

VIROLOGISCHE PRAXIS

HERAUSGEBER

GÜNTER STARKE

VEB GUSTAV FISCHER VERLAG JENA

Virologische Praxis

Bearbeitet von

R. L. NAUMANN, B. NÖBEL, I. SIEBELIST, G. STARKE

Herausgegeben von

Günter Starke

Institut für Serum- und Impfstoffprüfung, Berlin

Mit 37 zum Teil farbigen Abbildungen,

6 Schemata und 36 Tabellen im Text



VEB Gustav Fischer Verlag Jena • 1965

ES 17 Q

Alle Rechte vorbehalten

Printed in the German Democratic Republic

Copyright 1965 by VEB Gustav Fischer Verlag, Jena

Lizenznummer 261 215/33/64

Satz und Druck: VEB Druckerei „Magnus Poser“ Jena

Einband: Großbuchbinderei Raumer & Braun, Leipzig

Gesetzt aus 9 Punkt Mediaeval

Inhaltsverzeichnis

1.	Richtlinien für die Einrichtung einer virologischen Abteilung und wichtige Voraussetzungen für einen störungsfreien Arbeitsablauf	21
1.1	Struktur und Einrichtung einer virologischen Abteilung	21
1.1.1.	Aufgaben der einzelnen Arbeitsgruppen und wissenschaftlichen Kader	22
1.1.2.	Räumliche Voraussetzungen	22
1.1.2.1.	Umkleideräume und Schleusen zu den Arbeitsräumen	23
1.1.2.2.	Laboratorien, Spülküche, Desinfektionskeller und Sonderräume	23
1.1.2.3.	Zweckmäßige Einrichtung mit Mobiliar	24
1.1.3.	Grundausrüstung mit Geräten	24
1.1.4.	Chemikalien	27
1.1.5.	Glasgeräte	28
1.1.6.	Arbeitsschutzkleidung	28
1.2	Spülküche	30
1.2.1.	Wasseraufbereitung	30
1.2.2.	Reinigung von Glas, Gummimaterial und deren Sterilisation	33
1.2.2.1.	Flaschen, Kolben und Röhrchen	33
1.2.2.2.	Pipetten	34
1.2.2.3.	Spritzen	34
1.2.2.4.	Geräte zur Sterilfiltration	34
1.2.2.5.	Gummimaterial	35
1.2.3.	Sonstige Hilfsarbeiten und Hinweise	36
1.3.	Biochemisches Laboratorium	37
1.4.	Herstellung von gebräuchlichen Medien und Salzlösungen für virologische Arbeiten	37
1.4.1.	Medium nach Eagle	38
1.4.2.	Medium nach Parker oder Medium 199 (Modifikation)	39
1.4.3.	Hydrolysatmedien mit Hankslösung	40
1.4.4.	Fertigmedien	40
1.4.5.	Eignungsprüfung von Medien und Aminosäuren	40

1.4.6.	Serumgewinnung und -aufbereitung	41
1.4.7.	Lösungen für die Herstellung von Zellsuspensionen	42
1.4.7.1.	Trypsinlösung	42
1.4.7.2.	Chelaplex-III-Lösung	43
1.4.8.	Salzlösungen	43
1.4.8.1.	Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	43
1.4.8.2.	Salzlösung nach Earle	43
1.4.8.3.	Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung	44
1.4.8.4.	Lösungen zur Einstellung des pH-Wertes	44
1.4.8.5.	Natriumzitratlösung	44
1.4.8.6.	Physiologische Kochsalzlösung	44
1.4.8.7.	Antibiotikalösungen	44
1.4.9.	Stammlösungen	44
1.5.	Aufbewahrung von Viren	45
1.6.	Desinfektion in der Virusabteilung	46
2.	Zellkultur	49
2.1	Zellzuchttechnik der „Monolayer“-Kultur	49
2.1.1.	Historische Entwicklung	49
2.1.2.	Technische Ausrüstung eines Zellzuchtlaboratoriums	49
2.1.3.	Definition und Charakteristik von Primär- und transformierten (permanenten) Zellkulturen	51
2.1.3.1.	Primärkulturen (Frischzellen)	51
2.1.3.2.	Permanente Zellkulturen	52
2.1.3.2.1.	Charakteristische Eigenschaften	52
2.1.3.3.	Zellklone	52
2.1.3.3.1.	Nomenklatur von Zellstämmen	53
2.1.4.	Herstellung von Frischzellkulturen	53
2.1.4.1.	Vorbedingungen und vorbereitende Arbeiten	53
2.1.4.2.	Organentnahme (Niere)	57
2.1.4.3.	Präparation und Weiterbehandlung der Niere	57
2.1.4.4.	Proteolytische Aufspaltung	57
2.1.4.4.1.	Kurzzeittrypsination bei 37 °C	58
2.1.4.4.2.	Langzeittrypsination bei 4 °C	59
2.1.4.4.3.	Trypsination im geschlossenen System	59
2.1.4.5.	Trypsination von Amnion	59
2.1.4.6.	Weiterbehandlung trypsinierter Frischzellen und Kulturansatz	60
2.1.5.	Ansatz einer Zellkultur (Arbeitsgang bei Subkulturen)	61
2.1.5.1.	Vorbereitungsarbeiten	61
2.1.5.2.	Ablösen der Zellkultur und Resuspension	61
2.1.5.3.	Berechnung der Zellzahl	63
2.1.5.3.1.	Vermehrungsrate und Zelleinsaatmenge	66
2.1.5.4.	Mediumvorbereitung	66
2.1.5.5.	Weitere Versorgung des Kulturansatzes und Wachstumsphasen	67
2.1.5.6.	Bedingungen zur Anlage einer Subkultur	68

