

**Institut für Virologie
Klinikum der Universität Essen**

**PRAKTIKUM
DER MIKROBIOLOGIE
UND DER IMMUNOLOGIE**

Teil: VIROLOGIE

Wintersemester 2019/20

VIROLOGIE	Seite
Allgemeine Hinweise zum Kursteil Virologie	1
KURSTAG 1- Zellkultur und direkte Virusnachweisverfahren	
Blutentnahme	2
Versuch 1 Passage einer permanenten Zellkultur	5
Seminar 2 Mikroskopische Veränderungen von Zellen durch Virusinfektionen	7
Versuch 3 Virustitration	7
Versuch 4 Virus-Neutralisationstest	10
KURSTAG 2 - Infektionsserologie	
Versuch 1 Enzymimmunoassay (EIA, ELISA) zum Nachweis von Anti-HBs-Antikörpern	12
Versuch 2 Western-Blot als Bestätigungstest für HIV- und EBV- Diagnostik	15
KURSTAG 3 - Impfkurs und molekulare Diagnostik	
Impfkurs, Besprechung von Kasuistiken (Bitte bringen Sie Ihren <u>Impfausweis</u> mit!)/ Fallbeispiel HIV	19
KURSTAG 4 - Kasuistiken	
Besprechung von Kasuistiken in Kleingruppen Hepatitis / CMV unter Immunsuppression / Ausbruch Norovirus	20

Allgemeine Hinweise zum Kursteil Virologie

Während des Praktikums arbeiten Sie mit infektiösem Material (Abstriche, Seren, die evtl. infektiös sind, und Virus-infizierte Zellen), deshalb muss während des gesamten Praktikums ausnahmslos Schutzkleidung getragen werden und den Anweisungen der Kursveranstalter Folge geleistet werden. Die Laborkittel werden von uns bereitgestellt. Zum Umkleiden und zur Aufbewahrung von Jacken und Taschen steht eine Garderobe zur Verfügung.

Vor dem Verlassen des Kursraumes werden die Hände desinfizieren. Das Desinfektionsmittel ist in Spendern bei den Waschbecken reichlich vorhanden. Zur Händedesinfektion 2 x 3,0 ml Desinfektionsmittel auf die Hände geben und in 1 bis 2 Minuten verreiben (1 Hebeldruck entspricht 1,0 ml).

Räumen Sie bitte am Ende Ihres Kurses Ihren Arbeitsplatz auf und stellen die Mikroskope in die entsprechenden Schränke zurück. Bitte reinigen Sie die Arbeitstische mit Zellstoff und Desinfektionsmittel. Den benutzten Zellstoff werfen Sie bitte in den blauen Abfallsack. Kontrollieren Sie, ob Gas- und Wasserhähne nach Kursbeendigung geschlossen sind.

KURSTAG 1 - Zellkultur und direkte Virusnachweisverfahren

Blutentnahme

Im Rahmen des virologischen Teils des Kurses werden Sie sich nach einer entsprechenden Anleitung gegenseitig Blut abnehmen, um Ihr Serum während der folgenden Kurstage untersuchen zu können. Für die diagnostischen Verfahren wird dabei ein Blutvolumen von ca. 5 ml benötigt.

Die benötigten Utensilien wie Spritzen, Kanülen, Staubbinden und Alkoholtupfer werden bereitgestellt.

Aufgrund der potentiellen Infektionsgefahr durch Blut (Hepatitis B, Hepatitis C, HIV) werden während der Blutentnahme grundsätzlich Handschuhe getragen.

Die Blutentnahme erfolgt an einer der Venen der Ellenbeuge. Die Einstichstelle ist vor der Venenpunktion ordnungsgemäß zu desinfizieren.

Nach der Blutentnahme wird die Kanüle zügig herausgezogen und die Punktionsstelle mit einem Tupfer komprimiert (2 bis 3 Minuten). Zur Infektionsvermeidung soll die Einstichstelle durch ein Pflaster abgedeckt werden.

Nach der Blutentnahme werden die Kanülen AUF KEINEN FALL in die Hülsen zurückgesteckt. Dieses Zurückstecken bzw. *recapping* stellt eine häufige Ursache für Arbeitsunfälle im medizinischen Sektor dar und sollte grundsätzlich vermieden werden. Die Spritze wird direkt in die dafür vorgesehenen Abfallbehältnisse abgeworfen. Die gefüllten Röhrchen bitte mit Namen beschriften und in die dafür vorgesehenen Gestelle stellen. Die Handschuhe, Tupfer etc. in die vorgesehenen Abfalleimer werfen.

Hintergrund der Versuche:

In der aktuellen Virusdiagnostik werden die meisten humanpathogenen Viren über PCR- und ELISA-basierte Verfahren diagnostiziert. Diese Verfahren sind bezüglich ihrer Geschwindigkeit, Kosteneffizienz und Automatisierbarkeit nahezu konkurrenzlos, können aber nur bekannte Erreger identifizieren, da entweder Kenntnisse bezüglich der Sequenz des viralen Genoms (für die Primer und Sonden) oder spezifische Antikörper verfügbar sein müssen. In aller Regel steht dieses Wissen für die meisten klinisch relevanten Viren zur Verfügung. Dementsprechend werden Virusanzuchten in Zellkultur und die Zellkulturmethoden nur noch sporadisch angewendet.

Wenn jedoch neue und noch unbekannte/unbeschriebene Viren auftauchen (z.B. sog. *newly emerging viruses*), können PCR- oder ELISA-basierte Methoden initial nicht durchgeführt

werden. Das Vorhandensein eines Virus kann jedoch über klassische Virusdiagnostik in der Zellkultur untersucht werden.

