



Abwischen von Viren von Laboroberflächen

SOP 220

(3. Version)

Änderungen:

Version	Änderungen	Grund
3	Unterscheidung der Wischpufferzusammensetzung je nach Verwendungszweck (DNA- bzw. RNA-Viren ohne/mit Bioassay), Kap. 3	Bei nur-RNA-Analysen ist die Erhöhung der Stabilität der RNA durch Zugabe von RNAlater sinnvoll.
3	Erweiterung des Katalogs von Probenahmestellen, Kap. 5	Fokus der Probenahmen haben sich auf "ausserhalb" BSL2 erweitert
3	Vorgehen bei der Positivkontrolle, Kap. 5	Die Durchführung dieser Kontrolle vor Ort ist nicht mehr sinnvoll.

Verfasser: C. Bagutti

Die Entwicklung dieser Methode wurde zum Teil durch das BAFU finanziert.

Erstellt		Freigegeben		Version-Nr.:	Dateiname:
am	durch	am	durch	3	SOP220_3.doc
8/2/13	Bz	13.3.13	PS		

1 EINLEITUNG

1.1. ZWECK

Diese Methode beschreibt ein Routineverfahren zum Abwischen von Viren auf Laboroberflächen.

1.2. ANWENDUNGSBEREICH

Mit dieser Methode können Viren (getestet an Vaccinia Viren und Adenoviren) von diversen Laboroberflächen (Arbeitsflächen, Geräte, Installationen) effizient abgewischt werden. Aus den so gesammelten Viren kann einerseits die DNA extrahiert (SOP 221) und untersucht werden (SOP 222). Andererseits kann mittels eines Bioassays (SOP 283) ihre Funktionsfähigkeit getestet werden.

2 PRINZIP

Virale Kontaminationen werden mit einem in Puffer getränkten sterilen Wattestäbchen abgewischt. Die Zusammensetzung des Puffers ist so gestaltet, dass er ein optimales Entfernen von auf Oberflächen eingetrockneten Viren erlaubt (enthält Detergens: Tween 80) und das Intakthalten dieser Partikel ermöglicht (isotonischer Puffer: PBS (Phosphate Buffered Saline) + BSA (Bovine Serum Albumin)).

3 PRÜFEINRICHTUNGEN

(Wenn nicht mit einem * markiert, können auch Materialien, Geräte, Chemikalien und Lösungsmittel anderer Lieferanten resp. Hersteller verwendet werden.)

3.1. MATERIAL & GERÄTE

(Kunststoff- und Glasmaterialien müssen steril sein. 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!), z.B. Huber & Co. AG Art. Nr. 3.4814.01
- Plastikverbrauchsmaterial
 - aerosolgeschützte Pipettenspitzen
 - 2 ml Reaktionsgefäße mit „Safe Lock“ (z.B. Eppendorf Art. Nr. 0030 120.094)
 - 50 ml graduierte Plastikröhrchen mit verschraubbarem Plastikdeckel, z.B. Fischer Scientific Art. Nr. N47188
 - Einweg-Sterilfiltrationsgerät 0,2 µm. z.B. Fischer Scientific (Nalgene) Art. Nr. 347 605 63
 - Petrischalen (8 cm im Durchmesser)

3.2. REAGENZIEN

(Es sind grundsätzlich analysenreine, für die Molekularbiologie geeignete Reagenzien zu verwenden)

- BSA Fraktion V, z.B. Catalys AG Art. Nr. 0119241
- NaCl
- KCl
- Na₂HPO₄ * 7H₂O
- KH₂PO₄
- Tween 80
- sterilisiertes bidestilliertes Wasser
- NUR FÜR RNA-VIREN: RNAlater® Stabilisation Reagent*, QIAGEN Art.Nr. 76104

3.3. LÖSUNGEN

- 5x PBS (Phosphate Buffered Saline), pH 7.3, filtersterilisiert:
5x Stocklösung, 250 ml:
10 g NaCl
0,25 g KCl
1,44 g Na₂HPO₄ * 7H₂O
0,25 g KH₂PO₄
- **Wischpuffer Grundzusammensetzung:** 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)

ACHTUNG:		
Je nach Virentyp oder weiterer Untersuchung wird folgender Wischpuffer verwendet:		
DNA-Viren	RNA-Viren, welche in Bio-assay auf Infektiosität geprüft werden sollen.	RNA-Viren, bei welchen keine Infektiositätsprüfung gemacht wird.
Grundrezept	Grundrezept	Grundrezept + RNA _{later} (vol: 1:1)

