

Quantifizierung des Lympo-Choriomeningitis-Virus mit einer immunologischen Fokustechnik in 24- oder 96-Loch-Platten

Manuel Battegay

Institut für Experimentelle Immunologie

Departement Pathologie der Universität Zürich, Sternwartstrasse 2, CH-8091 Zürich

Zusammenfassung

Titer des Lympo-Choriomeningitis-Virus (LCMV) wurden auf adhärennten Fibroblastenzelllinien in 24- oder 96-Loch-Platten bestimmt. Nach Absorption des Virus durch die Zellen erfolgte eine Inkubation von 40 Stunden mit einer Methylzellulose-Überschichtung. Darauf wurden der Zellrasen mit 4% Formaldehyd fixiert und die Zellen mit 0,5% Triton X-100 permeabilisiert. Die Färbung wurde mit einem monoklonalen Ratte-anti-LCMV und einem Peroxidase-markierten Geiss-anti-Ratte-Zweitantikörper durchgeführt. Die Sensitivität zu konventionellen Virusplaquetechniken ist um einen Faktor 2–4 different. Mit der beschriebenen Methode lassen sich alle LCMV-Isolate bestimmen, auch solche, die nicht mit einer konventionellen Plaquetechnik bestimmbar waren. Letztere konnten lediglich *in vivo* bestimmt werden. Die Methode ist schneller (2–3 Tage) als bisherige Verfahren (4–6 Tage), und auf eine Titration in Mäusen kann verzichtet werden.

Summary: Quantification of lymphocytic choriomeningitis virus with an immunological focus assay in 24 well plates

Titers of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) were determined on adherent fibroblast cell lines in 24, respectively 96 well plates. After absorption of virus by cells and 48 hrs incubation under a methylcellulose overlay, cell monolayers were fixed with 4% formaldehyde in phosphate buffered saline, permeabilized by incubating in 0.5% Triton X-100 in balanced salt solution and then stained with a monoclonal rat anti-LCMV and a peroxidase labeled second stage antibody. The sensitivity of the assay is within a factor of 2–4 of conventional plaquing methods. The method is quicker (2–3 d), as compared to conventional methods (4–6 d) and less expensive with respect to both workhours and materials involved. The method also detects poorly- or non-plaquing LCMV isolates, and therefore drastically reduces the needs for titration of LCMV in mice.

Einleitung

Das Lympho-Choriomeningitis-Virus (LCMV) ist ein üblicherweise nicht zytopathisches, mauspathogenes Arena-Virus [1–3]. Die LCMV-Infektion der Mäuse eignet sich zum Studium verschiedenster Fragen im Bereich der Immunologie respektive Virologie (Rolle der zytotoxischen T-Zellen, Erkennung virusinfizierter Zielzellen beruhend auf den Haupthistokompatibilitätsantigenen, Studien über Toleranz, Virus induzierte Immunpathologie). Da das Virus nicht zytopathisch ist, konnten Virustiter nur schwer quantifiziert werden, was jahrelang ausschliesslich *in vivo* durchgeführt wurde [1–3]. Trotzdem konnten Virustiter relativ zuverlässig *in vitro* durch vier publizierte Plaquemethoden bestimmt werden [4–10]. Diese Methoden beinhalten verschiedene Nachteile. Erstens sind verschiedene LCMV-Isolate auf den jeweiligen Zellen schwierig oder nicht zu plaquen [5,11] und müssen deshalb *in vivo* quantifiziert werden. Zweitens dauern diese Plaquemethoden 4–6 Tage und benötigen einen grossen Arbeitsaufwand. Drittens werden diese Bestimmungen in 30-mm-Petrischalen oder 6-Loch-Platten durchgeführt, was viel Plastikmaterial benötigt und auch hinderlich ist, um eine grosse Anzahl von Proben zu untersuchen.