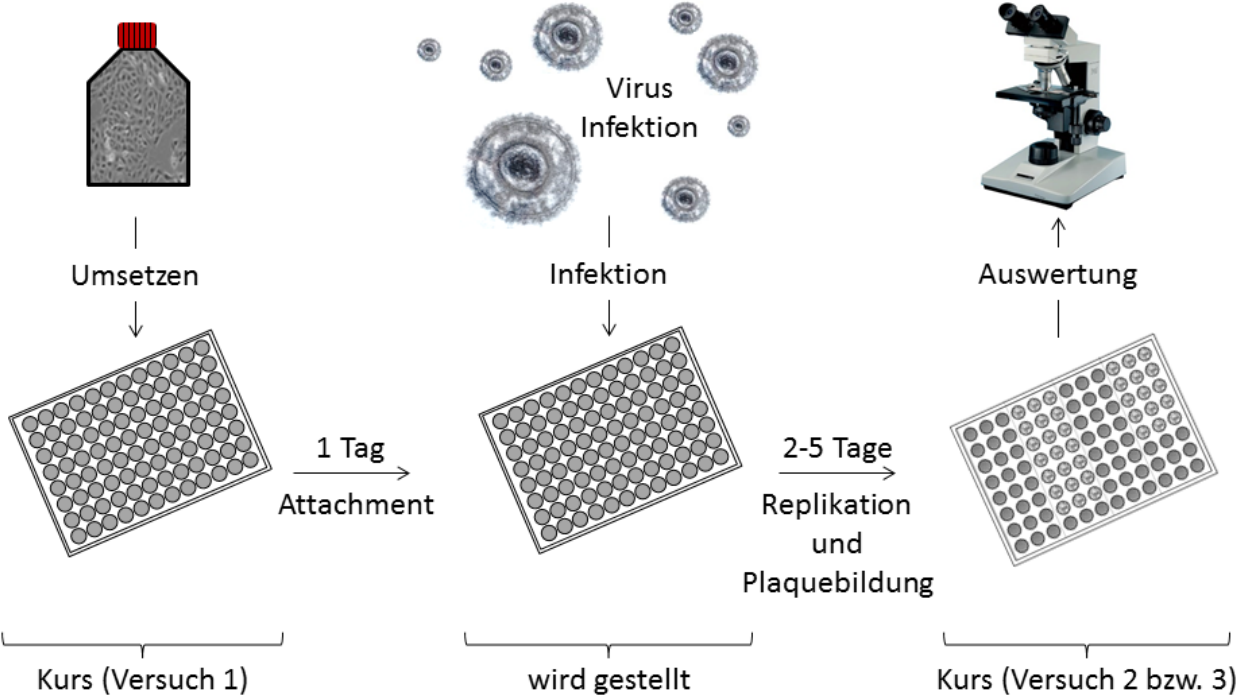
Auch wenn Viren mit noch unbekanntem Therapieresistenzen auftauchen, können Virusanzuchten hilfreich sein, um die Suszeptibilität von Virusisolaten gegenüber antiviralen Wirkstoffen zu untersuchen.

Je nach Virusfamilie haben die viralen Partikel (Virionen) einen Durchmesser von ca. 25 nm (z.B. Picornaviren wie das Poliovirus) bis zu ca. 200 nm (z.B. Herpesviren und Pockenviren). Deshalb können die meisten Virionen nicht (ohne aufwändige Elektronenmikroskope) direkt sichtbar gemacht werden. Da viele Viren jedoch eine infektionsbedingte Veränderung der Zellmorphologie (einen sog. zytopathischen Effekt [CPE] – siehe unten) auslösen, kann das Vorhandensein von Viren indirekt über die Beobachtung von Wirtszellen nachgewiesen werden. Dies ermöglicht es, zytopathische Viren zu identifizieren und durch sequentielle Verdünnungsreihen zu quantifizieren. Außerdem ist die Vermehrung von Viren in Säugerzellkultur ein entscheidender Baustein der virologischen Grundlagenforschung. In Zellkultur werden Viren passagiert und propagiert, ihre Wachstumseigenschaften quantifiziert und ihre Suszeptibilität gegen antivirale Wirkstoffe untersucht.

Für die meisten bekannten Viren stehen heute etablierte Protokolle und Zelllinien für die Virusanzucht zur Verfügung. Für einige Virusfamilien ist die Replikation in definierter Zellkultur jedoch noch nicht geglückt oder kann nur für einzelne Virusstämme erfolgen (z.B. Hepatitis C Virus). Einige Viren (z.B. die Adeno-assoziierten Viren oder das Hepatitis D Virus) benötigen für die Vermehrung zusätzliche Helferviren, die ihnen bestimmte Komponenten zur Verfügung stellen, die sie selbst nicht kodieren.

Wenn die Virusreplikation in der infizierten Zelle weiter fortschreitet, werden infektiöse Viren an das Zellkulturmedium oder direkt an die Nachbarzellen (sog. *cell-to-cell spread*) abgegeben. Die neu gebildeten Viren infizieren präferenziell die Nachbarzellen. Entsprechend breiten sich Viren häufig in konzentrischen Kreisen (sog. Foci) aus. Wenn die infizierten Zellen im Zuge der Replikation lysiert werden, spricht man von einem Plaque. Dabei induzieren unterschiedliche Virusfamilien unterschiedliche Veränderung der Morphologie der infizierten Zellen (siehe Tabelle unten). Die lichtmikroskopisch sichtbare Ausprägung des Virusfocus resp. -plaques lässt zwar den Schluss zu, dass Viren vorhanden sind, aber nur in den aller seltensten Fällen ist eine eindeutige Identifikation des Virus möglich.