2.1.6.	Zellkonservierung	71
2.1.6.1.	Kulturhaltung bei reduzierten Temperaturen	71
2.1.6.2.	Zellkonservierung im gefrorenen Zustand	71
2.1.7.	Zelltransport	72
2.2.	Virologische Arbeiten mit Zellkulturen	73
2.2.1.	Anpassung des Virus an die Zellkultur	73
2.2.1.1.	Technik der Anzüchtung von Viren	74
2.2.1.1.1.	Gewinnung des Materials für den Virusnachweis	74
2.2.1.1.2.	Aufbereitung des Materials	76
2.2.1.1.3.	Verimpfung des virushaltigen Materials	76
2.2.1.1.4.	Inkubation	78
2.2.2.	Beurteilung der Virusisolierung	78
2.2.2.1.	Eignung und Wahl der Zellkultur	78
2.2.2.2.	Erkennung eines Virus auf der Zellkultur	79
2.2.2.2.1.	Zytopathogener Effekt	79
2.2.2.2.2.	HämadSORPTION	84
2.2.2.2.3.	Blindpassage	84
2.2.3.	Allgemeines zur Virusvermehrung	85
2.2.3.1.	Unterschiedliches Verhalten von Viren	85
2.2.3.1.1.	Unterschiede zwischen attenuierten und Wildviren (am Beispiel der Polioimpfviren)	87
2.2.3.2.	Optimale Virusernte	88
2.2.3.3.	Virusempfindlichkeit einiger Zellkulturen	89
2.2.4.	Virustypisierung	89
2.2.4.1.	Gewinnung von spezifischen Immunsereen	89
2.2.4.1.1.	Rekonvaleszenzserum	90
2.2.4.1.2.	Herstellung von Antisereen tierischer Herkunft	91
2.2.4.2.	Technik der Typisierung	92
2.2.4.2.1.	Einfache Neutralisation	92
2.2.4.2.2.	Kreuzreaktion	94
2.2.4.2.3.	Unspezifische Reaktionsabläufe	95
2.2.5.	Virustitration	95
2.2.5.1.	Definition von Titer- und Infektionsdosis	96
2.2.5.2.	Titrationansatz	97
2.2.5.3.	Bestimmung mit der CPE-Methode	97
2.2.5.3.1.	Technik und Beurteilung	97
2.2.5.3.2.	Berechnung der ID_{50} (nach REED und MUENCH)	98
2.2.5.3.3.	Methode nach Kaerber	100
2.2.5.4.	Colortest	101
2.2.5.5.	HämadSORPTION	102
2.2.5.6.	Plaquetest	103
2.2.6.	Virusneutralisation	106
2.2.6.1.	Definition einer neutralisierenden Einheit	106
2.2.6.2.	Neutralisationsansatz	106
2.2.6.3.	Beurteilung und Berechnung des Neutralisationstestes	107
2.2.6.4.	Neutralisation der HämadSORPTION (IHAD)	110
2.2.6.5.	Neutralisationsindex	110