Aus diesen Gründen, aber vor allem, um auf eine Quantifizierung in Mäusen zu verzichten, suchten wir eine immunologische Fokustechnik zu etablieren, speziell mit der durch eine Fluoreszenzmethode gewonnenen Erfahrung [12]. Die beschriebene Methode ist schneller (2–3 Tage), vorteilhaft hinsichtlich Material und auf den Gebrauch von Labormäusen zur Virusquantifizierung kann praktisch ganz verzichtet werden [13].

Material und Methoden

Medien: «Minimal essential medium» (MEM), «Dulbecco's modification of Eagle's -medium» and «Iscove's modified Dulbecco's medium» (IMDM) (Hazleton oder GIBCO) wurden mit 5–10% foetalem Kälberserum (FCS), Penicillin-Streptomycin und Glutamin angereichert. Als Überschichtung wurde eine 1 : 1-Mischung von 2 x DMEM und 2% Methylzellulose (Fluka, Buchs) benutzt. «Balanced salt solution» (BSS) und «phosphate buffered saline» (PBS) wurden für die Waschschrte benutzt.

Zellen: Vero-Zellen (ATCC, CCL 81); L929 sind murine, aus C3H entnommene Fibroblasten (ATCC, CCL1); MC57G ist eine murine, aus C57BL/6 entstammende methylcholanthren induzierte Fibrosarcom-Zelli-

nie. Die Zellen wurden in Glasflaschen in MEM 5% FCS kultiviert. Einzellsuspensionen wurden mittels Trypsinisieren des Zellrasens gewonnen.

Virus: Folgende LCMV-Isolate wurden gebraucht (Ursprungsort in Klammer): LCMV-Armstrong CA 1371 (Dr. M. Buchmeier, SCRIPPS, La Jolla) [3]; Armstrong-CI-13 entstand aus Armstrong CA 1371 (Dr. R. Ahmed, UCLA, Los Angeles) [5]; LCMV-WE (Dr. F. Lehmann-Grube, Hamburg) [6,7]; LCMV-DOCILE (Dr. C. Pfau, Rensselaer Polytechnical Institute Troy, N.Y.) wurde von einer Trägermaus, die mit LCMV-WE infiziert war, isoliert [11,14]; LCMV-Traub (Dr. M. Volkert, Kopenhagen, via Dr. F. Lehmann-Grube) [15] und LCMV-Pasteur (Dr. MF. Saron, Institut Pasteur, Paris) [16].

Reagenzien: Der monoklonale Ratte-anti-LCMV-Antikörper VL-4 wurde durch Fusion von Milzzellen einer LCMV-WE-immunisierten (Louvain × DA) F1-Ratte mit der YM3-Myelomazelllinie erhalten. Dieser Antikörper färbte nur zellinterne und nicht-zelloberflächenassoziierte Virusbestandteile. VL-4 wurde als Kulturüberstand ohne weitere Reinigung gebraucht.

Der mit Peroxidase markierte IgG-Geiss-anti-Ratte-Antikörper (Code: 112-035-003) wurde von Jackson Immunoresearch Laboratories (P. O. Box 9, Westgrove, PA 19390) bezogen und wurde in einer Verdünnung von 1 : 400 gebraucht. Um eine stärkere Färbung zu erhalten, wurde ein zusätzlicher IgG-Zweitantikörper (Schwein-anti-Geiss, Code 6401) gebraucht, der von TAGO (P. O. Box 4463, Burlingame, CA 94011) bezogen wurde und ebenfalls 400fach verdünnt wurde.

Peroxidasereaktion: Das Entwicklungsreagens wurde zubereitet, indem 25,7 ml 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3,56g/100ml mit 24,3 ml 0,1 M Zitronensäure 1,92g/100 ml und 50 ml doppelt destilliertem H_2O gemischt wurden. Zu 100 ml dieser Lösung wurden 40 mg ortho-Phenyldiamin (Sigma P3888) zugefügt. Unmittelbar vor Gebrauch wurden 40 μl 30% H_2O_2 zugesetzt.