ÜBERBLICK



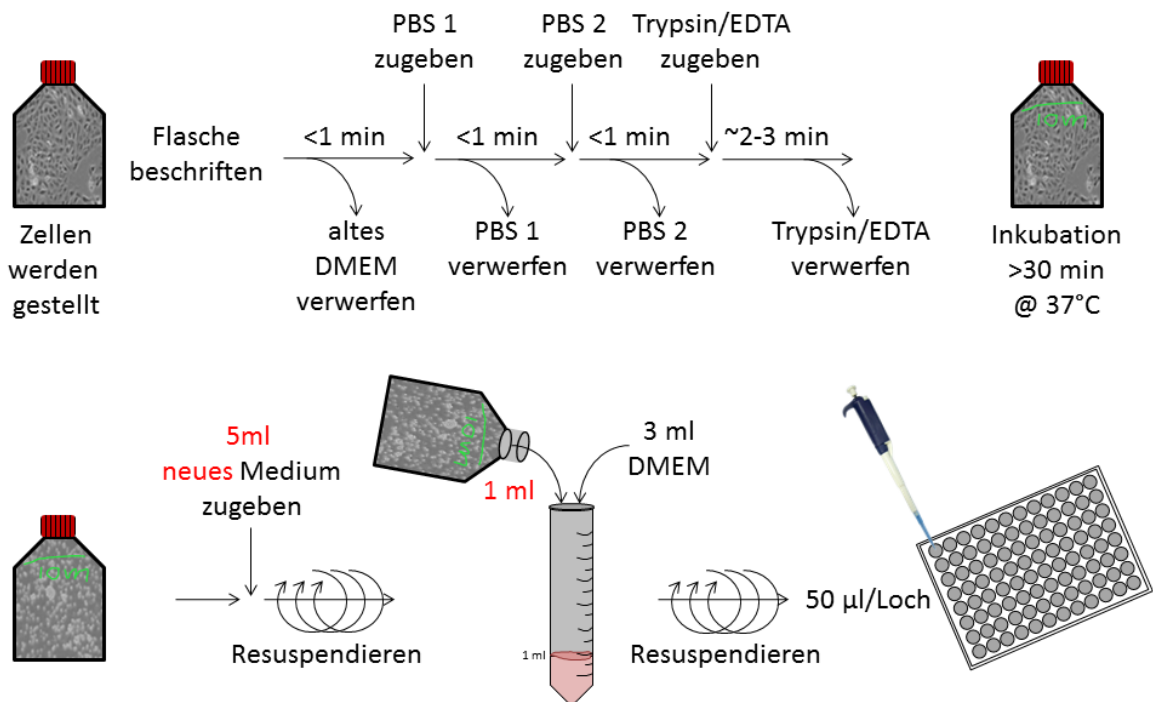
VERSUCH 1: Passage einer permanenten Zellkultur

Prinzip:

Die wiederholten Passagen von Gewebekulturen dienen der Erhaltung und Vermehrung von primären Zellen und Zelllinien.

Allgemein wird sowohl bei der Anlage primärer Zellkulturen (aus Geweben) wie auch beim Passagieren dicht gewachsener subkultivierbarer Zellen folgendermaßen vorgegangen: Der Zellverband wird durch EDTA-Trypsin-Behandlung in Einzelzellsuspensionen separiert. Da zweiwertig positiv-geladene Ionen (Ca^{2+} , Mg^{2+}) eine große Bedeutung für die Kohärenz von Zellen untereinander und die Adhärenz von Zellen an das Zellkulturgefäß haben, dient als Waschflüssigkeit für das Trypsin eine phosphatgepufferte isotonische Salzlösung ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} . Das Trypsin führt zu einer proteolytischen Spaltung von zellulären Oberflächenproteinen, mit denen die Zellen an dem Zellkulturgefäß adhären. Außerdem entzieht der Chelator EDTA den Zellen bzw. deren Oberflächenstrukturen die zweiwertigen Ionen. Die Zellen runden sich ab und können durch LEICHTE Schläge gegen die Flasche vom Boden der Flasche befreit werden.

Die Einzelzellsuspensionen werden in geeigneter Verdünnung auf neue Zellkulturgefäße verteilt, in denen die Zellen wieder zu neuen Monolayern auswachsen.



Material:

Konfluente Vero-Zellkulturen (Fibroblasten-Zellen) in Zellkultur-Flaschen

PBS = phosphatgepufferte Salzlösung

Trypsin-EDTA

FKS = foetales Kälberserum

D-MEM = Dulbecco's minimal essential medium

Neue Zellkulturplatte 96 Loch (innen steril!)

Versuchsdurchführung:

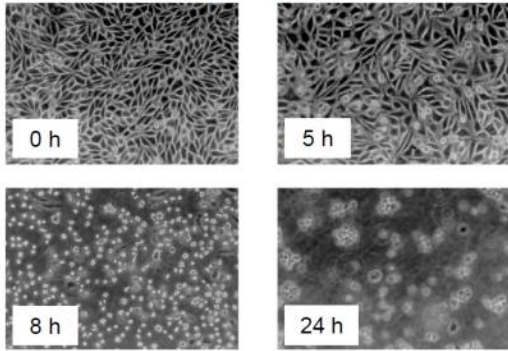
Absolut steril arbeiten: Insbesondere Öffnungen von Flaschen nicht berühren!

1. Mikroskopische Kontrolle des Zellrasens.
2. Abgießen des Mediums in die bereitgestellten Kunststoffbeutel, **nicht** direkt in die Waschbecken.
3. Bedecken des Zellrasens mit PBS. Flasche schwenken, damit alle Zellen mit PBS in Berührung kommen. Verwendetes PBS in die bereitgestellten Kunststoffbeutel abgießen.
4. Trypsin-EDTA auf die Zellen geben und den Zellrasen mehrfach durch Schwenken der Flasche mit der Trypsin-EDTA Lösung überspülen. Anschließend die Trypsin-EDTA-Lösung abgießen und verwerfen. Die Flasche mit dem Zellrasen bei Raumtemperatur stehenlassen, bis sich die Zellen abrunden und anschließend von dem Flaschenboden lösen lassen. Das Ablösen kann notfalls durch Inkubation bei 37° C beschleunigt werden.
5. Die Zellen in 5 ml neuem Medium vorsichtig resuspendieren und anschließend ca. 1 ml des Volumens in einem 15 ml Falcon mit 3 ml Medium verdünnen. Von dieser Zellsuspension werden 50 µl pro Loch in die 96-Lochplatte überführt.
6. Inkubation bei 37°C in den jeweils dafür vorgesehenen Inkubatoren (bis zur nächsten Kursstunde).

