxizitätstests mit 26 abwasserrelevanten Chemikalien aus verschiedenen Gift- und Substanzklassen durchgeführt.

Um zu überprüfen, welchen Einfluß der Ersatz des FKS-Mediums auf den Zytotoxizitätstest mit Abwasserproben hat, wurde eine Testserie mit 44 bekannten Abwasserproben aus verschiedenen Industriesparten durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Zelllinie

Bei den RTG-2 Zellen handelt es sich um fibroblastoide Zellen, die aus den Kulturen von Gonadengewebe juveniler Regenbogenforellen isoliert wurden (Wolf and Quimby, 1962). Die Kultivierung erfolgte in *Minimum Essential Medium* mit Earles' Salzen (MEM/E) unter Zugabe von Natriumbikarbonat (850 mg/l), L-Glutamin (2 mM), Neomycinsulfat (50 mg/l) und 10% FKS. Die Inkubation erfolgte ohne CO₂-Begasung in einem Kühlbrutschrank bei einer Temperatur von 20°C. Die Subkultivierung erfolgte durch enzymatische Dissoziation mit einer Trypsin/EDTA(0,05%/0,02%)-Lösung.

2.2 Adaptation

Für die Adaptation der RTG-2 Zellen an die Serumersatzlösungen wurde der FKS-Anteil des Mediums in Schritten von jeweils 2% gesenkt, gleichzeitig wurde der Anteil der Ersatzlösung um denselben Anteil erhöht. Die Umstellung auf den verringerten FKS-Gehalt erfolgte jeweils durch einen Mediumwechsel 24 Stunden nach jeder 2. Subkultivierung der Zellen.

2.3 Abwasserproben

Die Abwasserproben wurden in nativem Zustand tiefgefroren und bei -20°C gelagert. Vor dem Test wurden die Proben im Wasserbad bei 20°C aufgetaut. Nach mehrmaligem kräftigem Aufschütteln der Probe erfolgte die Resedimentation der Schwebstoffe durch eine 2-stündige Lagerung bei Raumtemperatur. Der Überstand der sedimentierten Probe wurde aus dem Probenfläschchen entnommen, der pH-Wert bestimmt und bei Bedarf mit steriler 1 N HCL-Lösung oder steriler 1 N NaOH-Lösung auf einen Wert von 7,2 eingestellt.

2.4 Chemikalien

Die Chemikalien Anilin, Kupfersulfat und Phenol wurden von MERCK (Darmstadt), und die Chemikalie Triton X-100 von SIGMA (Deisenhofen) bezogen. Die übrigen 22 Chemikalien (siehe Tabelle 2) wurden von ALDRICH (Steinheim) geliefert. Für die Zellkultivierung wurde das Medium-

konzentrat (MEM/E) von LIFE TECHNOLOGIES (Eggenstein), das L-Glutamin von BIOCHROM (Berlin) und die Neomycin-Lösung von SIGMA (Deisenhofen) bezogen.

2.5 Zytotoxizitätstest

Sowohl die Chemikalien als auch die Abwasserproben wurden in einem Zytotoxizitätstest mit dem Vitalfarbstoff Neutralrot, der in den Lysosomen intakter Zellen gespeichert wird, geprüft (Borenfreund and Puerner, 1985).

Die Testdurchführung erfolgte nach dem in einem Prävalidierungsprojekt erarbeiteten Testprotokoll (Schulz et al., 1995).

96-Well-Mikrotiterplatten wurden mit je 0,1 ml pro Well einer Zellsuspension von 3×10^5 Zellen/ml beimpft. Die Wells zur Bestimmung der Blank-Werte wurden nur mit Medium beimpft. Nach einer Anheftungszeit von 4 Stunden wurde der Mediumüberstand dekantiert, und die Verdünnungsreihen der Abwasserproben bzw. der Chemikalien wurden einpipettiert. Die Kontrollreihen wurden nur mit Medium beimpft. Die Inkubation erfolgte für 20 Stunden bei 20°C. Die Bestimmung der überlebenden Zellen erfolgte durch die Extinktionsmessung des Farbstoffs mit einem Spektralphotometer.