In vivo-Titration von LCMV: Eine in vivo-Titration von LCMV kann mittels Injektion in die Fusspfoten erfolgen [1–3]. Dabei werden pro Verdünnungsschritt (log 10 Verdünnungen) 30 μl der Probe in beide Hinterpfoten von Mäusen injiziert. Nach Injektion werden, bei Vorhandensein von Virus in der Verdünnung, zytotoxische T-Zellen induziert, die die Fusspfote am Tag 6–8 infiltrieren. Die Folge ist eine Schwellung, die am Tag 7–9 maximal ist und bis zum Tag 11 abnimmt. Eine Schwellung von über 25% wird als positiv betrachtet [2,17,18], d.h. Virus war in der injizierten Probe vorhanden. Eine Schwellung kommt zustande, falls 1 Viruspartikel in die Fusspfote injiziert wird, d.h. die Detektionsgrenze ist gegenüber in vitro-Verfahren nach wie vor tiefer.

Resultate

Methode: 1 zu 10 Verdünnungen der Testproben wurden auf Eis in 4-ml-Glasröhrchen in 1ml MEM 2% FCS vorbereitet. 50 μ l (200 μ l; Mengen für 24-Loch-Platte in Klammer) der jeweiligen Verdünnung wurden auf eine 96-Loch- respektive 24-Loch-Platte übertragen. Jeder Vertiefung wurden 50 μ l (200 μ l) Zellen in MEM or IMDM zugefügt. Folgende Zellkonzentrationen wurden gebraucht: MC57G: 7×10^5 /ml, Vero und L929 Zellen: $2,5 \times 10^5$ /ml. Die Platten wurden bei 37°/5% CO₂ für 4–6 Stunden inkubiert, um den Zellen zu ermöglichen, auf der Platte zu adhäreren. Darauf wurden 100 μ l (300 μ l) einer 1:1-Mischung von 2% Methylzellulose (Fluka 64620) in doppelt destilliertem Wasser und 2 x DMEM mit 10% FCS, Antibiotika und Glutamin zugefügt.

Färbung: Nach 40–48 Stunden im 37°-Inkubator wurde der Überstand mit einer Pasteurpipette abgesogen, wobei dies immer an der gleichen Stelle erfolgte, um Risse im Zellrasen zu vermeiden. Die Platten wurden zweimal mit BSS gewaschen und der Überstand mit 100 μ l (250 μ l) 4% Formaldehyd in PBS ersetzt, um die Zellen während 30 Minuten bei Raumtemperatur zu fixieren. Das Fixativ wurde sorgfältig abgeschüttelt, und die Platten wurden dreimal mit PBS gewaschen; diese Prozedur wurde für alle weiteren Waschschritte benutzt. 100 μ l (250 μ l) 0,5% Triton X-100 in BSS wurde für 20 Minuten zugefügt, um die fixierten Zellen zu permeabilisieren. Es erfolgte ein dreimaliges Waschen mit PBS. Unspezifische Bindungen wurden mit 100 μ l (200 μ l) PBS mit 10% FCS für 60–90 Minuten bei Raumtemperatur blockiert. Die Platten wurden gewaschen und mit 50 μ l (200 μ l) eines Kulturüberstandes eines monoklonalen Ratte-anti-LCMV-Antikörpers (VL-4) für 60–90 Minuten inkubiert. Der Antikörper wurde «abgeflickt», und nach dem Waschen wurden die Platten mit 50 μ l (180 μ l) eines Peroxidase-markierten Geiss-anti-Ratte-Antikörpers (verdünnt in BSS) für 60–90 Minuten inkubiert. Um die Färbung zu verbessern, kann ein zusätzlicher Zweitantikörper z.B. ein Schwein-anti-Geiss-Antikörper, der ebenfalls mit Peroxidase markiert ist, für 60–90 Minuten zugefügt werden. Die Inkubation mit dem Zweitantikörper ist von einem Waschschritt gefolgt.