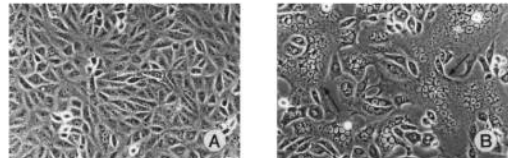
SEMINAR: Mikroskopische Veränderungen von Zellen durch Virusinfektionen

In einem Seminar werden die Grundlagen der Virusvermehrung und übliche mikroskopischen Veränderungen, die durch Virusinfektionen induziert werden, besprochen. Die folgende Übersicht zeigt exemplarisch einige zytopathische Effekte:

Polio Virus



mock HSV-1



Rous Sarcoma Retrovirus Foci

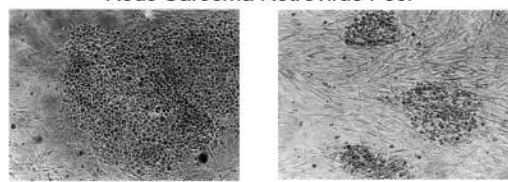


Table 2.1 Some examples of cytopathic effects of viral infection of animal cells

Cytopathic effect(s)	Virus(es)
Morphological alterations	
Nuclear shrinking (pyknosis), proliferation of membrane	Picornaviruses
Proliferation of nuclear membrane	Alphaviruses, herpesviruses
Vacuoles in cytoplasm	Polyomaviruses
Syncytia (cell fusion)	Paramyxoviruses, coronaviruses
Margination and breaking of chromosomes	Herpesviruses
Rounding up and detachment of cultured cells	Herpesviruses, rhabdoviruses, adenoviruses, picornaviruses
Inclusion bodies	
Virions in nucleus	Adenovirus
Virions in the cytoplasm (Negri bodies)	Rabies virus
"Factories" in the cytoplasm (Guarnieri bodies)	Poxviruses
Clumps of ribosomes in virions	Arenaviruses
Clumps of chromatin in nucleus	Herpesviruses

Cinatl J et al. 1997: Antiviral Research; 33(3) pp165-75
Principles of Virology, Eds Flint et al., ASM Press 2003

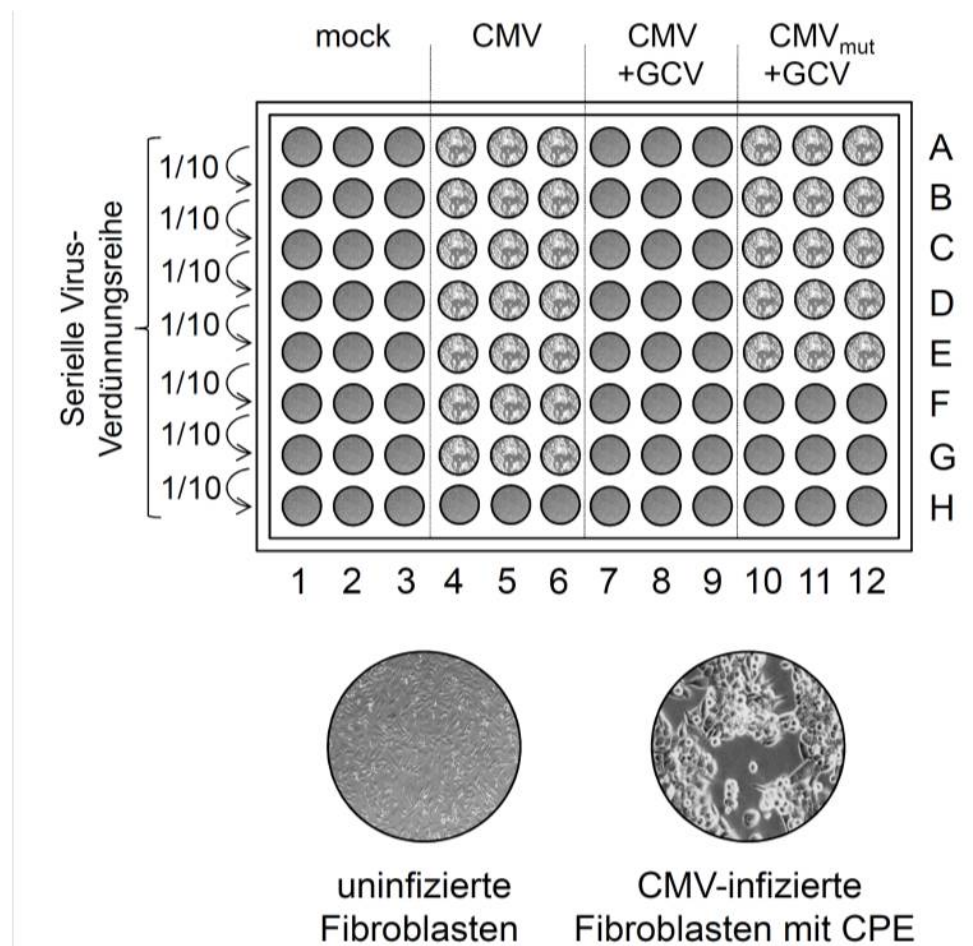
VERSUCH 2: Virustitration

In Zellkultur kann durch eine definierte sequentielle Verdünnung einer Virussuspension der initiale Virustiter zurückgerechnet werden. Die Veränderung der Zellmorphologie durch das Virus und deren zeitliche Entwicklung können dabei Hinweise auf die Art der Infektion geben. Durch den Einsatz von antiviralen Wirkstoffen können mögliche Therapieoptionen getestet werden, außerdem kann die Suszeptibilität eines unbekanntes Virus gegenüber einer antiviralen Substanz auch einen weiteren Hinweis auf die Art der Infektion liefern.

