



Fakultet Health, Aarhus Universitet
Att.: Dyrevelfærdsorganet
Nørrebrogade 44
8000 Aarhus C

Forsøgsdyrenes Værn
(The Danish Society for the
Protection of Laboratory Animals)
Gothersgade 160
DK-1123 Copenhagen K
Denmark
Tlf. (+45) 33 32 00 16
Fax. (+45) 33 32 81 12
Kontonr 9541-1 02 08 38
www.forsoegsdyrenes-vaern.dk

December 2015

Serum-fri celledyrkning

Kære medlemmer af Dyrevelfærdsorganet,

Vi skriver til jer for at henlede jeres opmærksomhed på føtalt kalveserum (FBS eller FCS*), som sandsynligvis anvendes til celledyrkning i laboratorierne på jeres institutter eller virksomhed. Som I måske allerede véd, er der både dyreetiske og videnskabelige problemer knyttet til anvendelsen af FBS. I vedlagte folder gøres der rede for de problematikker, som knytter sig til anvendelsen af næringsmediet. I dette brev fremhæver vi de væsentligste punkter samtidig med, at vi gør opmærksom på det efterhånden store udvalg af og de mange udviklingsmuligheder for alternativer til FBS, der findes i dag.

Første gang Forsøgsdyrenes Værn behandlede dette emne var i 2008, hvor vi bl.a. udarbejdede en rapport. Vi har nu udarbejdet vedhæftede folder og desuden en hjemmeside www.godcellekultur.dk, hvor man kan finde en liste over forhandlere af kemisk-definerede næringsmedier. Derved har man som forsker et redskab til at komme bort fra anvendelsen af FBS. Listen inkluderer også firmaer, som kan levere skræddersyede løsninger i tilfælde af særlige cellelinjer.

Bekymringerne knyttet til brugen af FBS blev taget op for flere end 12 år siden af Verdenssundhedsorganisationen, WHO, i forbindelse med risikoen for at sprede TSE-sygdomme (Transmissible Spongiforme Encephalopater) ved lægemiddelproduktion. TSE-risikoen er årsagen til, at FBS i dag kun må importeres fra bestemte lande, som regnes for TSE-fri eller som betragtes som lande med lav risiko. Restriktioner betyder, at produktet er dyrere end det ellers ville være, og stigende efterspørgsel af FBS har ført til svindel med mærkning af råstoffets oprindelse. Svindelen er svær at komme til livs og kontrollen må siges at være ringe.

TSE-sygdomme er ikke det eneste, man frygter i forbindelse med FBS. En anden bekymring er, at der kan være variationer i kvaliteten mellem forskellige partier af FBS, hvilket kan forårsage problemer i cellekulturen. Det giver upålidelige forskningsresultater, og gør resultaterne svære at reproducere¹.

På europæisk plan har EURL-ECVAM siden 2008 anbefalet, at der anvendes alternativer til FBS, hvor det overhovedet er muligt. EURL-ECVAM kræver også en redegørelse for fortsat brug af FBS og andre animalske næringsmedier, når nye celle-baserede testmetoder fremlægges til validering². Siden 2008 har Det Europæiske Lægemiddelagenturs vejledning om cellebaserede lægemidler³ anbefalet, at brugen af animalske reagenter undgås og erstattes af ikke-animalske reagenter - eksempelvis ved anvendelse af

¹ Gstraunthaler, G. et al "A plea to reduce or replace fetal bovine serum in cell culture media", *Cytotechnology* (2013) 65: 791-793, "Guidance on Good Cell Culture Practice" og "A report of the second ECVAM task force on good cell culture practice", *ATLA* 33, 261-287, 2005 (se især s. 265)

² ESAC Statement on the use of FCS and other animal-derived supplements, adopted at its 28th meeting, 7-8 May 2008

³ Guideline on human cell-based medicinal products (document EMEA/CHMP/410869/2006, gældende fra den 1. September 2008, s. 7

alternative syntetiske næringsmedier med et defineret indhold. I 2014 blev anvendelsen af kemisk-definerede, serumfri celledyrkningssubstrater og næringsmedier anbefalet i den britiske videnskabelige vejledning om god praksis i forbindelse med brugen af cellelinjer i biomedicinsk forskning⁴.