Die Toxizität der einzelnen Chemikalien wurde anhand der Dosis-Wirkungskurve durch Extrapolation ermittelt. Als Maß für die Toxizität wird der IC₅₀-Wert (*inhibitory concentration*) angegeben.

Bei den Abwasserproben galt eine photometrisch gemessene Extinktion von unter 50% im Vergleich zum Kontrollwert als toxisch. Als Maß wird hier der GZ-Wert ($G = \text{Verdünnungsfaktor}$, $Z = \text{Zelle}$) angegeben. Der GZ-Wert ist definiert als Reziprokwert derjenigen Verdünnungsstufe, bei der keine toxische Wirkung auf die Zellen mehr auftritt.

Die Verdünnungsstufen der Abwasserprobe wurden mit *aqua bidest.* analog zu der Verdünnungsreihe, die in der DIN-Norm des Fischtests vorgeschrieben ist, angesetzt (Tabelle 1). Der Abwasservorverdünnung mit *aqua bidest.* wurde unmittelbar vor dem Einpipettieren in die Mikrotiterplatte doppelt konzentriertes Medium in gleicher Menge zugesetzt.

2.6 Charakterisierung

2.6.1 Anheftungstest

Um die Fähigkeit der Zellen, sich spontan an den Untergrund anzuheften, festzustellen

GZ*-Werte	2	3	4	6	8	12	16	24	32
Abw.Anteil in % (nach Medienzugabe)	50	33,3	25	16,6	12,5	8,3	6,25	4,17	3,13
Vorverdünnung Abw.+A.bidest.	1+0	2+1	1+1	1+2	1+3	1+5	1+7	1+11	1+15

Tabelle 1: Verwendete Verdünnungsstufen der Abwasserproben

* Der GZ-Wert ist definiert als Reziprokwert derjenigen Verdünnungsstufe, bei der keine toxische Wirkung auf die Zellen mehr auftritt. G = Verdünnungsfaktor, Z = Zelle

len, wurden 50 ml-Zellkulturflaschen mit einer Zellsuspension von 3×10^5 Zellen in 5 ml Medium beimpft. Nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden wurden die nicht angehefteten Zellen durch Dekantierung des Mediums entfernt und die angehefteten Zellen nach enzymatischer Dissoziation in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer ausgezählt.

2.6.2 Vitalitätstest

Während der routinemäßigen Subkultivierung der Zelllinien wurde unmittelbar nach Abstoppen der enzymatischen Dissoziation des Monolayers durch Zugabe des Mediums jeweils 1 ml der Einzelzellsuspension mit 2 ml einer 0,4%igen Erythrosin-B Gebrauchslösung (2 g Erythrosin-B Pulver; 4,05 g NaCl und 0,3 g K_2HPO_4 in 500 ml *aqua bidest.*; vor Gebrauch 1:10 mit PBS verdünnen) gemischt. Das Verhältnis der lebenden (ungefärbt) zu den toten (gefärbt) Zellen wurde in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt.

2.6.3 Wachstumstest in Zellkulturflaschen

Für jede Wachstumskurve wurden 5 x 50 ml-Zellkulturflaschen mit je 3×10^5 Zellen in 5 ml Medium beimpft. Die Inkubation erfolgte bei 20°C. In regelmäßigen Zeitabständen wurde die aktuelle Zellzahl der Kulturflaschen ermittelt. Dazu wurde der Mediumüberstand dekantiert, der Zellrasen durch enzymatische Dissoziation gelöst und die Zellzahl durch Auszählung in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Die Berechnung der Verdopplungszeiten in der exponentiellen Wachstumsphase erfolgte nach der Formel von Lindl (Lindl und Bauer, 1994).