In dem Versuch sollen die Kursteilnehmer deshalb Fibroblasten und virusinfizierte Zellen mikroskopieren. Dafür wird jedem Kursteilnehmer eine 96-Lochplatte zur Verfügung gestellt, deren (uninfizierten) Zellkulturlöcher konfluent bewachsen sind. Einige Reihen sind mit sequenziellen Virusverdünnungen des Zytomegalievirus (CMV) infiziert worden (siehe

schematische Abbildung unten). Da virologische Testverfahren auf Grund der hohen Viruskonzentrationen (häufig $>10^7$ Viren je ml) oft recht hohe Fehlerspannweiten aufweisen können, wurden pro Kondition drei identische Replikate ($n=3$) angelegt.

In den ersten drei Reihen sind uninfilzierte („mock-infizierte“) Zellen zu sehen. In den Reihen 4-6 ist eine sequenzielle Verdünnung von CMV auf die Zellen gegeben worden. Dies erlaubt es den Kursteilnehmern, die Virusreplikation in verschiedenen fortschreitenden Stadien zu beobachten. In den Reihen 7-9 wurde die gleiche Virusmenge ausverdünnt. Die Zellen wurden jedoch mit dem antiviralen Wirkstoff Ganciclovir (GCV; einem Nucleosidanalagon) behandelt, der die Replikation von CMV nachhaltig unterbindet (Wie?). In den letzten drei Reihen wurde nicht das wt-CMV ausverdünnt, sondern ein CMV mit einer Mutation, die es dem Virus ermöglicht, trotz der Anwesenheit des antiviralen Wirkstoffs zu replizieren. (Welche viralen Gene könnten hier betroffen sein? Warum?)



Zählen Sie bitte die viralen Plaques in der Verdünnung, in der <35 (aber >5) Plaques zu sehen sind. Bitte geben Sie den mittleren Virustiter der initialen Virussuspension an. Gehen Sie dabei davon aus, dass das erste Loch ein Volumen von 100 μ l enthält.

VERSUCH 3: Auswertung eines Neutralisationstests

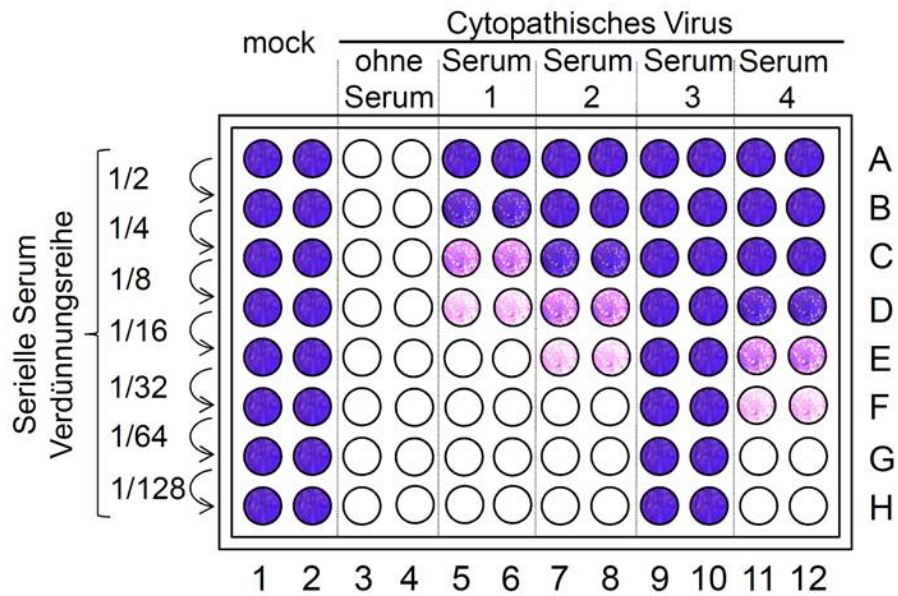
Ein immunologisches Merkmal, das häufig für die Virusdiagnostik herangezogen wird, ist die Ausbildung von virusspezifischen Antikörpern. Dabei ist das Vorhandensein von spezifischen Antikörpern ein eindeutiges Indiz für eine vorangegangene Exposition resp. Infektion. Bei latenten Viren (z.B. HSV-1) ist es außerdem ein Hinweis auf das Vorhandensein von replikationskompetentem Virus.

Ein Teil der virusbindenden Antikörper hat die Fähigkeit, durch die Bindung an virale Proteine, die das virale Eindringen in die Wirtszelle (das sog. *entry*) katalysieren, die Infektion direkt zu verhindern. Man spricht von sog. neutralisierenden Antikörpern. Neutralisierende Antikörper stellen bei vielen viralen Erkrankungen wichtige Korrelate (bzw. die Ursache) einer effektiven Protektion durch das Immunsystem dar.

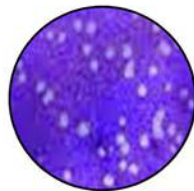
Prinzip:

Zur Ermittlung des Titers neutralisierender Antikörper wird eine definierte Virusmenge einer sequentiellen Serumverdünnungsreihe (2-fach Verdünnungsschritte) ausgesetzt. Anschließend erfolgt ein Vergleich der Virusmenge in An- bzw. Abwesenheit der jeweiligen Serumkonzentration. Wenn neutralisierende Antikörper im Serum vorhanden sind, sinkt die Infektionsdosis mit zunehmender Serumkonzentration. Sind keine neutralisierenden Antikörper gebildet worden, ändert sich die Virusmenge durch das Serum nicht. Je mehr neutralisierende Antikörper ein Donor bildet, desto höhere Verdünnungen seines/ihrer Serums zeigen einen antiviralen Effekt.

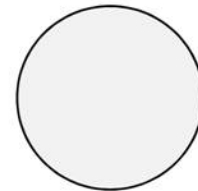
In der folgenden Abbildung ist schematisch ein Neutralisationstest auf einer 96-Lochplatte dargestellt.