3.	Virologische Arbeitsmethoden mit dem embryonierten Hühnerei	113
3.1.	Anwendungsbereich des embryonierten Hühnereies in der virologischen Technik	113
3.2.	Technische Ausrüstung eines Virus-Ei-Laboratoriums	113
3.3.	Allgemeine Methodik mit embryonierten Hühnereiern	116
3.3.1.	Darstellung der Entwicklung eines Hühnerembryos	117
3.3.2.	Eivorbereitung	120
3.3.3.	Vorbereitung einer Eiimpfung und Virusernte	121
3.3.3.1.	Aufbau des Arbeitsplatzes für Eiimpfung	121
3.3.3.2.	Vorbereitung der Eier	123
3.3.3.3.	Vorbereitung des Impfmateri als	124
3.3.3.4.	Vorbereitung des Arbeitsplatzes für die Virusernte	124
3.3.4.	Methoden der Eiimpfung	125
3.3.4.1.	Intraallantoidale Impfung	125
3.3.4.2.	Intraamni ale Impfung	126
3.3.4.3.	Impfung auf die Chorioallantoismembran	127
3.3.4.4.	Dottersackimpfung	128
3.3.4.4.1.	Färbung nach Macchiavello	129
3.4.	Spezielle virologische Methoden mit embryonierten Hühnereiern	129
3.4.1.	Virussolierungen	129
3.4.1.1.	Virussolierungen bei Influenza- und Parainfluenza- verdacht	129
3.4.1.2.	Virussolierungen bei Vaccinia-, Variola- oder Herpes- Verdacht	131
3.4.1.2.1.	Verimpfung von Blutproben	131
3.4.1.2.2.	Verimpfung von Bläschen- und Pustelinhalt	131
3.4.1.2.3.	Verimpfung von Schorf	131
3.4.2.	Viruspassage	132
3.4.3.	Infektionstiterbestimmung	132
3.4.4.	Neutralisationstest in ovo	133
3.4.5.	Antigenpräparationen	133
3.4.6.	Technik des exem bryonierten Hühnereies	134
4.	Virusserologie	137
4.1.	Technische Ausrüstung eines serologischen Labo- ratoriums	137
4.2.	Herstellung der wichtigsten biologischen Präpa- rate für virusserologische Arbeiten	138
4.2.1.	Antigene	138
4.2.1.1.	Antigene für den HIT	140
4.2.1.1.1.	Influenza-Antigene	140
4.2.1.1.1.1.	Rohantigen	140
4.2.1.1.1.2.	Dialyse-Antigen	141

4.2.1.1.2.	Mumps-Antigene	141
4.2.1.1.2.1.	Rohantigen	141
4.2.1.1.2.2.	Dialyse-Antigen	141
4.2.1.1.3.	Newcastle disease virus (NDV)-Antigen	141
4.2.1.1.4.	Vaccinia-, Variola-Antigen	142
4.2.1.2.	Antigene für die KBR	142
4.2.1.2.1.	KBR-Rohantigene	142
4.2.1.2.1.1.	Adeno-Antigen	143
4.2.1.2.1.2.	Herpes-simplex-Antigen	143
4.2.1.2.1.3.	Lymphogranuloma venereum (LGV)- und Katzenkratz- krankheit-Antigen	143
4.2.1.2.1.4.	Masern-Antigen	143
4.2.1.2.1.5.	Maul- und Klauenseuche(MKS)-Antigen	144
4.2.1.2.1.6.	Newcastle disease virus (NDV)-Antigen	145
4.2.1.2.1.7.	Ornithose-Antigen	145
4.2.1.2.1.8.	Poliomyelitis-Antigen	145
4.2.1.2.1.9.	Rabies-Antigen	145
4.2.1.2.2.	Gereinigte KBR-Antigene	146
4.2.1.2.2.1.	Coxsackie-Antigen (Ätherextraktion)	146
4.2.1.2.2.2.	Enzephalitis-Antigene (Benzinextraktion)	146
4.2.1.2.2.3.	Influenza-Dialyse-Antigen	147
4.2.1.2.2.4.	Rabies-Antigen (Azeton-Äther-Extraktion)	147
4.2.1.2.3.	S-Antigene	148
4.2.1.2.3.1.	Influenza-S-Antigen	148
4.2.1.2.3.2.	Mumps-S-Antigen	149
4.2.1.2.3.3.	Vaccinia-Variola-S-Antigen	149
4.2.2.	Spezifische Immunsereen	149
4.2.2.1.	Adenserum	150
4.2.2.2.	Coxsackieserum	150
4.2.2.3.	Enzephalitisserum	150
4.2.2.4.	Influenzaseren	150
4.2.2.4.1.	Immunisierung von Ratten mit adjuvansfreiem Antigen	151
4.2.2.4.2.	Immunisierung von Ratten mit Antigen, welches an Freundsches Adjuvans gebunden ist	151
4.2.2.4.3.	Immunisierung von Hühnern	151
4.2.2.4.4.	Immunisierung von Meerschweinchen zur Gewinnung von S-Antikörpern	152
4.2.2.5.	Lymphogranuloma venereum (LGV)-Serum	152
4.2.2.6.	Masernserum	152
4.2.2.7.	Maul- und Klauenseuche-Serum	152
4.2.2.8.	Mumpsserum	153
4.2.2.9.	Newcastle disease-virus (NDV)-Serum	153
4.2.2.10.	Ornithoserum	153
4.2.2.11.	Poliomyelitissereen	153
4.2.2.12.	Rabiesserum	154
4.2.2.13.	Vaccinia-, Variola-Serum	154
4.2.3.	Hämolysin	154

