

NoToX - eine generelle Alternative für Formaldehyd?

NoToX - A General Alternative to Formaldehyde ?

E. Nissen^{1,2}, Renate Blesken¹, Gisela Kulins¹, G. Pauli¹

Zusammenfassung: NoToX ist eine neue Fixierungsflüssigkeit, die 1.000 ppm Ethanol, Bis-carbonyl-Verbindungen, antiseptische und fungizide Agenzien enthält. Es wird als Ersatz für Formaldehyd empfohlen. In den vorliegenden Untersuchungen wurde NoToX zur Virusinaktivierung bei zwei verschiedenen Virussystemen (SHV-1, ds DNA, umhüllt; EMCV, ss RNA, unbehüllt) und für immunzytochemische Bestimmungen der Rezeptoren auf peripheren Blutzellen (CD4, CD8) sowie des HIV-1 Regulatorproteins (Vpu) und der HIV-1/2 Virusstrukturproteine (p24, 26; gp41, 120) von HIV-infizierten H9-Zellen eingesetzt. Im Gegensatz zur Formalinfixierung sind nach 20 min NoToX-Behandlung immer noch ca. 50% des unbehüllten Virus (EMCV) nachweisbar. Titer des umhüllten Virus (SHV-1) liegen schon nach 5 min unterhalb der Nachweisgrenze. In der Immunzytochemie wurden nach NoToX-Fixierung im Vergleich zu Formaldehyd geringere (p24, 26) oder keine Reaktionen (gp41, 120; Vpu; CD4, CD8) beobachtet. In virologischen Laboratorien kann deshalb Formaldehyd nur eingeschränkt durch NoToX ersetzt werden.

Schlüsselwörter: Gewebefixierung; Desinfektionsmittel; Gewebekultur; Virologie; Immunzytochemie.

Summary: NoToX is a new fixative which contains 1.000 ppm ethanol, bis-carbonyl compounds and anti-septic or fungicide agents. By the manufacturer NoToX is recommended as an alternative to formaldehyde. In this study NoToX was used for virus inactivation in two different virus systems (SHV-1, ds DNA, enveloped; EMCV, ss RNA, non-enveloped) and for immunocytochemical determinations of receptors on peripheral blood cells (CD4, CD8) as well as of HIV-1 regulator protein (Vpu) and viral structure proteins (p24, 26; gp41, 120) of HIV-1 and HIV-2 infected H9 cells. In comparison to formaldehyde 50% of the non-enveloped virus (EMCV) is present after fixation with NoToX. After 5 min enveloped Virus (SHV-1) infec-

tivity titers are below the detection limit. In comparison to formaldehyde fixation NoToX fixation resulted in immunocytochemistry to a lower reactivity (p24, 26) or no reaction (gp 41, 120, Vpu, CD4, CD8). NoToX therefore cannot generally replace formaldehyde in virological laboratories.

Key words: tissue fixation; disinfectants; tissue culture; virology; immunohistochemistry.

In virologischen Laboratorien ist Formaldehyd (1-5%) eine wichtiges Agens zur Desinfektion und zur Fixierung histologischer Präparate. Wässrige Lösungen des Formaldehyds sind selbst in geringen Konzentrationen geruchsbelästigend und können Schleimhautreizungen in Augen, Nase und Kehlkopfbereich hervorrufen [1,2].

Seit Januar 1995 wird NoToX (quartett GmbH, Berlin) als Alternative zu Formaldehyd angeboten. Die farblose, geruchsneutrale Flüssigkeit wird, ohne daß eine Änderung der Arbeitstechniken, die für die Formalinfixierung ausgearbeitet wurden, notwendig wäre, zur immunhistologischen Fixierung empfohlen. Ziel der hier beschriebenen Untersuchungen war es, zu prüfen, ob an zwei verschiedenen Virussystemen (behülltes und unbehülltes Virus) eine ausreichende Virusinaktivierung erfolgt und ob im immunzytochemischen Nachweis nach Formaldehyd- oder NoToX-Fixierung gleiche Ergebnisse erzielt werden.

Material und Methoden

ML- (Lunge, Nerz) und Hep2-(Larynxkarzinom, Mensch)Zellen wurden in Dulbecco MEM mit 5 bzw. 10% inaktiviertem fötalem Kälberserum kultiviert. Die Zellen wurden mit 0,125% Trypsin und 0,05% EDTA suspendiert und passagiert. H9-Zellen wurden als Suspensionskultur in RPMI 1640 Medium mit 10% fötalem Kälberserum, 50 U/ml Nystatin, 2 mmol/l Glutamin und Zusatz von Penicillin und Streptomycin in den üblichen Konzentrationen gehalten.