Uninfizierte Fibroblasten



Individuelle Virus Plaques



Komplette Lyse aller Zellen

Auswertung des Virus-Neutralisationstests:

Eine vorbereitete 96-Loch-Mikrotiterplatte liegt zur Ablesung an den Arbeitsplätzen bereit. Uninfizierte Zellen in den einzelnen Vertiefungen der Platte sind zur Erleichterung der Auswertung mit Kristallviolett gegengefärbt worden. Ein unzerstörter, noch konfluenter Zellrasen stellt sich einheitlich blau resp. violett dar. Bei hohen Virusdosen sind die meisten Zellen jedoch von dem Virus lysiert worden und/oder haben sich von Zellkulturgefäß abgelöst. Entsprechend ist keine Färbung sichtbar. Bei niedrigeren Virusdosen haben sich Plaques gebildet. Große Plaques können grob-optisch visualisiert werden, während sich für das Auffinden von kleineren Plaques eine mikroskopische Auswertung empfiehlt.

Bitte bewerten Sie das Vorhandensein von neutralisierenden Antikörpern in den einzelnen Seren, geben Sie den jeweiligen Neutralisationstiter an, bei dem noch eine nachweisliche Wirkung des Serums zu erkennen ist (z.B. „1/8“) und vergleichen Sie die Stärke der Neutralisation.

Protokollieren Sie die Ergebnisse in der nachfolgenden Tabelle (komplette Zelllyse ++; einzelne Plaques vorhanden: +; kein Virus festzustellen: -) und geben Sie für die vier Seren die jeweils vorliegenden Neutralisations-Titer an.

Verdünnung	mock	Virus	Serum 1	Serum 2	Serum 3	Serum 4
1/2						
1/4						
1/8						
1/16						
1/32						
1/64						
1/128						
1/256						

Titer Patient 1: _____

Titer Patient 2: _____

Titer Patient 3: _____

Titer Patient 4: _____

Versuch 1:

Enzymimmunoassay zum Nachweis von Anti-HBs Antikörpern

Das HBsAg ist ein Bestandteil des Hepatitis B Virus und ein Marker für das Vorliegen einer HBV Infektion. Antikörper gegen das HBsAg (Anti-HBs) schützen vor einer HBV-Infektion und dienen als Nachweis einer erfolgreichen Schutzimpfung oder einer abgelaufenen HBV Infektion. In diesem Versuch soll der Impfstatus von zwei Patienten sowie von den eigenen Seren ermittelt werden.

Prinzip: Antigen-Sandwich ELISA

Beim Enzygnost Anti-HBs Test werden Mikrotiterplatten verwendet, welche mit dem HBsAg als Antigen beschichtet sind. Im ersten Schritt wird die Serumprobe in der Mikrotiterplatte mit einem Konjugat gemischt, welches Enzym-gekoppeltes HBsAg enthält. Während der ersten Inkubationsphase binden die Patientenantikörper aufgrund ihrer bivalenten Struktur sowohl an das lösliche, Enzym-gekoppelte HBsAg wie auch an das HBsAg an der Platte (Antigen-Sandwich-ELISA). In Serumproben die keine Antikörper gegen das HBsAg enthalten kann das Enzym-gekoppelte HBsAg nicht an die Platte binden. Nach dem Auswaschen des ungebundenen Materials kann die Enzymaktivität durch Zugabe eines Substrates nachgewiesen werden. In Anti-HBs haltigen Vertiefungen bildet sich eine Blaufärbung die direkt proportional zur Anti-HBs Konzentration ist.

Material pro Gruppe (2 Studenten)

- Patientenserum von **zwei Patienten** mit unklarem Impfstatus.
 - o Patient 1
 - o Patient 2
- Eigene Seren
- Positivkontrolle
- Negativkontrolle
- 1 Mikrotiterstreifen in einem Rahmen
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterstreifen
- Röhrrchen mit Anti-HBs Konjugat
- Röhrrchen mit Chromogenlösung (Substrat, beim Kursleiter)

Versuchanordnung und Durchführung:

- In alle Vertiefungen (Well) 25 µl Anti-HBs Konjugat pipettieren
- In jedes Well mit jeweils frischer Spitze 100 µl Probe pipettieren
 - o 100 µl der Positivkontrolle in Well A1
 - o 100 µl der Negativkontrolle in Well B1
 - o 100 µl des Patientenserum 1 in Well C1
 - o 100 µl des Patientenserum 2 in Well D1
 - o 100 µl des eigenen Serums in Wells E1, F1
 - o 100 µl des eigenen Serums in Wells G1, H1
- Platte mit Folie abkleben und mit Namen beschriften
- Platte von allen Seiten 10 sec beklopfen
- Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur (RT)
- Mikrotiterstreifen 4x mit automatischem Waschgerät waschen
- Chromogenlösung beim Kursleiter abholen
- In jedes Well 100 µl Chromogenlösung pipettieren
- Abgedeckt für 20 min bei Raumtemperatur inkubieren
- Auswertung:

blau	Anti-HBs positiv
nicht blau	Anti-HBs negativ

Qualitätskontrolle und Auswertung:

1. positive Kontrolle ist positiv (blau)
2. negative Kontrolle ist negativ (nicht blau)

Falls die 1. und 2. Bedingung erfüllt sind, dürfen die Patientenserum ausgewertet werden.

Ergebnisse:

Patientenserum 1:

Patientenserum 2:

Eigenes Serum 1:

Eigenes Serum 2:

VERSUCH 2:

Western-Blot als Bestätigungstest für den ELISA

Der sogenannte Western-Blot dient zur Bestätigung eines positiven Antikörpersuchtests im ELISA. Bestätigungstests sind bei der Diagnose einer HIV-Infektion vom Gesetzgeber vorgeschrieben. Ziel ist es, falsch positive Resultate aus einem ELISA Suchtest zu erkennen und dadurch eine Fehldiagnose „HIV positiv“ zu verhindern. Western-Blots werden auch für die Differenzialdiagnostik bei Herpesvirusinfektionen verwendet um zwischen Primärinfektionen, abgelaufenen Infektionen und Reaktivierungen differenzieren zu können. In unserem Praktikum wird ein EBV-Blot mit Patientenserum gemacht.

Prinzip:

Der Western-Blot ist ganz allgemein eine Protein-chemische immunologische Methode, mit der Antikörper gegen bestimmte Proteine nachgewiesen werden können.