Som dyreværnsforening er vi i høj grad motiveret af det dyreetiske problem forbundet med udvinding af kalveserum. Læs mere herom i vedlagte folder.

Det er vort håb, at I vil læse informationen i vores folder og på ovennævnte hjemmeside, og at I vil gøre jeres til at komme en mere pålidelig, reproducérbar og dyreetisk forskning et skridt nærmere.

Glædelig jul og venlige hilsener

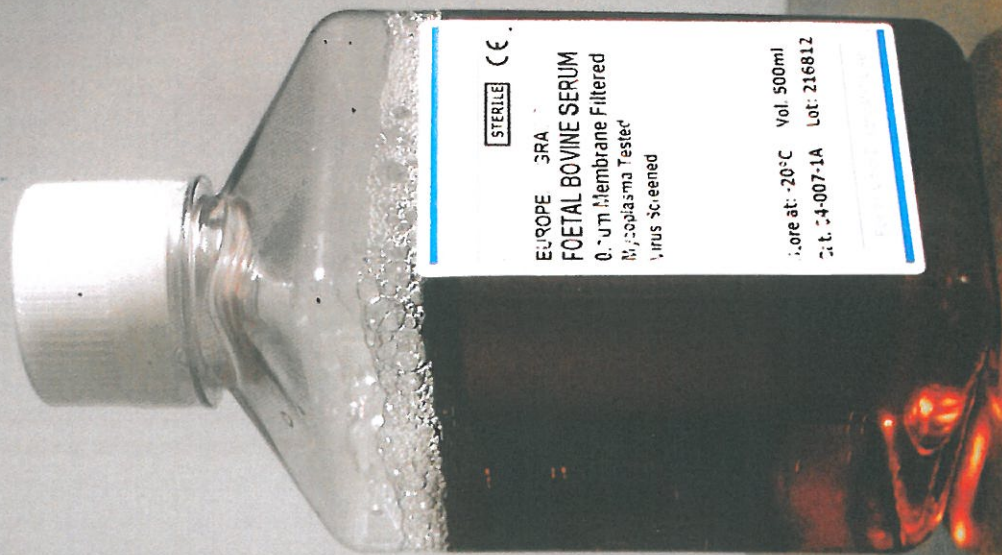
Forsøgsdyrenes Værn og Alternativfondet

* FBS= Fetal Bovine Serum FCS= Fetal Calf Serum

Forsøgsdyrenes Værn er stiftet i 1963 og er Danmarks største organisation på området. Forsøgsdyrenes Værn beskæftiger sig især med • at støtte og udbrede kendskabet til forskning, hvor anvendelse af dyr kan begrænses eller erstattes af andre metoder • at påvirke brugere af forsøgsdyr til at anvende mere humane metoder • at oplyse om forsøgsdyrenes kår og om de lidelser de udsættes for og • at påvirke lovgivningen om forsøgsdyr. Læs mere på www.forsogedyrenes-vaern.dk

Alternativfondet er stiftet i 1980, og Fondets formål er at yde støtte til udviklingen og anvendelsen af alternative metoder med henblik på at nedbringe eller afskaffe anvendelsen af forsøgsdyr. Fondet yder støtte til forskning, som efter bestyrelsens skøn opfylder formålsparagraffen. Sammen med et svensk og et finsk fond uddeler Alternativfondet hvert år **Nordisk Forskningspris til Alternativer til Dyreforsøg**. Læs mere på www.alternativfondet.dk hvor du også kan læse om seneste prismodtagers arbejde.

