

Methodensammlung der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik	
Abwischen von Viren von Laboroberflächen	AM014
Erstellt vom Unterausschuss Methodenentwicklung der LAG, März 2003	
Status: verabschiedet	

1. Zweck und Anwendungsbereich

Diese Methode beschreibt ein Routineverfahren zum Gewinnen von (biologisch aktiven) Viren durch Abwischen von Laboroberflächen. Dieses Verfahren wurde für Adeno- und Vacciniaviren erprobt. Aus den so gewonnenen Viren kann einerseits die DNA extrahiert (vgl. Methode „Extraktion von Virus-DNA“) und untersucht werden (vgl. Methode „Quantitativer Nachweis von Vacciniavirus DNA mittels Real Time PCR“). Andererseits kann mittels eines Bioassays die Funktionsfähigkeit der abgewischene Viren getestet werden (vgl. Methode „Nachweis von replikativen Vacciniaviren“)

2. Kurzbeschreibung

Bei dieser Methode werden virale Kontaminationen auf typischen Laboroberflächen mit einem in Puffer getränkten sterilen Wattestäbchen abgewischt. Die Zusammensetzung des verwendeten Puffers ist so gestaltet, dass er ein optimales Entfernen von auf Oberflächen eingetrockneten Viren erlaubt und das Intakthalten dieser Partikel ermöglicht, um diese anschließend weiter charakterisieren zu können. Die Methode wurde bislang für Adeno- und Vacciniaviren erprobt, eignet sich aber grundsätzlich für eine Vielzahl von unterschiedlichen Viren.

3 Material

3.1 Geräte

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

- Erhebungs-Rapport
- Kühlbox mit Temperatur-Logger
- Kamera
- Halter für Eppendorfröhrchen
- Diverse Kolbenhubpipetten
- Latexhandschuhe
- Sterile, einzeln verpackte Wattestäbchen (Stäbchen aus Holz!)
- Plastikverbrauchsmaterial
 - aerosolgeschützte Pipettenspitzen
 - 2 ml Reaktionsgefäße mit „Safe Lock“
 - 50 ml graduierte Plastikröhrchen mit verschraubbarem Plastikdeckel
 - Einweg-Sterilfiltrationsgerät 0,2 µm
 - Petrischalen (8 cm im Durchmesser)

3.2. Reagenzien

Es sind grundsätzlich analysenreine, für die Zellkultur und die Molekularbiologie geeignete Reagenzien zu verwenden.

- BSA Fraktion V
- NaCl
- KCl
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
- KH_2PO_4
- Tween 80
- steriles bidestilliertes Wasser

3.3 Lösungen

Soweit nicht anders angegeben, ist unter „Lösung“ eine wässrige Lösung zu verstehen.

- **5x PBS (Phosphate Buffered Saline), pH 7.3, filtersterilisiert:**
 - 5x Stocklösung, 250 ml:
 - 10 g NaCl
 - 0,25 g KCl
 - 1,44 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
 - 0,25 g KH_2PO_4
- **Wischpuffer: PBS / 0,1% BSA / 0,05% Tween 80** (immer vor Gebrauch frisch herstellen):
 - 8 ml 5x PBS
 - 40 mg BSA Fraktion V
 - 20 μl Tween 80
 - auf 40 ml mit sterilem bidest. Wasser auffüllen
 - mischen bis alle Komponenten in Lösung sind (40°C, ungefähr 1 Stunde)
- **Virensuspension (mit einem Titer von 1×10^6 Pfu pro ml) der nachzuweisenden Viren (Positivkontrolle)**

4. Durchführung

- Die Probenahme erfolgt mit Latexhandschuhen.
- für jede Wischprobe wird je ein 2 ml Reaktionsgefäß (Safe Lock) mit 1 ml Wischpuffer vorbereitet
- steriles Wattestäbchen aus der Verpackung nehmen (Achtung! Watte nicht kontaminieren) und Watte mit vorbereitetem Wischpuffer befeuchten
- zu untersuchende Oberfläche (50 – 100 cm^2) mit dem Wattestäbchen mehrfach abwischen (je 10mal in der x- und y-Richtung)
- Wattestäbchen im restlichen Wischpuffer ausquirlen
- Abwischvorgang wiederholen
- Wattespitze des Stäbchens im Reaktionsgefäß abbrechen

- Wischprobe verschließen und bis zur Weiterverwendung in der Kühlbox oder im Kühlschrank aufbewahren

4.1. Hinweise zur Qualitätssicherung

- Für jede Probenahme wird ein Protokoll vorbereitet und ausgefüllt.
- Von jeder Wischstelle sollte zum Dokumentieren ein bis zwei Aufnahmen mit einer Kamera erstellt werden.
- Vor dem Erheben der eigentlichen Wischproben werden 20 µl der mitgeführten Virensuspension (Positivkontrolle) auf den Boden einer Petrischale aufgetragen. Diese Petrischale wird mit leicht angehobenem Deckel während der gesamten Probenahme in der Sicherheitswerkbank des inspizierten Labors belassen. Am Schluss der Probenahme werden die Viren auf der Petrischale wie unter Punkt 4 beschrieben abgewischt. Als Referenz zu dieser Wischprobe werden 20 µl der mitgeführten Virensuspension direkt in 980 µl Wischpuffer gegeben. Diese Kontrollproben dienen als Positivkontrollen für die weiteren Untersuchungen.
- Als Negativkontrolle (Reagenzienkontrolle) dient eine Probe mit 1 ml Wischpuffer, in das der Kopf eines Wattestäbchens ohne vormaliges Abwischen abgebrochen wird.

5. 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 Methode „*mit Erfolg*“ an.

Von jedem Teilnehmer wurden fünf codierte Proben mit verschiedenen Mengen an rekombinanten und Wildtyp-Viren auf eine Standardlaboroberfläche abgewischt. Im Anschluss wurden diese Proben auf das Vorhandensein von viraler DNA sowie von biologisch aktiven Viren untersucht. Das Abwischen und die nachfolgenden Untersuchungen wurden von allen beteiligten Laboren erfolgreich durchgeführt.

Diese Methode beruht auf einer Standard Arbeitsanweisung (SOP) des kantonalen Laboratoriums Basel-Stadt (SOP P220), deren Entwicklung finanziell durch das Schweizer Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaften (BUWAL) unterstützt wurde.