Ursprünglich wurden für den Western-Blot Viren aus Zellkulturen in die einzelnen Virusproteine zerlegt und diese anschließend über ein Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Dabei werden die einzelnen Virusproteine entsprechend ihrem Molekulargewichts im elektrischen Feld aufgetrennt. Anschließend wurden die im Polyacrylamid-Gel getrennten Virusproteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (Blotting). Diese Membran wird in Streifen geschnitten und jeder Streifen kann nun mit einem Patientenserum inkubiert werden, um vorhandene Antikörper gegen einzelne Virusproteine entsprechend dem ELISA-Verfahren als Bande darzustellen.

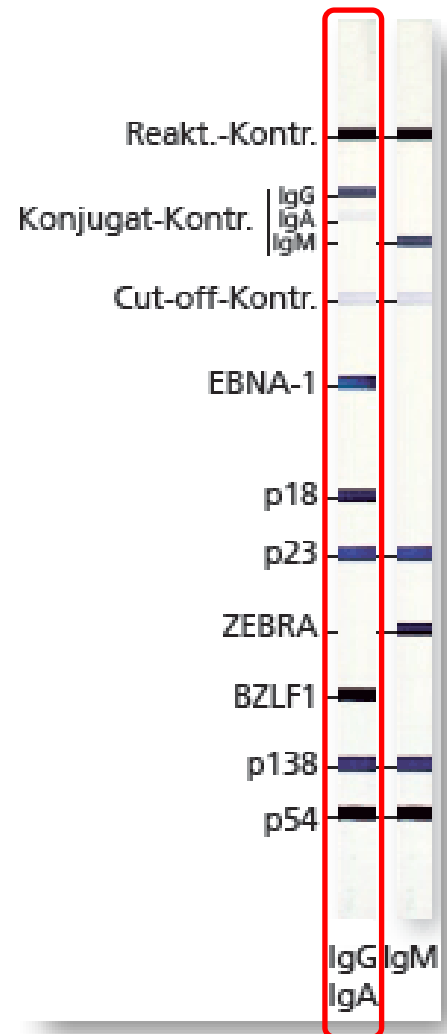
Bei modernen Western-Blots werden rekombinant hergestellte Virusproteine direkt an bestimmten Stellen auf die Nitrocellulosemembran aufgebracht, wodurch eine bessere Reproduzierbarkeit erreicht wird.

Der gesamte Western-Blot lässt sich folgendermaßen unterteilen

- **Inkubation:** ein Teststreifen wird mit Patientenserum inkubiert.
- **waschen**
- **Inkubation:** gebundene Patientenantikörper werden mit einem Peroxidase-konjugierten anti-human-IgG-Antikörper nachgewiesen
- **waschen**
- **Farbreaktion:** durch die Peroxidase wird ein zugesetztes Substrat zu einem nicht-löslichen, blauen Produkt umgesetzt

In unserem Versuch wird ein Western-Blot zur Differenzialdiagnostik einer Epstein-Barr-Virus (EBV)-Infektion durchgeführt.

EBV, ein ubiquitär vorkommendes Virus aus der Herpesvirusfamilie, kann bei Primärinfektion zum Krankheitsbild der infektiösen Mononukleose (Pfeiffersches Drüsenfieber) führen. Aufgrund der lebenslangen Persistenz des Virus können insbesondere bei immunsupprimierten Patienten Reaktivierungen auftreten. Die Routinediagnostik muss zwischen Primärinfektionen, abgelaufenen Infektionen und Reaktivierungen differenzieren können. Dies ist mit serologischen Methoden eingeschränkt möglich. Der Immunoblot stellt eine geeignete Methode zur Differenzialdiagnostik dar. Der recomLine EBV IgG/IgM/IgA Immunoblot (Firma Mikrogen) besteht aus Nitrozellulose-Streifen mit aufgesprühten einzelnen Antigenen, die für die Differenzialdiagnose der verschiedenen Stadien der EBV-Infektion wichtig sind.



Versuch:

Im Kurs werden Sie in Gruppen zu viert je einen EBV-Immunoblot mit Patientenserum inkubieren und den Nachweis von EBV-spezifischen IgG-Banden führen. Es werden 2 verschiedene Seren im Kurs untersucht. Bitte schauen Sie sich bei Ihren Kollegen die anderen Ergebnisse an!