⁴ "Guidelines for the use of cell lines in biomedical research", British Journal of Cancer (2014) 111, 1021-1046, doi: 10.1038/bjc.2014.166, <http://www.nature.com/bjc/journal/v111/n6/full/bjc2014166a.html>



DU KAN TRÆFFE ET
DYREVENLIGT VALG

Hvad er føtalt kalveserum?

Føtalt kalveserum* er et serum udvundet af blod fra kalvefostre. Serum er den klare væske, der bliver tilbage, efter at blodet er koaguleret. Det anvendes til dyrkning af cellekulturer 'in vitro', og er det mest udbredte serum, fordi det er bredspektret, og kan anvendes som næring til næsten alle typer celler.

Hvor anvendes det?

Føtalt kalveserum anvendes til forskning inden for alle de videnskabsområder, der har med levende organismer at gøre – for eksempel veterinær- og fødevareområdet, medicinal- og biotekindustrien, og anvendes i forskning på universiteterne og i sygehusvæsenet.



Hvorledes udvindes kalveserum?

På slagteriet skæres koen op som led i den almindelige slagteprocedure. Er hun drægtig, fjernes fosteret, der stadig befinder sig i livmoderen, og sendes videre til et andet lokale, hvor det skæres fri, renses for fostervand og desinficeres. Derefter stikkes en nål med en diameter på 1,6-2,7 mm ind mellem 4. og 5. ribben og direkte ind i det bankende hjerte, hvorefter blodet ved hvert hjerteslag pumpes ned i en steril pose. Indgrebet varer mellem 2 og 5 min.

* Benævnes FCS eller FBS (Fetal Galf Serum / Fetal Bovine Serum).

Efterhånden som kalvefosteret tømmes for blod, dør kalven af iltmangel. Efter tapning lader man blodet koagulere, hvorefter det centrifugeres. Serummet opsamles for derefter at gennemgå forskellige filtreringsprocesser.

Hvorfor skal man undgå føtalt kalveserum?

Udvinding af føtalt kalveserum har i mange år vakt bekymring – både af dyreværnsmæssige, videnskabelige og af sundhedsmæssige grunde:

1. Det er almindeligt kendt, at intrakardial injektion er meget smertefuld! Rådet for Dyreforsøg stiller da også krav om, at hjertepunktur på forsøgsdyr skal foregå under bedøvelse. En EU-rapport² konkluderer, at de fysiologiske forudsætninger for smertefølelse hos kalvefostre er på plads allerede efter den første trediedel af drægtighedsperioden. Da drægtighedsperioden for kvier er 9 måneder, mener man altså, at kalvefostre fysiologisk er i stand til at føle smerte, fra de er 3 måneder gamle. Hovedparten af de fostre, der anvendes til produktion af føtalt kalveserum, er næsten fuldbårne. Derved fås den største mængde blod.

2. Føtalt kalveserum er et produkt, hvis nøjagtige indhold er ukendt. Desuden varierer indholdet fra vareparti til vareparti. Det betyder – trods visse modforanstaltninger – at der er store forskelle mellem FBS-partierne. Det kan derfor være svært at sammenligne forskningsresultater og undersøgelser.

Den britiske videnskabelige vejledning om god praksis i forbindelse med brugen af cellelinier i biomedicinsk forskning anbefaler nu anvendelsen af kemiske-definerede serumfri næringsmedier.³

3. FBS frembyder en betydelig risiko ved fremstilling af lægemidler, idet produktet indeholder forskellige mængder af endotoxiner, hæmoglobin og andre uønskede eller skadelige stoffer. Endotoxiner kan ikke blot påvirke cellernes vækst, men kan også overføres til færdige produkter, som måske skal anvendes til lægemidler til mennesker – f.eks. vaccine. European Medicines Agency fremfører, at:

Der findes alternativer

At anvende andre typer animalsk serum er intet fremskridt – hverken dyreværnsmæssigt eller videnskabeligt. Heldigvis er der et stort antal serumfri næringsmedier på markedet. Der er flere andre end de dyreetiske fordele ved at anvende dem:

De er mere pålidelige

Et defineret, serumfrit næringsmediesupplement véd man med sikkerhed hvad indeholder. Kemisk fremstillede stoffer er ensartede. Sundhedsmyndighederne stiller stadigt stigende krav til sikkerheden, og serumfri næringsmedier kan anvendes uden risiko.