4.2.4.	Komplement	155
4.2.5.	Erythrozytensuspensionen	157
4.2.5.1.	Hämclerythrozyten	157
4.2.5.2.	Hühnererythrozyten	158
4.2.5.3.	Humanerythrozyten der Blutgruppe 0	158
4.2.5.4.	Meerschweinchenerythrozyten	159
4.3.	Reaktionen, die auf der Agglutinierbarkeit von Erythrozyten durch Virusarten beruhen	159
4.3.1.	Hämagglutinationsteste	159
4.3.1.1.	Röhrchentest (visuelle Ablesung)	159
4.3.1.1.1.	Anwendung	159
4.3.1.1.2.	Material	160
4.3.1.1.3.	Reaktionskomponenten	160
4.3.1.1.4.	Durchführung	160
4.3.1.2.	Röhrchentest (photometrische Ablesung)	160
4.3.1.2.1.	Anwendung	160
4.3.1.2.2.	Material	161
4.3.1.2.3.	Reaktionskomponenten	161
4.3.1.2.4.	Durchführung	161
4.3.1.3.	Plattentest	165
4.3.1.3.1.	Anwendung	165
4.3.1.3.2.	Material	165
4.3.1.3.3.	Reaktionskomponenten	165
4.3.1.3.4.	Durchführung	165
4.3.2.	Hämagglutinationshemmungsteste (HIT)	166
4.3.2.1.	Röhrchentest (visuelle Ablesung)	166
4.3.2.1.1.	Anwendung	166
4.3.2.1.2.	Material	166
4.3.2.1.3.	Reaktionskomponenten	166
4.3.2.1.4.	Durchführung	166
4.3.2.1.4.1.	Erster Vorversuch	166
4.3.2.1.4.2.	Zweiter Vorversuch	167
4.3.2.1.4.3.	Vorbereitung der Seren	168
4.3.2.1.4.4.	Hauptversuch	170
4.3.2.2.	Röhrchentest (photometrische Ablesung)	172
4.3.2.2.1.	Anwendung	172
4.3.2.2.2.	Material	172
4.3.2.2.3.	Reaktionskomponenten	172
4.3.2.2.4.	Durchführung	172
4.3.2.3.	Platten- und Mikrohämagglutinationshemmungsteste	175
4.3.2.3.1.	Anwendung	175
4.3.2.3.2.	Material	175
4.3.2.3.3.	Reaktionskomponenten	175
4.3.2.3.4.	Durchführung	175
4.3.2.3.4.1.	Tropfenmethode nach Schubladse und Soloviev	175
4.3.2.3.4.2.	Mikromethode nach Narzissow	176
4.3.2.3.4.3.	Takátsy-Methode	176