100 μ l (300 μ l) des Entwicklungssubstrates wurden für 10–30 Minuten beigegeben. Um die Reaktion zu stoppen, wurden 100 μ l (200 μ l) 2N H₂SO₄ zugegeben. Die Reaktion kann auch gestoppt werden, indem die Platten mit Wasser mehrfach gewaschen werden.

Die Foki können als Plaques am besten auf einer Leuchtplatte von Auge gezählt werden und sind, falls gewaschen, für mehrere Wochen haltbar. Fi-

gur 1a, b zeigt die Fokustechnik in 24-/96-Loch-Platten für verschiedene Virusisolate. Die Plaqueanzahl einer gut zählbaren Stufe wird mit der entsprechenden Verdünnungsstufe (xlog 10) und nochmals mit dem Faktor 20 für die 96-Loch-Platte respektive 5 für die 24-Loch-Platte multipliziert, so dass sich die ausgerechnete Anzahl Viruspartikel auf einen ml der untersuchten Probe bezieht.

Evaluation verschiedener Zelllinien: LCMV-Isolate können bezüglich Wachstumskinetik auf verschiedenen Zelllinien Unterschiede aufweisen. Wie die Tabelle 1 zeigt, weichen identische Proben verschiedener LCMV-Isolate um einen Faktor 4–5 in der Bildung von Foki voneinander ab.

LCMV Armstrong war auf allen drei Zelllinien vergleichbar, während LCMV-Armstrong-CI-13 am besten auf Vero- oder MC57G-Zellen detektiert werden konnte.

Vergleich der immunologischen Fokusmethode mit klassischen Plaque-techniken auf L929-Zellen und in vivo-Bestimmungen: Dazu wurden identische Proben parallel angesetzt (Tabelle 1). Insgesamt sind die Resultate vergleichbar, insbesondere korreliert die in vivo-Titration gut mit der hier beschriebenen Fokusmethode in 24- und 96-Loch-Platten. Am besten abgegrenzt und sichtbar waren die Plaques auf MC57G-Zellen. Wiederholt wa-

| | Fokus-Formation | | | Plaque Assay | | In vivo |
|-------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------|
| | 24-L.-Platte MC57G | 96-L.-Platte MC57G | 96-L.-Platte L 929 | 6-L.-Platte L929 | 6-L.-Platte Vero cells | Fusspfoten Assay |
| ARM | 6.67±0.57 | 6.46±0.59 | 6.46±0.58 | 6.68±0.51 | nb ^{b)} | 6.82±0.54 |
| CI 13 | 7.18±0.66 | 7.15±0.05 | 6.34±0.54 ^{c)} | 6.92±0.58 ^{c)} | 7.09±0.06 | 7.50±0.56 |
| DOC | 7.15±0.65 | 7.08±0.05 | 6.78±0.56 ^{c)} | 7.00±0.61 ^{c)} | nb | 7.50±0.06 |
| WE | 6.66±0.05 | 6.26±0.04 | 6.27±0.04 | 6.76±0.59 | nb | 6.69±0.58 |

Tab. 1: Vergleich der Fokusmethode mit Plaquemethoden und der in vivo-Bestimmung von LCMV Tite³¹⁾.