De er billigere

Serumfri næringsmedier er på lang sigt billigere. Udbrud af mund- og klovsyge kan presse prisen på føtalt serum yderligere op. Selvom om FBS er et supplement, og kun udgør ca. 5-15% af det samlede næringsmedie, så anslås det, at føtalt kalveserum prismæssigt udgør 55 til 70 % af et givent næringsmedium. Forskere har anslået, at man kan spare op til 80%, når man går over til serumfri alternativer.

Hvordan går jeg frem?

Det er blevet let at finde frem til det næringsmedium, som passer til netop din forskning og dine celler. De fleste producenter tilbyder teknisk assistance og vejledning om alternative produkter. Som dyreværnsforening må vi dog påpege, at både den dyreetiske gevinst og pålideligheden går fløjten, hvis man erstatter føtalt kalveserum med serum fra andre dyr.

Oversigt over forhandlere af serumfri næringsmedier

På www.godcellekultur.dk finder du en liste over forhandlere af serumfri næringsmedier. Hos dem kan du få oplyst, om de forhandler et næringsmedie, der passer til din forskning eller din celleline, eller om de kan tilpasse et.

"The presence of extraneous agents in bovine serum certainly represents a major risk to the quality of the finished product."⁴ EU's center for vurdering af alternative metoder anbefaler forskere at erstatte kalveserum, både af dyreetiske grunde og for at opnå højere pålidelighed.⁵ World Health Organization (WHO) fraråder også brug af kalveserum, blandt andet p.g.a. smitterisiko: "The use of serum or other poorly defined reagents is not recommended in the production of new biologicals from cell culture, and wherever possible chemically defined alternatives should be sought."⁶

4. Et stop for brugen af føtalt kalveserum vil ikke alene spare mange dyr for lidelse, men vil også give forskere mere pålidelige resultater.

5. Forskere har både en moralsk og en lovmæssig forpligtelse til at anvende alternativer til dyr, hvor det overhovedet er muligt.⁷

6. Erstatning af FBS med et ikke-animalsk næringsmedie er en del af den praktiske gennemførelse af de 3R'er. Det er dyreetisk set acceptabelt, og det giver pålidelige og reproducerbare resultater rent videnskabeligt, idet ingredienserne i ikke-animalske næringsmedier kan defineres – modsat i føtalt kalveserum. Det er til gavn for dyrene, forskningen og for udviklingen af nye in vitro testmetoder.

⁷ *Animal derived reagents may harbour infectious agents and may increase undesirable immunological responses in the recipient. When applicable, the use of animal reagents should be avoided and replaced by non animal derived reagents of defined composition.*

European Medicines Agency,
Guidelines on human cell-based
medicinal products, 2008



Svindel med serum

USA har strengere regler end EU og tillader ikke import af føtalt kalveserum fra Syd- og Mellemamerika⁸. Det gør EU! Svindel med indhold er udbredt, og eksempelvis blandes føtalt kalveserum med voksenserum, men sælges alligevel under betegnelsen FBS.



Illustration af svindelveje: læs nedfra og følg numrene.

En af de seneste afsløringer af svindel resulterede i, at en leverandør af FBS var nødsaget til at udsende en advarsel om, at partier af deres FBS-produkt kunne være tilsat serum fra voksent kvæg, vand og/eller vækstfremmende tilsætningsstoffer.⁹ Desuden måtte de informere om, at FBS-produkter solgt til lande uden for USA fejlagtigt kunne være mærket med oprindelsesland Australien eller med EU-godkendte tapningslande. Advarslen indeholdt derudover information om, at det tilsatte voksenserum kunne stamme fra Argentina, Brasilien, Mexico, Canada eller USA. Køberne af produktet har altså slet ikke kunnet stole på hverken renhed eller oprindelsesland. På trods af at danske myndigheder fremfører, at der p.t. ikke foregår produktion af føtalt kalveserum i Danmark, så anfører nogle producenter Danmark som deres FBS-produkts oprindelsesland.