4.3.3.	Kältehämagglutination	176
4.3.3.1.	Anwendung	176
4.3.3.2.	Material	176
4.3.3.3.	Reaktionskomponenten	176
4.3.3.4.	Durchführung	177
4.4.	Reaktionen, die auf der Agglutinierbarkeit von Bakterien beruhen	178
4.4.1.	Weil-Felix-Reaktion	178
4.4.1.1.	Anwendung	178
4.4.1.2.	Material	178
4.4.1.3.	Reaktionskomponenten	178
4.4.1.4.	Durchführung	178
4.5.	Reaktionen, die auf der Agglutinierbarkeit von Rickettsien beruhen	179
4.5.1.	Rickettsienagglutination	179
4.5.1.1.	Anwendung	179
4.5.1.2.	Material	179
4.5.1.3.	Reaktionskomponenten	179
4.5.1.4.	Durchführung	179
4.5.1.5.	Färbung nach Giemsa	180
4.6.	Komplementbindungsreaktionen (KBR)	181
4.6.1.	Direkte Komplementbindungsreaktionen	181
4.6.1.1.	Makrokomplementbindungsreaktion	181
4.6.1.1.1.	Anwendung	181
4.6.1.1.2.	Material	181
4.6.1.1.3.	Reaktionskomponenten	182
4.6.1.1.4.	Durchführung	182
4.6.1.1.4.1.	Einstellung der Reaktionskomponenten	182
4.6.1.1.4.1.1.	Salzlösung	182
4.6.1.1.4.1.2.	Hammelerythrozytensuspension	184
4.6.1.1.4.1.3.	Hämolyse	185
4.6.1.1.4.1.4.	Hämolytisches System (HS)	186
4.6.1.1.4.1.5.	Komplement	187
4.6.1.1.4.1.5.1.	Komplementtitration mit Antigen	187
4.6.1.1.4.1.5.2.	4-Röhrchenkomplementkontrolle	187
4.6.1.1.4.1.6.	Antigene	188
4.6.1.1.4.1.7.	Seren	189
4.6.1.1.4.1.8.	Spezifitätsprüfung	189
4.6.1.1.4.2.	Hauptversuch	190
4.6.1.2.	Mikrokomplementbindungsreaktionen (MKBR)	191
4.6.1.2.1.	Anwendung	191
4.6.1.2.2.	Material	191
4.6.1.2.3.	Reaktionskomponenten	191
4.6.1.2.4.	Durchführung	191
4.6.2.	Indirekte Komplementbindungsreaktion (IKBR)	194
4.6.2.1.	Anwendung	194
4.6.2.2.	Material	194

4.6.2.3.	Reaktionskomponenten	194
4.6.2.4.	Durchführung	195
4.6.2.4.1.	Einstellung der Reaktionskomponenten	195
4.6.2.4.2.	Titration der Indikatorantikörperverdünnung	195
4.6.2.4.3.	Hauptversuch	198
5.	Übersichten zur Virusdiagnostik	199
	Gewebsspektrum verschiedener Virusarten (= Tabelle 33)	200
	Eigenschaften respiratorischer Viren (= Tabelle 34)	202
	Typisierung eines isolierten Influenza-Virus (= Tabelle 35)	206
	Serologische Influenza-Diagnose (= Tabelle 36)	206
Register		208

Virologische Praxis

Virologische Praxis

Bearbeitet von

R. L. NAUMANN, B. NÖBEL, I. SIEBELIST, G. STARKE

Herausgegeben von

Günter Starke

Institut für Serum- und Impfstoffprüfung, Berlin

Mit 37 zum Teil farbigen Abbildungen,

6 Schemata und 36 Tabellen im Text



VEB Gustav Fischer Verlag Jena · 1965

ES 17 Q

Alle Rechte vorbehalten

Printed in the German Democratic Republic

Copyright 1965 by VEB Gustav Fischer Verlag, Jena

Lizenznummer 261 215/33/64

Satz und Druck: VEB Druckerei „Magnus Poser“ Jena

Einband: Großbuchbinderei Raumer & Braun, Leipzig

Gesetzt aus 9 Punkt Mediaeval

Mitarbeiterverzeichnis

Dipl.-Biol. ROLF LOTHAR NAUMANN

Wissenschaftlicher Assistent der Virusabteilung

Dipl.-Biol. BARBARA NÖBEL

Wissenschaftliche Assistentin der Virusabteilung

Dipl.-Biol. INGEBORG SIEBELIST

Wissenschaftliche Oberassistentin der Virusabteilung und des
Zentrallaboratoriums für Respiratorische Viren (Grippe-
zentrum der Deutschen Demokratischen Republik)

Dr. med. habil. GÜNTER STARKE

Stellvertretender Institutsdirektor und Leiter der Virus-
abteilung; Leiter des Zentrallaboratoriums für Respiratorische
Viren (Grippezentrum der Deutschen Demokratischen Repu-
blik)

Institut für Serum- und Impfstoffprüfung

Berlin-Pankow, Wollankstraße 16