Schweineherpesvirus Typ 1 (SHV-1³, ds DNA, umhüllt, Titer: 8,3 log₁₀ TCID₅₀) und murines Encephalomyocarditisvirus (EMCV, ss RNA, nicht-umhüllt, Titer: 9,3 log₁₀ TCID₅₀) wurden 1:10 verdünnt und 1:1 mit NoToX (unverdünnt) oder Formaldehyd (3,7% in PBS) vermischt. Nach 5, 15 und 30 min wur-

¹ Robert Koch-Institut, Fachbereich Virologie, Berlin.

² Korrespondenzadresse: Dr. sc. nat. E. Nissen, Robert Koch-Institut, Fachbereich 1, Nordufer 20, D-13353 Berlin. Fax: +49-30-4547-2605.

³ Nicht standardisierte Abkürzungen; EMCV, encephalomyelocarditis virus; HIV, human immunodeficiency virus; SHV, Schweineherpesvirus; CD, cluster of differentiation; ds double-stranded; ss, single-stranded; PBS, phosphate buffered saline; APAAP, alkaline phosphatase antiphosphatase.

Eingegangen am 31. Juli 1995 / Angenommen am 9. Nov. 1995

den Proben entnommen und Endpunkttitrationen in 96-well-Mikrotiterplatten (100 μ l Zellsuspension 10-15000 Zellen/well + 100 μ l Virussuspension) durchgeführt. Der (log₁₀ TCID₅₀) ist die Virusverdünnung, die in 50% der Zellkulturen zu einer Infektion mit dem Virus führt. Die Berechnung erfolgte nach Reed und Muench [3].

Für die immunzytochemischen Untersuchungen wurde die APAAP (alkalische Phosphatase, anti-alkalische Phosphatase)-Technik [4,5] genutzt. Dafür wurden periphere Spender-Blutlymphozyten oder HIV-1 bzw. HIV-2 infizierte H9-Zellen mit einer Zytocentrifuge (Shandon) auf Poly-L-Lysin (70 000 kD) beschichtete Objektträger zentrifugiert (25 x g, 5 min). Die aufgetrockneten Zellen oder Zellsuspensionen wurden 20 min entweder mit Formalin (3,7% in PBS) oder mit NoToX (unverdünnt) fixiert. Anschließend erfolgte eine Triton-Nachbehandlung (1% in PBS) für den Nachweis der intrazellulären Virusstrukturproteine. Die Rezeptoren, das Regulatorprotein (Vpu) und die Virusstrukturproteine werden durch viruspezifische monoklonale Mausantikörper nachgewiesen. Der gebundene Antikörper wurde über einen gegen Maus-Immunglobuline gerichteten Brückenantikörper (Anti-Maus IgG) an den APAAP-Komplex gekoppelt. Mit Hilfe der Enzymreaktion der alkalischen Phosphatase entsteht ein roter unlöslicher Farbkomplex, der über Monate stabil bleibt. Die Zytocentrifugenpräparate wurden in Glycerin-Gelatine eingebettet und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Auswertung erfolgt lichtmikroskopisch (250 x bzw. 400 x) und wurde von zwei unabhängigen Beobachtern durchgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse lassen folgende Schlußfolgerungen zu: NoToX ist weniger toxisch. Verdünnungen von $> 10^{-2}$ haben keinen Einfluß auf die Zellproliferation. Mit Formaldehyd (3,7%) wird dieser Effekt erst bei einer Verdünnung von $> 10^{-6}$ erreicht. Die Zellen wirken vergrößert, ähnlich wie bei einer hypotonischen Behandlung. Dies ist möglicherweise der Effekt des Einsatzes der unverdünnten wässrigen Lösung.

Bei umhüllten Viren (SHV-1) war die antivirale Wirkung von NoToX für das untersuchte Virus ausreichend (Tab. 1). Die Konzentration (unverdünnt) ist unbedingt einzuhalten. Schon eine 1:10 Verdünnung von NoToX führt beim umhüllten Virus zum Verlust der antiviralen Wirkung, d. h. nach 15 min war der Titer auf 2,7 log₁₀ TCID₅₀/ml abgesunken.

Die Inaktivierung von unbehüllten Viren (EMCV) ist unbefriedigend (Tab. 1). Vor Anwendung bei anderen Viren sollte die keimabtötende Wirkung überprüft werden.

