



Foto: Wim van Egmond

Karlijn (16) wordt op een dag wakker met keelpijn en het lijkt alsof de klieren in haar hals zijn opgezet. Na een paar dagen is de keelpijn nog niet over, en ze wordt steeds vermoeider. Haar vriendje Mark zegt dat ze beter naar de huisarts kan gaan om te kijken wat er aan de hand is.

Nadat Karlijn heeft uitgelegd waar ze last van heeft, vermoedt de dokter dat ze de ziekte van Pfeiffer heeft. Hij legt uit dat Pfeiffer veroorzaakt wordt door een virus, genaamd EBV (Epstein-Barrvirus), dat je B-cellen en speekselklieren infecteert. Een infectie kan er toe leiden dat je klieren opzetten en dat je snel vermoeid raakt. Het virus wordt vaak overgedragen via speeksel, daarom wordt de ziekte ook wel 'kissing disease' genoemd.

Jij...

...gaat onderzoeken of Karlijn en Mark de ziekte van Pfeiffer hebben. Je krijgt als onderzoeker in het medisch laboratorium bloedmonsters van Karlijn en Mark in handen. Je gaat hun bloed testen op de aanwezigheid van antistoffen tegen EBV. De techniek die je hierbij gebruikt is de ELISA-test.

De ELISA-test

ELISA staat voor **Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay**. Een ELISA gebruikt antistoffen om de aanwezigheid van ziekteverwekkers in je bloed of andere lichaamssappen aan te tonen. Voorbeelden van ziekteverwekkers zijn virussen, bacteriën of parasieten. De aanwezigheid van antistoffen tegen een antigeen is een aanwijzing dat iemand geïnfecteerd is met het virus of de bacterie waar het antigeen toe behoort.

Een ELISA wordt normaalgesproken uitgevoerd in een microtiterplaat. Dat is een plaat die bestaat uit 96 vakjes, de zogenaamde wells, waar verschillende reacties in plaatsvinden. Tijdens dit practicum voer je de ELISA uit in een strip van 12 wells. Er wordt bij elke stap iets toegevoegd aan de wells. Na het toevoegen van alle stofjes krijgen de wells een blauwe kleur als de monsters die erin zitten daadwerkelijk antistoffen tegen EBV (het virus dat Pfeiffer veroorzaakt) bevatten.

Je test naast de monsters van Karlijn en Mark ook een positieve en negatieve controle. Dit zijn monsters waarvan je zeker weet dat ze respectievelijk positief en negatief moeten zijn. Als dat niet het geval is, is er tijdens het practicum iets fout gegaan.

Je voert tijdens de ELISA-test de volgende stappen uit:

Stap 1

Stukjes van het EB-virus, de antigenen, worden in elk van de 12 wells gepipetteerd. Deze plakken dan aan de bodem van de wells.

Stap 2

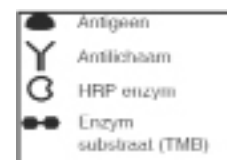
De wells worden schoongemaakt om de antigenen die niet gehecht zijn weg te spoelen. De overtollige antigenen zouden anders ook gaan reageren met de antistoffen die later worden toegevoegd. Op die manier zouden de resultaten onbetrouwbaar worden.

Stap 3

Je pipetteert de monsters van Karlijn en Mark in de daarvoor bestemde wells (bij de 'K' en 'M'). De antistoffen die hierin eventueel aanwezig zijn kunnen hechten aan het antigeen op de bodem van de wells. Je pipetteert daarnaast de positieve en negatieve controle in de overige wells. De positieve controle bestaat uit antistoffen die aan de antigenen binden, de negatieve controle bevat niets. Je maakt de wells weer schoon door **stap 2** te herhalen.

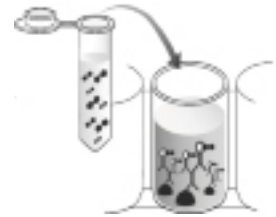
Stap 4

Vervolgens voeg je opnieuw antistoffen toe. Deze antistoffen heten secundaire antistoffen. Zij hechten op hun beurt aan de antistoffen die eventueel in de monsters van Karlijn en Mark aanwezig zijn. Als er geen antistoffen tegen EBV in de monsters aanwezig zijn, kunnen de secundaire antistoffen er ook niet aan hechten, en zullen ze worden weggespoeld. Aan de secundaire antistoffen zit een enzym vast, dat belangrijk is voor stap 5. Volg de schoonmaakstappen van **stap 2** opnieuw, alleen doe je het in dit geval twee keer!



Stap 5

In deze laatste stap voeg je het enzymsubstraat toe aan alle wells. Dit substraat reageert met het enzym aan de secundaire antistoffen. De reactie tussen het enzym en substraat zorgt ervoor dat de vloeistof blauw wordt. Als er geen antistoffen tegen EBV in de monsters van Karlijn en Mark zaten, zal er ook geen kleur ontstaan. Kort gezegd: een blauwe kleur wijst op een besmetting met EBV.