a) Zahl definiert als log 10 Plaque forming units/ml

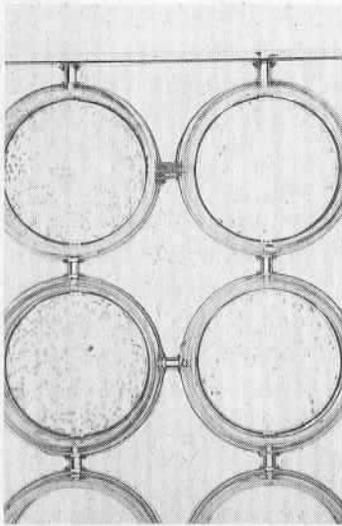
b) nicht bestimmt

c) Plaque schwierig zu definieren

Fig 1 LCMV-Fokus-Formations-Assay in 24-/96-Loch-Platten

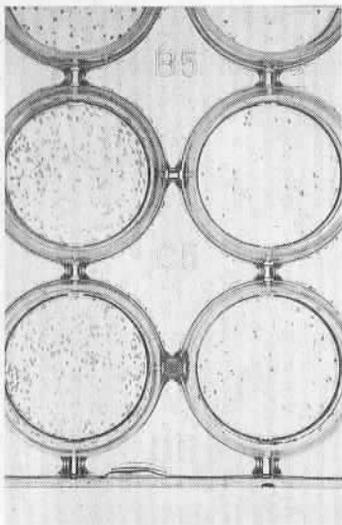
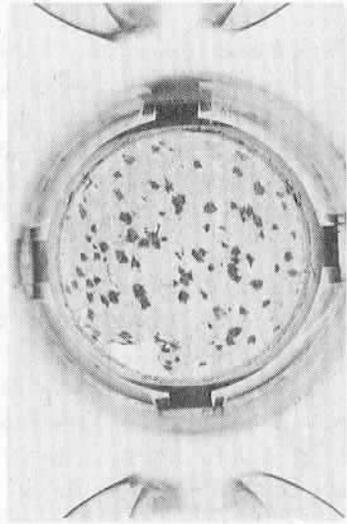
a) LCMV-WE titriert in 96-Loch-Platte auf L929 Zellen: 10^{-4} -Verdünnung.

b) Vergrößerung einer Fokusformation auf MC57G-Zellen: LCMV-Isolate (Duplikate): 1, Docile $10^{-4}/10^{-5}$ -Verdünnung, 2, CI-13 $10^{-4}/10^{-5}$ -Verdünnung, beide in 24-Loch-Platten, 3, CI-13 $10^{-4}/10^{-5}$ -dilution, 96 well plate (Färbung ohne zusätzlichen Schwein-anti-Geiss-IgG-Zweitantikörper).



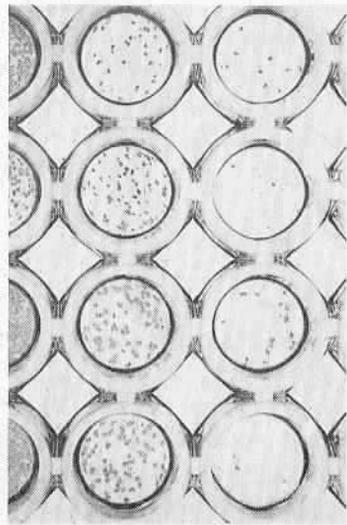
1

1a



2

3



ren die beobachteten Differenzen maximal dreifach im Vergleich zu den in vivo in der Fusspfote gemessenen Titern, wobei die in vivo-Bestimmung etwas sensitiver ist.

Hervorzuheben ist, dass verschiedene Isolate (z.B. CI-13, DOCILE), die auf L929 schlecht definierbare Plaques produzieren, auf MC57G und Vero-Zellen eine exzellente Fokusformation bewirken, die gleich gut ist wie die der bisher besser «plaquenden» Isolate LCMV-Armstrong oder LCMV-WE. Andere LCMV-Isolate wie LCMV-Pasteur, LCMV-Traub, LCMV-Aggressive und weitere Virusvarianten konnten ohne Probleme mit dem gleichen Verfahren quantifiziert werden. Insgesamt liegt die Sensitivität der Methode innerhalb eines Faktors 2–3 verglichen mit konventionellen Techniken.