3 Ergebnisse

Die Adaptation der RTG-2 Zellen an das BMS-Medium ergab bei einem Zusatz von 10% Ersatzlösung (Empfehlung des Her-

stellers) eine vergleichbare Wachstumskurve wie bei der Kultivierung in 10% FKS. Bei Ultrosor-G reichte dagegen der empfohlene Wert von 2% Ersatzlösung nicht aus, um ein entsprechendes Wachstum zu erzeugen. Die erforderliche Prüfung verschiedener Konzentrationsstufen ergab ein optimales Wachstum der RTG-2 Zellen bei einem Zusatz von 4% Ultrosor-G Lösung (Abbildung 1).

Die RTG-2 Zellen, die mit den Serum-

ersatzlösungen kultiviert wurden, zeigten ein sehr ähnliches Verhalten im Vergleich zu den in serumhaltigem Medium kultivierten Zellen. Dies wird an den ermittelten Verdopplungszeiten in der exponentiellen Wachstumsphase von 48,2 Stunden für 10% FKS, 46,4 Stunden für 10% BMS und 48,2 Stunden für 4% U-G deutlich (vergleiche Plumb und Wolf, 1971).

Die Anheftungsraten wiesen mit Werten von 84,3% für 10% FKS, 86,7% für 10% BMS und 90,2% für 4% U-G ebenfalls keine signifikanten Unterschiede auf.

Auch die Vitalitätswerte lagen mit Werten von 95,6% für 10% FKS, 96,2% für 10% BMS und 95,1% für 4% U-G alle in einem für permanente Zelllinien zu erwartenden Bereich. Die Zytotoxizitätstests mit Chemikalien ergaben für die Zellen in allen drei Medien vergleichbare IC_{50} -Werte. (Tabelle 2). Bei der Prüfung von industriellen Abwasserproben wurden dagegen mit den RTG-2 Zellen, die an 10% BMS adaptiert wurden, deutlich höhere GZ-Werte

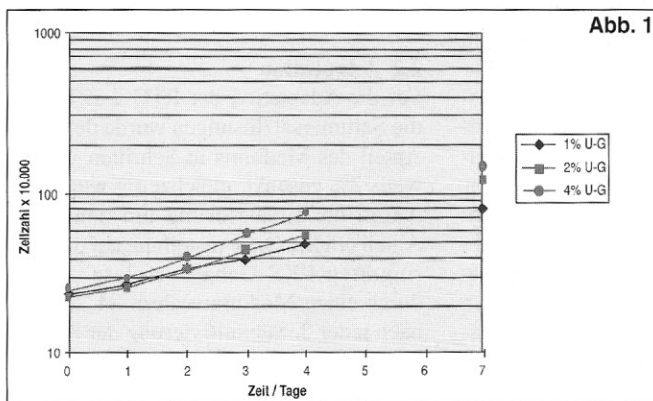


Abb. 1

Abbildung 1: Wachstum der RTG-2 Zellen mit verschiedenen Ultrosor-G (U-G) Konzentrationen im Medium. Der Tag 0 bezeichnet die Anheftung 4 Stunden nach der Einsaat.