Benodigheden

Voor dit practicum heb je de volgende materialen nodig:

- micropipet die 50 µl kan pipetteren (oefen van te voren met wat wasbuffer)
- een wegwerppipet van 1 ml
- 20 gele pipetpuntjes
- een plastic strip met 12 reactievaatjes (wells)
- EBV-antigenen (groen buisje)
- de verdunde bloedmonsters van Karlijn (K) en Mark (M) (gele buisjes)
- een positieve controle (paars buisje)
- een negatieve controle (blauw buisje)
- een secundaire antistof die bindt aan de eventuele EBV-antistoffen (oranje buisje)
- een substraat dat de aanwezigheid van antistoffen zichtbaar maakt (bruin buisje)
- 75 ml wasbuffer in een maatbeker
- zwarte marker
- stapel keukenpapier

Instructie

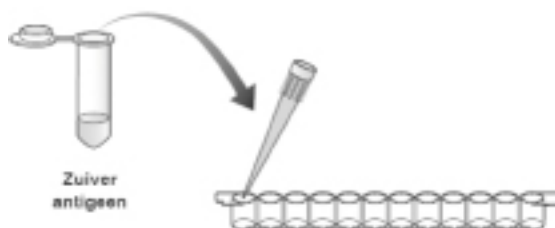
- Label eerst de 12 wells als volgt met een marker:



De + staat voor de positieve controle; de - staat voor de negatieve controle; de K staat voor het monster van Karlijn; de M staat voor het monster van Mark

Stap 1

- Gebruik een pipet om in alle 12 wells 50 µl van het antigeen uit het groene buisje te pipetteren



- Wacht 5 minuten zodat het antigeen zich aan het plastic in de wells kan hechten

Stap 2

- Spoel de ongebonden antigenen uit de wells:
 - Houd je strip ondersteboven boven het keukenpapier zodat de vloeistof uit de wells loopt; klop nog een paar keer voorzichtig op de onderkant
 - Gooi het bovenste stuk keukenpapier weg
 - Gebruik de **wegwerppipet** van 1 ml om elke well met wasbuffer uit de maatbeker te vullen
 - Houd de strip ondersteboven boven het keukenpapier zodat de buffer eruit loopt; klop nog een paar keer voorzichtig op de onderkant
 - Gooi de bovenste 2-3 stukken keukenpapier weg

Stap 3

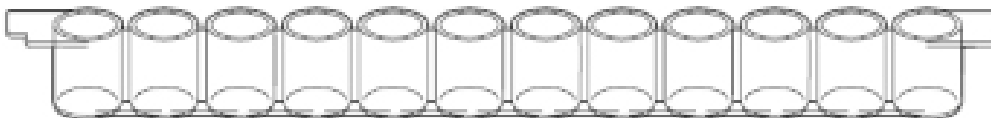
- Gebruik een **nieuw** geel pipetpuntje om 50 µl van de positieve controle-oplossing (+) uit het paarse buisje in de wells met een '+' te pipetteren
- Gebruik een **nieuw** geel pipetpuntje om 50 µl van de negatieve controle-oplossing (-) uit het blauwe buisje in de wells met een '-' te pipetteren
- Pipetteer 50 µl van elk van de monsters van Karlijn en Mark in de daarvoor bestemde wells. Gebruik voor elk monster een **nieuw** pipetpuntje
- Wacht 5 minuten zodat de antistof uit het serum zich aan het antigeen kan hechten
- Spoel het niet-gebonden antistof weg en was de wells zoals je eerder hebt gedaan bij **stap 2**

Stap 4

- Gebruik een **nieuw** geel pipetpuntje om 50 µl van de secundaire antistoffenoplossing uit het oranje buisje in alle wells te pipetteren
- Wacht 5 minuten zodat de antistoffen in de wells aan hun doel kunnen hechten
- Spoel de niet-gebonden antistoffen weg en was de wells zoals je eerder hebt gedaan bij **stap 2** en **herhaal** deze stap nogmaals (dus twee keer wassen!)

Stap 5

- Gebruik een **nieuw** geel pipetpuntje om 50 µl van het enzymsubstraat uit het bruine buisje in alle wells te pipetteren
- Wacht 5 minuten. Observeer en noteer de resultaten.
- Kleur in de figuur hieronder de wells in waar een blauwe kleur is ontstaan.



Alle afbeeldingen zijn afkomstig van Bio-Rad (www.bio-rad.com).

Vragen

1. Hebben Karlijn en/of Mark de ziekte van Pfeiffer?

.....
.....

2. Waarom moet je de wells wassen na elke stap?

.....
.....

3. Waarom gebruik je telkens schone pipetpuntjes voor elke stap?

.....
.....

4. Waarom is elk monster in drievoud getest?

.....
.....

Een zwangerschapstest is eigenlijk ook een ELISA-test. De zwangerschapstest meet de concentratie van het humaan choriongonadotropine (hCG), een hormoon dat enkele dagen na de bevruchting in het bloed en urine van een zwangere vrouw te vinden is.

5. Leg uit hoe een zwangerschapstest werkt.

.....
.....
.....
.....