In der Immunzytochemie wurden nach NoToX-Fixierung geringere (p24, p26) oder keine Reaktionen (gp41, 120; Vpu; CD4, CD8) beobachtet. Der in Tabelle 2 und 3 aufgeführte Nachweis von Rezeptoren

oder viruspezifischen Strukturen wird zur Diagnostik von HIV-Infektionen eingesetzt. Die Unterschiede zwischen Formaldehyd- und NoToX-Fixierung sind so gravierend, daß die alternative Fixierungsflüssigkeit für diese immunzytochemischen Untersuchungen nicht geeignet ist.

In der Produktbeschreibung wird NoToX die Eigenschaft der superschnellen Fixierung zugesprochen. Um eine Überfixierung, die negative Ergebnisse bedingen kann, auszuschließen, wurde die Zeit auf 5 bzw. 1 min reduziert. Sowohl beim Nachweis der Rezeptoren als auch beim Nachweis der Virusstrukturproteine (gp41, 120) konnten keine besseren Ergebnisse erzielt werden als mit der in Material und Methoden beschriebenen Fixierung (20 min). Beim HIV-1-Strukturprotein p24 (ohne Tritonbehandlung: 5 min, 15%, vergleiche Tabelle 3: 20 min $<$ 5%) und beim HIV-2-Virusstrukturprotein p26 ist eine Steigerung der Anzahl markierter Zellen (Tag 3:5 min \rightarrow 60%; 1

Tabelle 1 Antivirale Wirkung von NoToX im Vergleich zu Formaldehyd. Mittelwerte aus 3 Versuchen, $s < 1,0$ log₁₀ TCID₅₀/ml

Einwirkzeit (min)	Virustiter nach Behandlung (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml)			
	NoToX		Formaldehyd	
	SHV-1 ^a	EMCV ^b	SHV-1 ^a	
EMCV ^b				
5	$< 0,63$	7,03	$< 0,63$	1,50
15	$< 0,63$	6,50	$< 0,63$	$< 0,63$
30	$< 0,63$	5,30	$< 0,63$	$< 0,63$

a, b Ausgangstitel: 8,30 bzw. 9,30

Tabelle 2 Anteil (%) APAAP positiver peripherer Blutzellen nach Fixierung mit NoToX oder Formaldehyd

Antikörper	NoToX		Formaldehyd	
	A#	B*	A#	B*
CD4	0	0	< 50	40
CD8	0	0	< 25	25

in Suspension; *Zytocentrifugenpräparate

Tabelle 3 Anteil (%) in der APAAP Technik positiver HIV-1 oder HIV-2 infizierter H9-Zellen nach Fixierung mit NoToX oder Formaldehyd

Antikörper	Virus	NoToX		Formaldehyd	
		1 d	3 d	1 d	3 d
Vpu	HIV-1	0	0*	< 30	50
p24	HIV-1	> 20	< 5 *	< 65	75*
p26	HIV-2	> 15	< 35 *	> 20	> 90 *
gp41	HIV-1	0	0*	30	45*
gp120	HIV-1	0	0*	> 40	80*

* Ohne Tritonbehandlung

min > 85%; vergleiche Tabelle 3 :20 min < 35%) im Vergleich zur 20-min-Fixierung beobachtet worden. Es konnten aber nicht die Werte wie bei der Formalinfixierung erreicht werden (Tabelle 3). Wahrscheinlich ist für dieses Ergebnis die Lokalisation des Proteins entscheidend.

Die Fixierung vor (in Suspension) oder nach Zytozentrifugation (Tabelle 2) hat keinen Einfluß auf das Ergebnis.

Durch die Unsicherheit bei der keimabtötenden Wirkung für nicht umhüllte Viren ist Formaldehyd durch NoToX in virologischen Laboratorien nur bedingt zu ersetzen. In der Immunzytochemie kann NoToX nur nach den erforderlichen Kontrollexperimenten verwendet werden. Für die von uns eingesetzten Antigen-Antikörper-Systeme war die Fixierung mit

Formaldehyd die geeignete Methode, NoToX lieferte besonders für die Oberflächenantigene negative Ergebnisse.

Literatur

1. Merck. Sicherheitsblatt für Formaldehyd vom 30.06.1994. 3-5.
2. Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie. Formaldehyd und Paraformaldehyd. Merkblatt M10. 3/91. ZH1/296, 3-9.
3. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg* 1938;27:493-7.
4. Kunze R, Hielbig J, Becker J, Gelderblom H, Schulz U, Lobeck H, Reichart P, Koch MA. Immunochemical detection of Aids-virus infected cells in peripheral human blood. *AIFO* 1986;10:555-8.
5. Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosch AK, Abdulaziz Z, Mac Donald S, Pulford KAF, Stein H, Mason DY. Immunoenzymatic labelling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* 1984;32:219-29.