Die beschriebene Methode ist kostengünstiger, und die Materialkosten belaufen sich lediglich auf ein Viertel im Vergleich zu bisherigen Verfahren. Zudem können innert weniger Zeit deutlich mehr Proben untersucht werden, und vor allem müssen praktisch keine Labormäuse gebraucht werden. Das in vivo-Testen von 40 Proben mit jeweils 4 Verdünnungen benötigt mindestens einen Tag Arbeit und 320 Mäuse. Das Messen der Fusspfotenschwellung vom Tag 7 bis Tag 11 benötigt weitere 6–8 Stunden. Eine Analyse dauert dementsprechend über eine Woche und benötigt eine grosse Anzahl Labormäuse. Mit konventionellen Plaquetekniken werden für die gleiche Anzahl Proben 8 Stunden gebraucht, um die Platten anzusetzen und nur die Proben aufzubringen. Zusätzlich müssen für das Füttern, Fixieren und Färben der Platten weitere 2–3 Stunden gerechnet werden. Insgesamt kann das Resultat ebenfalls erst nach 5–6 Tagen abgelesen werden. Im Vergleich dazu kann eine Person 80–120 Proben in 4–6 Stunden in 24- oder 96-Loch-Platten ansetzen und diese innert 2–3 Tagen analysieren, was dann nochmals 3 Stunden Arbeit benötigt.

Schlussfolgerung

Mit der beschriebenen Technik kann LCMV, ein sehr schwierig titrierbares Virus, in sämtlichen Organen inklusive Blut quantifiziert werden. Die Sensitivität ist sehr gut und liegt im Bereich Faktor 2–3 bisheriger Verfahren. Verschiedene Isolate, die in vitro nicht oder nur sehr schwer titrierbar waren, wie LCMV-Armstrong-CI-13 oder DOCILE, zeigen eine sehr gute Fokusformation. Deshalb kann diese Methode auch für andere Viren, die schlecht «plaquen», anwendbar sein. Bereits findet diese Methode, entspre-

chend modifiziert, Anwendung bei der Quantifizierung des Bornavirus [19]. Gewisse Probleme bei der Anwendung dieses Assays ergeben sich bei der Titration von Gewebehomogenaten, die ungenügend verdünnt und damit für die Zellen toxisch sind. Üblicherweise muss zum Beispiel eine Milz oder Leber 20x verdünnt sein (in MEM 2% FCS), damit das Organhomogenat nicht zu toxisch für den Zellrasen ist, was die Detektionsgrenze nach unten limitiert. Allerdings gilt dieser Nachteil auch für konventionelle Plaqueverfahren. Im Falle einer selten benötigten sehr tiefen Detektionsgrenze (< 250 plaques pro g Organ) ist die *in vivo*-Bestimmung allerdings immer noch die einzige Quantifizierungsmöglichkeit. Der hier beschriebene Assay hat die Anzahl der für die LCMV-Quantifizierung gebrauchten Labormäuse ganz drastisch eingeschränkt, erübrigt alle anderen *in vitro*-Verfahren und wird mit hoher Zuverlässigkeit angewendet [20, 21].

Literatur

1. Lehmann-Grube, F. 1971. Lymphocytic choriomeningitis virus. *Virol. Monogr.* 10: 1-173.
2. Hotchin, J. 1971. Persistent and slow virus infections. *Monogr. Virol.* 3: 1-211.
3. Buchmeier, M.J., R.M. Welsh, F.J. Dutko, and M.B.A. Oldstone. 1980. The virology and immunobiology of lymphocytic choriomeningitis virus infection. *Adv. Immunol.* 30: 275-312.
4. Mims, C.A. and R.V. Blanden. 1972. Antiviral action of immune lymphocytes in mice infected with lymphocytic choriomeningitis virus. *Infect. Immun.* 6: 695-698.
5. Ahmed, R., A. Salmi, L.D. Butler, J.M. Chiller, and M.B.A. Oldstone. 1984. Selection of genetic variants of lymphocytic choriomeningitis virus in spleens of persistently infected mice: Role in suppression of cytotoxic T lymphocyte response and viral persistence. *J. Exp. Med.* 60: 521-540.
6. Lehmann-Grube, F. and J. Ambrassat. 1977. A new method to detect lymphocytic choriomeningitis virus-specific antibody in human sera. *J. Gen. Virol.* 37: 85-92.
7. Lehmann-Grube, F., U. Assmann, C. Löliger, D. Moskophidis, and J. Löhler. 1985. Mechanism of recovery from acute virus infection. I. Role of T lymphocytes in the clearance of lymphocytic choriomeningitis virus from spleens of mice. *J. Immunol.* 134: 608-615.
8. Jacobson, S., F.J. Dutko, and C.J. Pfau. 1979. Determinants of spontaneous recovery and persistence in MDCK cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Gen. Virol.* 44: 113-121.
9. Sedwick, W.D. and T.J. Wiktor. 1967. Reproducible plaquing system for rabies, lymphocytic choriomeningitis, and other ribonucleic acid viruses in BHK-21/13S agarose suspensions. *J. Virol.* 1: 1224-1226.
10. Welsh, R.M. and Pfau, C.J. 1972. *J. Gen. Virol.* 14: 177.

