

Methodensammlung der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik	
Nachweis von replikativen Vacciniaviren	AM011
Erstellt vom Unterausschuss Methodenentwicklung der LAG, März 2003	
Status: verabschiedet	

1. Zweck und Anwendungsbereich

Mit dieser Anleitung können replikative Vacciniaviren (Wildtyp und rekombinant), welche zuvor von Laboroberflächen abgewischt oder als Identifikationsproben genommen wurden, auf ihre biologische Funktion hin überprüft und damit nachgewiesen werden (zu den vorgenannten Wischproben vgl. die entsprechende Methode des Unterausschuss Methodenentwicklung des LAG „Abwischen von Viren von Laboroberflächen“).

2. Kurzbeschreibung

Biologisch aktive Vacciniaviren können nebst anderen auch Verozellen („african green monkey kidney cells“) infizieren. Die Methode beschreibt neben der Kultivierung der Verozellen deren Infektion mit Vacciniaviren (aus dem Probenmaterial). Spätestens 72 Stunden nach der Infektion werden die Ansätze ausgewertet. Die Plaques können nach einer Fixierung und Blaufärbung des Zellrasens von Auge erkannt und ggf. unter dem Mikroskop (40 x Vergrößerung) weiter charakterisiert werden. Der Replikationszyklus dieser Viren ist so schnell, dass die auf einer Monolayer-Kultur der Zelllinie Vero entstehenden Plaques häufig bereits nach 24 Stunden mit einem Mikroskop sichtbar sind.

3. Material

3.1 Geräte

Kunststoff- und Glasmaterialien müssen vor der Verwendung sterilisiert werden. Die Verwendung von aerosolgeschützten Pipettenspitzen dient als Schutz vor Kontamination.

- Zentrifuge
- Sicherheitswerkbank (Klasse II)
- Ultraschallgerät (z.B. Cup Horn mit Ultraschallgenerator)
- Halter für graduierte 15ml und 50ml Plastikröhrchen
- Mikroskop mit Phasenkontrast
- Pipetboy
- Kryostat (Flüssigstickstoffbehälter zum Aufbewahren von Zelllinien in Kryoröhrchen)
- Ampullenträger für Kryoröhrchen
- Zellkultur Inkubator mit HEPA-Filter und CO₂ Zumischung (37°C, mit 5% CO₂)

Plastikverbrauchsmaterial:

- 15ml und 50ml graduierte Zentrifugenröhrchen mit verschraubbarem Plastikdeckel
- Einweg Serologische-Pipetten 25ml, 10ml, 5ml
- Sterile Zellkulturflaschen mit Filterdeckel, 75cm²
- Sterile Zellkultur Testplatten mit 24 Löchern zu je 1,9 cm²

3.2. Reagenzien und Lösungen

Es sind grundsätzlich analysenreine, für die Zellkultur und die Molekularbiologie geeignete Reagenzien zu verwenden. Soweit nicht anders angegeben, ist unter „Lösung“ eine wässrige Lösung zu verstehen.

- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)
- Fetal Bovine Serum (FBS)
- 1x Trypsin-EDTA-Lösung
- Geneticin-Lösung [30mg/ml]
- Crystal violet
- Ethanol 70%

- Kulturmedium bestehend aus: 500ml DMEM
 50ml FBS (ca. 10%)
 300µl Geneticin-Lösung

- Färbelösung bestehend aus: 1g Crystal violet
 710ml H₂O
 290ml Ethanol 70%

- Vero-Zellen (Vero-B4)

4. Durchführung

Alle Arbeiten werden, soweit dies möglich ist, in der Sicherheitswerkbank durchgeführt.

4.1. Auftauen der Zellen

(Es können auch die Standardanleitungen aus entsprechenden Methodensammlungen verwendet werden.)

- Wasserbad auf 37° C vorwärmen.
- 1 x ca. 50ml Kulturmedium auf 37°C vorwärmen.
- Kryoröhrchen mit Vero-Zellen dem Kryostat entnehmen und während 1 Minute im Wasserbad auftauen (Der Wasserstand sollte wegen der Kontaminationsgefahr die Füllmenge des Kryoröhrchens nicht übersteigen).
- Kryoröhrchen mit Alkohol aussen abspritzen und aufgetaute Zellsuspension in je 5ml vorgewärmtes Kulturmedium (15ml Zentrifugenröhrchen) transferieren.

- Zellen während 5 Minuten bei 100 x g sedimentieren.
- Überstand entfernen und sedimentierte Zellen in 1ml Kulturmedium aufnehmen und danach in 30ml vorgewärmtes Kulturmedium (Zellkulturflaschen mit 75 cm² Boden) transferieren.
- Zellkultur bei 37°C und 5% CO₂ inkubieren und mindestens alle 2 Tage mit dem Mikroskop kontrollieren. Die verwendete Zelllinie benötigt nach dem Auftauen zum Erreichen der Konfluenz auf dem Boden der Zellkulturflasche zwischen 3 und 5 Tage.

4.2. Umsetzen der Zellen (Passagieren)

(Es können auch die Standardanleitungen aus entsprechenden Methodensammlungen verwendet werden.)