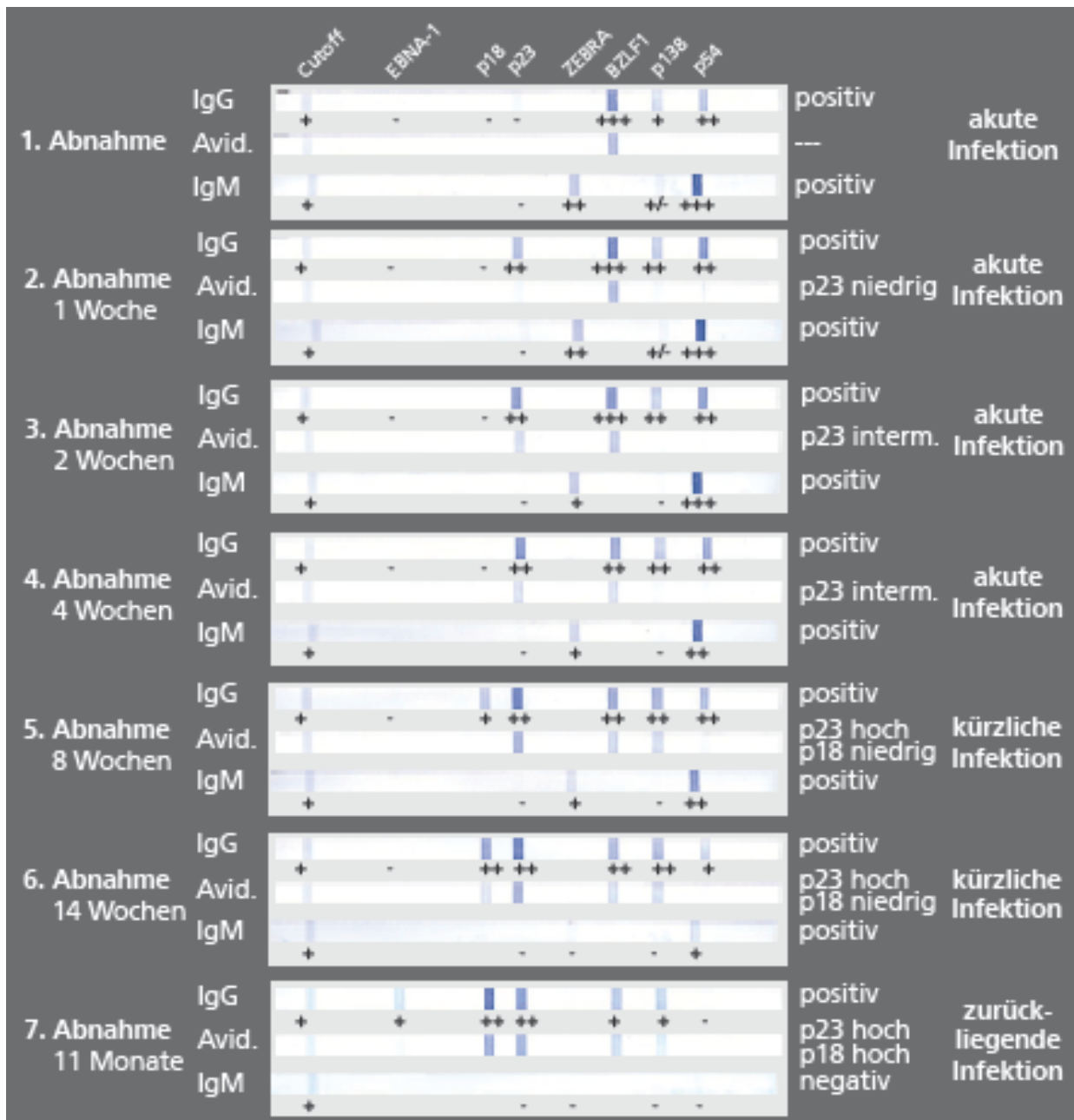
Material pro Gruppe (4 Studenten):

- 1 EBV-Immunoblot-Streifen in einer Inkubationsschale mit 2 ml Waschpuffer
- Serumprobe (1 oder 2) in einem Eppendorfcup **[Nummer notieren]**
- Röhrchen mit Konjugatlösung (anti-human HRP)
- 6 Röhrchen mit je 2 ml Waschlösung
- Röhrchen mit Chromogenlösung (beim Kursleiter)
- Pinzette und saugfähiges Papier
- Schematische Darstellung eines Teststreifens als Auswertehilfe

Versuchanordnung und Durchführung:

- In die Vertiefungen mit dem EBV-Immunoblot-Streifen 25 µl Patientenserum geben (Patientennummer notieren)
- Inkubationsschale abdecken und unter leichtem Schwenken (im Kurs ca. alle 5 min per Hand) 45 min bei Raumtemperatur inkubieren
- Reaktionslösung in den Müllsack abkippen
- Immunoblot-Streifen 3x mit 2 ml Waschpuffer waschen
- Waschpuffer vollständig abkippen
- 2 ml der Konjugatlösung (Anti-Human-HRP) zum Immunoblot-Streifen geben
- 20 min unter gelegentlichem leichtem Schwenken inkubieren
- Immunoblot-Streifen 3x mit 2 ml Waschpuffer waschen
- 2 ml der Chromogenlösung zum Immunoblot-Streifen geben (beim Kursleiter abholen)
- 5 min unter leichtem Schwenken inkubieren. Sie können zügig die Anfärbung der Banden beobachten
- EBV-Immunoblot-Streifen vorsichtig mit einer Pinzette aus der Inkubationswanne nehmen und zum Trocknen auf Papier legen
- Qualitätskontrolle:
 - Reaktionskontrolle: zeigt an, ob die Chromogenlösung funktioniert hat
 - Konjugatkontrolle: zeigt an, ob das Konjugat funktioniert hat.
 - Cutoff: unspezifisches Protein; nur Banden die stärker sind als die Cutoff-Kontrolle sind als positiv zu werten

Falls die Reaktionskontrolle und die Konjugatkontrolle positiv sind, darf die Patientenprobe ausgewertet werden.



Interpretation

Bitte nehmen Sie zum EBV-Infektionstatus **beider** im Kurs untersuchten Patientenseren Stellung:

Patient 1:

Patient 2:

Impfkurs

Bitte bringen Sie Ihren Impfausweis mit!

Sie bekommen in 2 Gruppen die Möglichkeit, sich über Ihren Impfstatus zu informieren und sich gegenseitig ggf. nachzuimpfen.

Zur Vorbereitung auf den Kurs bitten wir Sie, sich die aktuellen STIKO (Ständige Impfkommision)-Empfehlungen auf der Homepage des RKI (Robert-Koch-Instituts) anzuschauen.

https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2019/Ausgaben/34_19.pdf?__blob=publicationFile

Besprechung von Kasuistiken:HIV

- Diagnostik
- Maßnahmen nach Exposition mit HIV
- Postexpositionsprophylaxe
- Therapie
- Resistenz-Testung

Skript zu HIV online verfügbar unter: <http://www.uni-due.de/virologie/>

KURSTAG 4 - Kasuistiken

Besprechung von Kasuistiken zu folgenden Themenbereichen:

- Hepatitis
- CMV unter Immunsuppression
- Gastroenteritis

An diesem Kurstag werden wir gemeinsam mit Ihnen in 2-3 Gruppen die unterschiedlichen Thematiken anhand von Fallbeispielen gemeinsam erarbeiten. Sie lernen außerdem unseren Einsendeschein kennen. Zur Vorbereitung können Sie sich die Inhalte der korrespondierenden Vorlesungsfolien noch einmal anschauen.