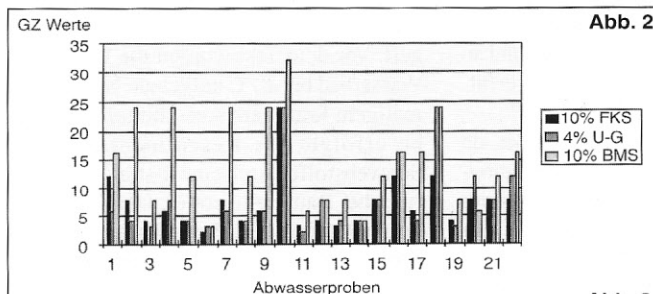


Abb. 2

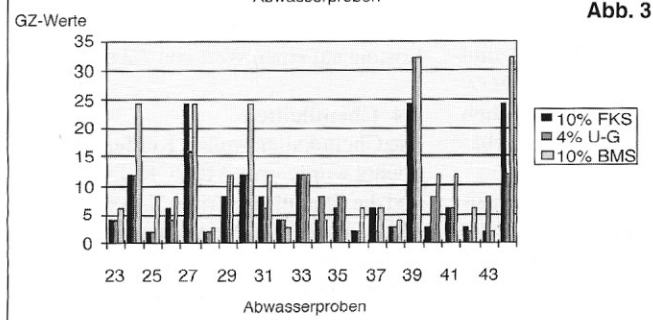


Abb. 3

Abbildungen 2 und 3: Vergleich der GZ-Werte, die mit RTG-2 Zellen mit verschiedenen Medienzusätzen ermittelt wurden. (Der GZ-Wert ist definiert als Reziprokwert derjenigen Verdünnungsstufe, bei der keine toxische Wirkung auf die Zellen mehr auftritt. G = Verdünnungsfaktor, Z = Zelle)

gemessen. (Abbildungen 2 und 3).

Insgesamt wurden 44 zytotoxische Abwasserproben geprüft. In 30 Fällen (68,2%) wurden mit den RTG-2 Zellen, die in 10% BMS kultiviert wurden, die höchsten GZ-Werte ermittelt, davon in 21 Fällen mit einer deutlichen Differenz von ≥ 2 Verdünnungsstufen im Vergleich zu den RTG-2 Zellen, die in 10 % FKS kultiviert wurden.

Nur bei 4 Proben reagierten die RTG-2 Zellen, die an Ultrosor-G adaptiert wurden, am empfindlichsten.

Mit den RTG-2 Zellen, die in 10% FKS kultiviert wurden, wurde bei keiner Abwasserprobe der höchste GZ-Wert gemessen.

4 Diskussion

Primäre und permanente Fischzelllinien werden bereits seit vielen Jahren für Abwasser- und Gewässeruntersuchungen eingesetzt (Isomaa et al., 1994). Für einen möglichen routinemäßigen Einsatz des *in vitro* Zytotoxizitätstests mit RTG-2 Fischzellen als Ersatzmethode für den Fischttest im Abwasserabgabengesetz gewinnt dabei die Problematik der FKS-Chargenvariabilität erheblich an Bedeutung. Die Umstellung auf Ersatzlösungen wäre eine geeignete Methode, durch eine bessere Standardisierung der Kultivierungsbedingungen eine Verbesserung der Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit zu erreichen. Die präsentierten Ergebnisse zeigen, daß eine Adaptation der Fischzelllinie RTG-2 an FKS-Ersatzlösungen ohne relevante Veränderungen der Zellcharakteristika möglich ist. Die Übereinstimmung der IC_{50} -Werte bei den Toxizitätstests mit Chemikalien zeigte zudem, daß auch keine Veränderung der Sensibilität auftrat.

Da die erhöhten GZ-Werte der RTG-2 Zellen mit 10% BMS bei der Abwasserprüfung somit nicht mit einer veränderten Sensibilität der Zellen begründet werden können, ist davon auszugehen, daß durch den Wegfall des FKS die Bioverfügbarkeit von Schadstoffen verbessert werden konnte. Vermutlich bindet die BMS-Lösung deshalb weniger toxische Inhaltsstoffe des Abwassers, da deren Proteingehalt im Vergleich zu FKS bei unter 30% liegt und daher auch ein geringerer Gehalt an Bindungs- und Transportproteinen anzunehmen ist.