- **Virensuspension (mit einem Titer von ca. 1x10⁶ Pfu pro ml) der nachzuweisenden Viren (Referenzprobe)**

4 AUSFÜHRUNG

- Die Probenahme erfolgt mit Latexhandschuhen.
- Für jede Wischprobe wird je ein 2 ml Reaktionsgefäß (Safe Lock) mit 1 ml Wischpuffer (**ACHTUNG: je nach Verwendungszweck Zusammensetzung prüfen**) vorbereitet.
- Ein steriles Wattestäbchen aus der Verpackung nehmen (Achtung! Watte nicht kontaminieren) und Watte mit vorbereitetem Wischpuffer befeuchten.
- Zu untersuchende Oberfläche (50 - 100 cm²) mit dem Wattestäbchen mehrfach abwischen (je 10 mal in der x- und y-Richtung).
- Wattestäbchen im restlichen Wischpuffer ausquirlen.
- Abwischvorgang mit demselben Wattestäbchen wiederholen.
- Wattespitze des Stäbchens im Reaktionsgefäß abbrechen.
- Wischprobe verschliessen und bis zur Weiterverwendung in der Kühlbox oder im Kühlschrank aufbewahren.

5 HINWEISE ZUR QUALITÄTSSICHERUNG

- Die Qualität der verwendeten Referenzmaterialien und Reagenzien wird bei jeder Untersuchung „ad hoc“ überprüft. Dies erlaubt das Verwenden von Reagenzien über ihr allfälliges Verfalldatum hinaus. Ein möglicher Einfluss auf das Resultat wird damit erkannt.
- Je nach Fokus der Probenahme (Kontaminationen im BSL2 Bereich und/oder Erkennung von Verschleppungen aus dem BSL2 in andere Teile des Gebäudes) werden Laboroberflächen und/oder Büro-/Gebäudeoberflächen beprobt. Die nachfolgende Liste gibt Beispiele zu möglichen Probenahmestellen, ist aber nicht zwingend und nicht abschliessend. Wird eine Probenahme ausschliesslich im BSL2 durchgeführt, sollten alle "Laborbereiche" (vgl. Tabelle unten) abgedeckt werden:

Laboroberflächen	Laborbereich	Büro- und Gebäudeoberflächen	Bereich
Arbeitsplatz in der Sicherheitswerkbank	MSCII	Computermaus in separatem Büro	Ausserhalb des BSL2 Containments
Zentrifuge (Rotorraum, Röhrenhalter)	Zentrifuge	Türgriff Büro, Seminarraum etc...	
Türgriff eines Inkubators, Kühlschrank etc.	Bedienelemente Geräte	Labortürgriff aussen	
Touchpanel MSCII, Autoklav etc...		Liftknopf	
Boden	allg. Laboroberflächen		
Labortisch			
Laborcomputer (Maus)	Stellen ohne Kontakt mit Organismus		
Labortelefon			
Labortürgriff innen			

- Pro Probenahme (Labor bzw. Institut) werden mindestens 10 Stellen beprobt.
- Für jede Probenahme wird ein Erhebungs-Rapport vorbereitet und ausgefüllt.
- Von jeder Wischstelle wird zum Dokumentieren eine Aufnahmen mit einer Digital-Kamera erstellt.
- Für jede Probenahme müssen folgende Kontrollen mitgeführt werden:

- 1 Als **Negativkontrolle** (Reagenzienkontrolle) dient eine Probe mit 1 ml Wischpuffer, in den der Kopf eines Wattestäbchens ohne vormaliges Abwischen abgebrochen wird. Diese Kontrolle wird vor Abschluss der Probenahme durchgeführt.
- 2 Zeitgleich mit der Probenahme wird im KL BS 50 µl der Virensuspension (**Referenzprobe**) in eine Petrischale in der Sicherheitswerkbank pipettiert. Der Tropfen wird mit Hilfe der Pipettenspitze verstrichen. Diese Petrischale wird mit leicht angehobenem Deckel solange in der Sicherheitswerkbank belassen, wie die Probenahme schätzungsweise dauert (normalerweise 1 - 1.5 Std). Nach Ablauf dieser Zeit werden die Viren auf der Petrischale wie unter Kap. 4 beschrieben abgewischt. Diese Kontrollprobe dient als **Positivkontrolle** für die weiteren Untersuchungen. Als Referenz zu dieser Positivkontrolle werden 50 µl der mitgeführten Virensuspension direkt in 950 µl Wischpuffer gegeben.

6 VALIDIERUNGSUNTERLAGEN

Die Validierungsunterlagen bilden ein eigenes Dokument, um eine problemlosere Anpassung zu ermöglichen.