- Kulturmedium vorsichtig entfernen.
- Zellrasen 2 x vorsichtig mit 1x PBS waschen.
- Mit 3ml Trypsin-EDTA-Lösung die Zellen vom Boden der Zellkulturflächen lösen (dauert ca. 5 Min. bei 37°C).
- Neue Kulturflaschen (75 cm²) mit je 30ml Kulturmedium vorbereiten.
- Abgelöste Zellen mit 5ml Kulturmedium versetzen (Inaktivieren von Trypsin) und mit einer 10ml Serologischen Pipette resuspendieren.
- Je 1/5 bis 1/3 der Zellsuspension auf die vorbereiteten Kulturflaschen animpfen.
- Zellkulturen bei 37°C und 5% CO₂ inkubieren und mindestens alle 2 Tage mit dem Mikroskop kontrollieren. Die verwendeten Zelllinien benötigen bei dem Passagieren zum Erreichen der Konfluenz auf dem Boden der Zellkulturflaschen zwischen 2 und 3 Tage.

4.3. Infizieren der Zelllinien

- Zellen aus einer 75 cm² Kulturflasche mit der Vero-Zelllinie, welche ca. 70% Konfluenz erreicht hat, werden wie unter Punkt 4.2. beschrieben trypsinisiert.
- Die Hälfte der Zellsuspension aus dem Trypsinierungsvorgang wird mit Kulturmedium auf 50ml ergänzt.
- Je 2ml verdünnte Vero Zellsuspension wird zu den Löchern einer 24 Loch Zellkultur-Testplatte gegeben.
- Die Zellen werden so lange bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, bis sie einen konfluenten Zellrasen bilden (ca. 24 – 48 Stunden).
- Die Medienüberstände von jeder Kultur werden bis auf ca. 200µl entfernt. (Achtung! Die Zellen müssen immer mit ca. 200µl Kulturmedium überdeckt sein, damit sie nicht austrocknen!)
- Nach dem Auftauen der Proben oder Wischproben werden diese während 30 Sekunden im Wasserbad mit Ultraschall homogenisiert (Achtung! Geeignete Einstellung des Ultraschallgerätes wählen um Probe nicht zu schädigen!).
- 500µl jeder zu untersuchenden Wischprobe oder maximal 10⁷ Pfu eines Vacciniavirus-Überstandes werden mit 1ml Kulturmedium versetzt.
- Je 300µl dieser verdünnten Probe (Wischprobe bzw. Vacciniavirus-Überstand) werden auf je 4 Loch-Kulturen der 24 Loch Zellkultur-Testplatte transferiert.
- Als Negativ-Kontrolle dient das reine Kulturmedium.

- Als Positiv-Kontrolle können mit Kulturmedium verdünnte, zuvor schon validierte Vacciniavirus-suspensionen verwendet werden (im Minimum 10 Pfu pro Loch).
- Für die Infektion werden die Zellen während 1 Stunde bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Zellkultur-Testplatte wird während dieser Zeit alle 15 Minuten 3 x leicht gewippt um ein Antrocknen der Zellen in der Mitte des Zellrasens zu verhindern.
- Nach 1 Stunde werden die Zellkulturen mit je 1,5ml Kulturmedium ergänzt.

4.4. Inkubation und Färben der Zellkulturen

(Es können auch die Standardanleitungen aus entsprechenden Methodensammlungen verwendet werden.)

- Die Zellkultur-Testplatte wird nach der Infektion bei 37°C und 5% CO₂ während 72 Stunden inkubiert.
- Die Kulturmedien werden vorsichtig entfernt und verworfen (Achtung! potentiell infektiöses Material! Zum Inaktivieren am besten mit einem Vakuumabsaugsystem direkt in einen Behälter mit einem geeigneten Desinfektionsmittel absaugen).
- 200µl Färbelösung zum Boden jeder Kultur geben und durch Wippen auf dem gesamten Zellrasen jeder Kultur verteilen.
- Nach ca. 60 Sekunden Färbelösung absaugen und Zellkultur-Testplatte an der Luft in der Sterilen Werkbank trocknen.

5. Auswertung

- Plaques sind mit bloßem Auge als helle, durchsichtige Punkte/Flecken in einem blauen Hintergrund (gefärbte Zellen) sichtbar. „Echte“ durch Viren erzeugte Plaques können von anderen Löchern im Zellrasen unter dem Mikroskop leicht unterschieden werden, da die Zellen am Rand des Plaques eine veränderte Morphologie aufweisen und zudem viel intensiver gefärbt sind (dunkelblau).

6. Ringversuch

Im Jahr 2002 wurde diese Methode durch den Unterausschuss „Methodenentwicklung“ des LAG in einem Ringversuch validiert, an dem insgesamt 6 bundesdeutsche und ein Schweizer Überwachungslabor teilnahmen.

Alle 7 Laboratorien wendeten die vorliegende Nachweismethode „*mit Erfolg*“ an.

An jeden Teilnehmer waren vier codierte Proben, jeweils 2 Proben mit rekombinanten Vacciniaviren, eine positive Kontrollprobe (Wildtyp Vacciniaviren) sowie Puffer als Negativprobe, verschickt worden. Diese vier Proben wurden von allen beteiligten Laboren richtig erkannt.

Diese Methode beruht auf einer Standard Arbeitsanweisung (SOP) des kantonalen Laboratoriums Basel-Stadt (SOP P283), deren Entwicklung finanziell durch das Schweizer Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaften (BUWAL) unterstützt wurde.