Allerdings muß darauf hingewiesen werden, daß die Rezepturen der verschiedenen FKS-Ersatzlösungen von den Her-

stellern nicht öffentlich gemacht werden und zudem auch geringe Anteile an undefinierten Biomaterialien enthalten können (z.B. durch Zusatz von Plazenta-Extrakten). Dadurch sind auch hier Unterschiede zwischen verschiedenen Produktionschargen nicht auszuschließen. Eine weitere

Minimierung der Chargenvariabilität und eine Verbesserung der Bioverfügbarkeit kann daher durch die Entwicklung eines definierten synthetischen Mediums für die RTG-2 Zellen erreicht werden. Für viele Säugetierzelllinien wurden solche speziellen synthetischen Medien entwickelt (Bar-

Substanznamen	Medienzusätze		
	10% FKS	10% BMS	4% U-G
Acrolein	1,24	0,89	0,39
Hexadecyl-trimethylammoniumbromid	2,4	3,3	6,1
3,5-Dichlorphenol	30,1	27,1	28,7
Rhodamin-B	49,1	95,1	93,6
Natriumdodecylsulfat	62,1	29,7	38,9
Chloramin-T	73,8	57,1	71,1
Triton X-100	74,1	83,1	99,7
2,4-Dichlorphenol	93,3	112,2	128,7
3,4-Dichloranilin	119,2	171,1	141,9
4-Nitrophenol	142,1	199,5	317,1
Methylfuran	237,6	122,5	170,5
2,6-Dichloranilin	255	260	275
Kupfersulfat	272	290	190
Phosphorsäure	310	260	215
m-Kresol	496	493	320
Phenol	650	875	900
Phtalsäure	892	905	880
4-Nitroanilin	960	425	425
Na-tetraborat	2120	1190	6000
Anilin	2200	3800	3800
Ethylendiamin	2390	2300	2770
EDTA	5200	3900	4800
2,6-Dimethylheptanon	6200	6000	8900
Nitritotriessigsäure	9500	10700	12400
Zitronensäure	13500	18500	19600
Kaliumchlorid	18900	27800	30600

Tabelle 2: Vergleich der IC_{50} -Werte. Angegeben sind die Mittelwerte aus 2 Versuchen in mg/l. (Da die linearen Regressionen der logarithmierten IC_{50} -Werte bereits nach 2 Versuchsdurchgängen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,988$ (10% FKS zu 10% BMS) und $r = 0,983$ (10% FKS zu 4% U-G) für den Vergleich der verschiedenen Medien ergaben, wurden keine weiteren Versuchsdurchgänge durchgeführt.)

nes and Sato, 1980). Entsprechende Untersuchungen für die Kultivierung von Fischzellen werden an der Akademie für Tierschutz bereits durchgeführt.

Durch die Verwendung einer FKS-Ersatzlösung für einen Routinetest könnte darüber hinaus die Nachfrage nach fötalem Kälberserum gesenkt und damit der tierschutzwidrigen Gewinnung dieses Produktes vorgebeugt werden. Bei der Verwendung synthetischer Medien wäre auch die Verwendung von Plazenta-Extrakten ausgeschlossen, deren Herstellung allerdings weniger tierschutzrelevant ist als die Gewinnung von FKS. Plazenten fallen bei jeder Kälbergeburt als Abfallprodukt an und werden auch für die Weiterverarbeitung in kosmetischen Produkten gesammelt. Durch den Ersatz des fötalen Kälberserums könnte damit sowohl aus wissenschaftlicher, als auch aus Sicht des Tierschutzes die Akzeptanz des Zytotoxizitätstests mit Fischzellen als Alternative zum Fischtest insgesamt verbessert werden.