Forsøgsdyrenes Værn ønsker

- en etisk forskning uden brug af næringsmedier, der ved fremstilling har påført dyr lidelse
- at import af serum udvundet fra levende fostre (uanset dyreart) skal forbydes i EU
- videnskabeligt pålidelige og mere reproducérbare data
- gennemsigtig og sporbar sammensætning af næringsmedier
- at der som en konsekvens af ovenstående bidrages væsentligt til at opfylde Good Cell Culture Practice (GCCP)
- at alle offentlige forskningsinstitutioner udarbejder en strategi for udfasning af brugen af føtalt kalveserum til fordel for syntetiske næringsmedier.

Fokus på alternativer til FBS

I 2009 var Forsøgsdyrenes Værn medarrangør af en workshop, som blev afholdt på Københavns Universitet i samarbejde med toksikologer fra Holland, Østrig, Belgien, Danmark, Schweiz, Tyskland og Italien. Workshop'en resulterede i rapporten *Optimization of chemically defined cell culture media – Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods (Toxicology in Vitro, 24 (2010) 1053–1063, Elsevier)*.

Rapport om føtalt kalveserum

Forsøgsdyrenes Værn har skrevet en rapport om føtalt kalveserum og de tekniske og videnskabelige aspekter af fremstillingen og anvendelsen af føtalt kalveserum - og giver eksempler på svindel med serum. Du kan bestille rapporten via en bestillingsformular på www.godcellekultur.dk

1) Bryony Close et al., Euthanasia of Experimental Animals: Report Prepared for the European Commission (Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 1997): s. 14. 2) Close op cit. 3) Guidelines for the use of cell lines in biomedical research, British Journal of Cancer (2011) 111, 1021-1046, doi: 10.1038/bjc.2014.166, <http://www.nature.com/bjc/journal/v111/n6/full/bjc2014166a.html> 4) European Medicines Agency, Guidelines on human cell- based medicinal products, 2008 5) (EURL - ECVAM) 6) WHO, Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks, 2010 7) Direktiv 2010/63/EU 8) med undtagelse af Chile. 9) Gerhard Gstraunthaler et al., A Severe Case of Fraudulent Blending of Fetal Bovine Serum Strengthens the Case for Serum-free Cell and Tissue Culture Applications i: ATLA 42 (2014): s. 207-209.

"The use of FBS is controversial for a number of reasons. First of all, the collection of serum causes unnecessary suffering for the unborn calf. Secondly, seasonal and continental variations in the serum composition, produces batch-to-batch variations. This, in turn, causes phenotypical differences in the cell cultures, resulting in variations of the results."

van der Valk et al., Toxicology in Vitro, 18, 2004

"The shift from traditional serum-supplemented media to serum-free and protein-free media has several advantages, which include better definition of the composition, reduced contamination and lower cost."

Global Pharmaceutical Technology & Manufacturing

"Foetal bovine serum has created an unreliability, in terms of quantity, quality and price."

Business Communications Company

"The use of serum replacements or serum-free media that contain the necessary constituents for culturing cells, including amino acids, vitamins, lipids, salts, and growth factors, should be considered to achieve improved reproducibility and control over that of FBS in both the biotechnology arena and the academic research field."

Adam Elhofy, PhD. Essential Pharmaceuticals.

Landsforeningen Forsøgsdyrenes Værn

Gothersgade 160

1123 København K

Tlf.: 33-320016

www.forsogsdynrenes-vaern.dk

www.godcellekultur.dk