

Friedrich-Loeffler-Institut (Greifswald-Insel Riems)

Genomnachweis von Vertretern der Klasse Mollicutes in Zellkulturen mittels real-time PCR

K. L. Molle, C. Korthase, B. Hoffmann

Die Kontamination von Zellkulturen durch Mycoplasma- bzw. Mollicutes-Arten ist ein weit verbreitetes Problem im virologisch arbeitenden Labor. Die Vermeidung von entsprechenden Kontaminationen ist nicht immer einfach, da diese durch bereits kontaminierte Zellkulturstocks, durch Virusanzuchtversuche selbst, aber auch durch die arbeitenden Personen ständig im Zellkulturlabor vorhanden sind. Auch die Verwendung von Standard-Antibiotika (z.B. Penicillin-Streptomycin) oder die Filtration durch 0,2µm-Filter verhindert die Infektion der Zellkultur mit Mykoplasmen nicht. Der Einsatz von Mykoplasmen-freien Zellkulturen in der Diagnostik und Forschung ist grundsätzlich notwendig um standardisierte und reproduzierbare Daten generieren zu können. Von einer Vielzahl negativer Effekte durch Mykoplasmen in einer belasteten Zellkultur auf die Zellkultur selbst aber auch auf die zu vermehrenden Viren kann ausgegangen werden. Daher kommt der regelmäßigen Überprüfung der Mykoplasmen-Freiheit der im Labor verwendeten Zelllinie sowie der darauf angezogenen Viren eine besondere Bedeutung zu.

Ein real-time PCR Assay zum schnellen und preiswerten Genomnachweis von kontaminierenden Mollicutes/Mykoplasmenarten in Zellkultursystemen wurde entwickelt und validiert. Die Assay-Entwicklung basiert auf einem Alignment von 817 Mollicutes-16s-RNA-Gensequenzen, die im Mai 2017 in der NCBI Genbank verfügbar waren. Das 16s-RNA-Gen wurde für das Alignment verwendet, da hier die meisten Sequenzdaten von verschiedenen Mollicutes-Arten vorlagen. Mehrere Primer und Sonden, die eine umfassende Detektion der publizierten Mollicutes-Sequenzen ermöglichen sollten, wurden für weitere Validierungen ausgewählt. Die in-silico Analyse der ausgewählten Primer und Sonden zeigte, dass eine maximale diagnostische Sensitivität gepaart mit einer umfassenden Spezifität kaum zu erreichen sein dürfte und neben den Mollicutes-Arten auch andere Bakterien durch die gewählten Primer und Sonden erfasst werden. Diese „erwartete“ mangelnde Exklusivität des Assays wurde im Hinblick auf eine umfassende Inklusivität akzeptiert, da auch Nicht-Mollicutes-Arten in einer Zellkultur unerwünscht sind und somit ihre Detektion auch eine Sanierungsmaßnahme nach sich ziehen würde. Der hier beschriebene Mycoplasma-16s-Mix16 Assay lieferte in vergleichenden Studien die besten Ergebnisse hinsichtlich Sensitivität, Fluoreszenz-basierter Detektion und Sequenzierbarkeit des PCR-Produktes und wurde deshalb für die weiteren Validierungen verwendet.

Zur Überprüfung der erfolgreichen DNA-Extraktion und Amplifikation kann der Assay mit einem internen Kontrollsystem kombiniert werden (Hoffmann et al., 2006). Diese interne Kontroll-DNA ist kommerziell erhältlich (INTYPE IC-DNA; Indical Bioscience). Zur DNA-Extraktion aus Zellkulturmaterial (z.B. abtrypsinierte Zellen) können der QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) oder vergleichbare Systeme verwendet werden. Hier kann die IC-DNA der lysierten Probe zugesetzt und mit dem EGFP-Mix6-HEX-IC System die inhibitionsfreie Extraktion kontrolliert werden.

Der Mycoplasma-16s-Mix16 Assay amplifiziert ein 231 bp Target-Fragment und das interne Kontrollsystem EGFP-Mix6-HEX produziert ein 374 bp großes Amplikon. Die Unterschiede in der Größe der generierten PCR-Produkte erlauben eine gelbasierte Differenzierung und Sequenzierung des Target-Amplikons.

KORRESPONDENZADRESSE

Dr. Bernd Hoffmann
E-Mail: bernd.hoffmann@fli.de