11. Pfau, C.J., J.K. Valenti, D.C. Pevear, and K.D. Hunt. 1982. Lymphocytic choriomeningitis virus killer T cells are lethal only in weakly disseminated infections. *J. Exp. Med.* 156: 79–89.
12. Stitz, L., H. Hengartner, A. Althage, and R.M. Zinkernagel. 1988. An easy and rapid method to screen large numbers of antibodies against internal cellular determinants. *J. Immunol. Methods* 106: 211–216.
13. Battegay, M., S. Cooper, A. Althage, J. Baenziger, H. Hengartner, and R.M. Zinkernagel. 1991. Quantification of lymphocytic choriomeningitis virus with an immunological focus assay in 24 or 96 well plates. *J. Virol. Methods* 33: 191–198.
14. Jacobson, S. and C.J. Pfau. 1980. Viral pathogenesis and resistance to defective interfering particles. *Nature* 283: 311–313.
15. Volkert, M. and C. Lundstedt. 1968. The provocation of latent lymphocytic choriomeningitis virus infections in mice by treatment with antilymphocytic serum. *J. Exp. Med.* 327–339.
16. Saron, M.F., B. Shidani, M.A. Nahori, J.C. Guillon, and P. Truffa Bachi. 1990. Lymphocytic choriomeningitis virus-induced immunodepression: inherent defect of B and T lymphocytes. *J. Virol.* 64: 4076–4083.
17. Hotchin, J. 1962. The foot pad reaction of mice to lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* 17: 214.
18. Zinkernagel, R.M., T.P. Leist, H. Hengartner, and A. Althage. 1985. Susceptibility to lymphocytic choriomeningitis virus isolates correlates directly with early and high cytotoxic T cell activity, as well as with footpad swelling reaction, and all three are regulated by H-2D. *J. Exp. Med.* 162: 2125–2141.
19. Stitz, L., M. Sobbe, and T. Bilzer. 1992. Preventive effects of early anti-CD4 or anti-CD8 treatment on Borna disease in rats. *J. Virol.* 66: 3316–3323.
20. Althage, A., B. Odermatt, D. Moskophidis, Th. Kündig, H. Hengartner, and R.M. Zinkernagel. 1992. Immunosuppression by lymphocytic choriomeningitis virus infection: competent effector T and B cells but impaired antigen presentation. *Eur. J. Immunol.* 22: 1803–1812.
21. Oehen, S., H.P. Waldner, Th. Kündig, H. Hengartner, and R.M. Zinkernagel. 1992. Antivirally protective cytotoxic T cell memory to lymphocytic choriomeningitis virus is governed by persisting antigen. *J. Exp. Med.* In press.

Danksagung

Die Autoren danken an dieser Stelle für die finanzielle Unterstützung der Stiftung «Finanz-Pool 3R». Dank gebührt Rolf M. Zinkernagel für wertvolle Anregungen, Jürg Bänziger für das Herstellen des monoklonalen anti-LCMV-Antikörpers, Alana Althage und Sue Cooper für die exzellente technische Assistenz.