Literatur

- Ahne, W. (1985). Untersuchungen über die Verwendung von Fischzellkulturen für die Toxizitätsbestimmung zur Einschränkung und Ersatz des Fischtests. *Zbl. Bakt. Hyg., I.Abt.Orig. B* 180, 480-504.
- Barnes, D., and Sato, G. (1980). Serum-free cell culture: a unifying approach. *Cell*, 22, 649-655.
- Bols, N. C., Boliska, S. A., Dixon, D. G., Hodson, P. V. and Kaiser, K. L. E. (1985). The use of fish cell cultures as an indication of contaminant toxicity to fish. *Aquatic Toxicology* 6, 147-155.
- Borenfreund, E. and Puerner, J. A. (1985). Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters* 24, 119-124.
- Isomaa, B., Lilius, H. and Rabergh, C. (1994). Aquatic toxicology in vitro: A brief review. *ATLA* 22, 243-253.
- Lindl, T. und Bauer, J. (1994). *Zell- und Gewebekultur*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- Plumb, J. A. and Wolf, K. (1971). Fish cell growth rates. *In Vitro* 7(1), 42-45.
- Rusche, B. and KohlpOTH, M. (1993). The R1-cytotoxicity test as a replacement for the fish test stipulated in the German Waste Water Act. In T. Braunbeck, W. Hanke and H. Segner (Hrsg.),

Fish-Ecotoxicology and Ecophysiology (81-92). Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft.

- Schulz, M., Lewald, B., KohlpOTH, M., Rusche, B., Lorenz, K. H. J., Unruh, E., Hansen, P.-D. and Miltenburger, H. G. (1995). Fischzelllinien in der toxikologischen Bewertung von Abwasserproben. *ALTEX* 12-4, 188-194.
- Wolf, K. and Mann, J. A. (1980). Poikilotherm vertebrate cell lines and viruses: A current listing for fishes. *In Vitro* 16(2), 168-179.
- Wolf, K. and Quimby, M. C. (1962). Established eurythermic line of Fish cells in vitro, *Science* 135, 1065-1066.

Danksagung

Dieses Projekt wurde gefördert durch das Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie. Wir danken der engagierten Assistenz von A. Wilhelm, S. Reisch und K. Scharl bei der Durchführung der Experimente.

Korrespondenzadresse

Dr. Martin KohlpOTH
Akademie für Tierschutz,
Spechtstr. 1,
D-85579 Neubiberg

Endomysium Antibodies Detection with Umbilical Cord Sections

Leo Izzi

Immuno Pharmacology Research S.p.A., I-Catania

Zusammenfassung: Nachweis von Endomysium-Antikörpern mit Nabelschnur-Schnitten.

Der Endomysium-Antikörpernachweis (EmA) gilt als zuverlässigster Test zur Diagnose der Zöliakie. Üblicherweise wird ein indirekter Fluoreszenztest an Schnitten von Affen-Speiseröhren durchgeführt. Beim Vergleich eines Anti-Gliadin (AGA) ELISA's an Affen-Speiseröhren- und Nabelschnur-Schnitten zeigte der Test bei beiden Geweben die gleiche Sensibilität, beim Gebrauch menschlicher Nabelschnüre jedoch eine höhere Spezifität. Der Ersatz der ethisch bedenklichen Verwendung von Affen-Gewebe durch die Verwendung von Nabelschnüren vermindert zudem die Testkosten.

Summary

Anti-Endomysium antibodies (EmA) detection is the most reliable test for the diagnosis of coeliac disease. Usually monkey distal oesophagus sections are used. Tests with ELISA anti-gliadin (AGA) antibodies show that umbilical cord EmA tests can effectively substitute monkey oesophagus EmA tests.

Keywords: Coeliac disease, endomysium antibodies, gliadin antibodies, monkey oesophagus, umbilical cord

1 Introduction

In the past few years, the Anti-Endomysium antibodies detection (EmA) has been revealed as the most reliable test for the diagnosis of coeliac disease. Current tests normally used in diagnostic laboratories

utilize an Indirect Immunofluorescence (IFI) protocol with monkeys distal oesophagus sections. Some authors (Landinser et al., 1994) have been researching the possibility to substitute monkey tissues with umbilical cord tissues, with the purpose to overcome ethical facets linked to

the utilization of dead animal tissues and to allow a significant decrease of the price of EmA tests, since umbilical cord is a tissue that is normally discarded, does not have endogenous immunoglobulins and is easy to find. A study has been pursued on a pediatric population encompassing 105