



**University of  
Zurich** <sup>UZH</sup>

**Institute of Medical Virology**

---

# **Laborkurs Virologie 2024**

# Team Laborkurs Virologie

- PD Dr. Michael Huber
- PD Dr. Guido Bloemberg
- Prof. Silke Stertz
- Dr. Amapola Manrique
- Daniel Frei
- Dr. Merle Schanz
- Wissenschaftliche Mitarbeiter und Doktoranden Institut für Medizinische Virologie (UZH)  
und Klinik für Infektionskrankheiten und Spitalhygiene (USZ)



Universität  
Zürich<sup>UZH</sup>

**USZ** Universitäts  
Spital Zürich

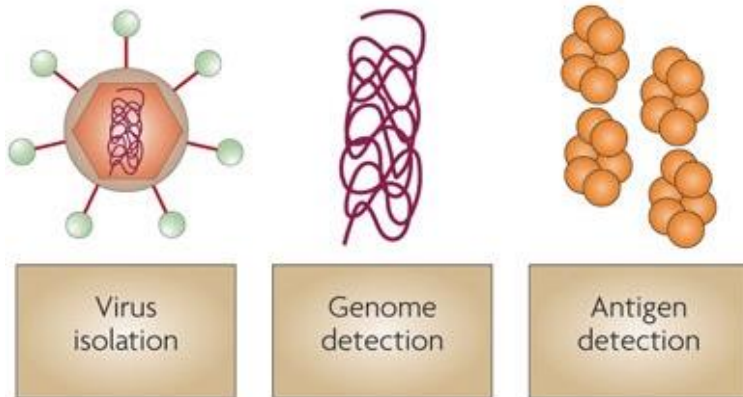
# House Keeping

- Arbeit mit **inaktiviertem** SARS-CoV-2 Zellkulturüberstand
- Für die Versuchsdurchführung **Labormantel und Handschuhe** tragen
- Während der Versuchsdurchführung **keine Getränke, Esswaren, Mobiltelefone und Tablets** am Laborplatz
- Durchführung **2er-Gruppen**, gleiche Gruppen am Kurstag 2
- Versuchsanleitung bitte am Laborplatz liegen lassen
- Anwesenheitskontrolle Tag 1, Testat am Tag 2

# Methoden zum Nachweis von Viren und Virusinfektionen

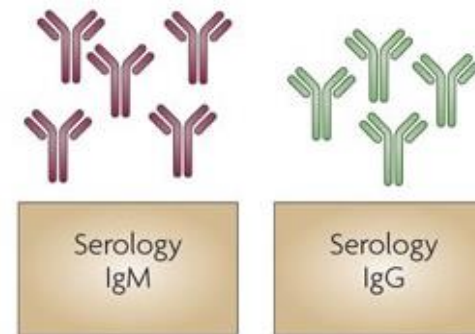
## Direkte Methoden

- Nachweis des viralen Genoms (PCR und Sequenzierung)
- Nachweis von viralen Proteinen/Antigenen
- Mikroskopie (Elektronenmikroskopie)



## Indirekte Methoden

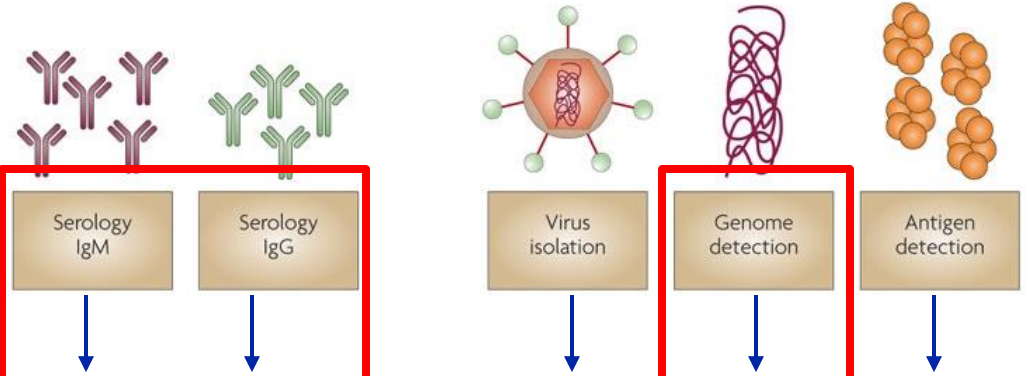
- Nachweis der Antikörperreaktion
- Zytopathischer Effekt (CPE) in Zellkulturen



# Auswahl von Nachweismethoden auf Auftragsformular IMV

## Indirekte Methoden

## Direkte Methoden



Erreger:	Antikörpernachweis		Virusnachweis		
	Nachweis:		Nachweis:		
Adenoviren	<input type="checkbox"/> IgG	<input type="checkbox"/> IgM	<input type="checkbox"/> Kultur	<input type="checkbox"/> PCR	<input type="checkbox"/> Antigen-Nachweis
Cytomegalievirus (CMV)	<input type="checkbox"/> IgG	<input type="checkbox"/> IgM	<input type="checkbox"/> Kultur	<input type="checkbox"/> PCR	
Epstein-Barr Virus (EBV)	<input type="checkbox"/> IgG	<input type="checkbox"/> IgM	<input type="checkbox"/> Kultur	<input type="checkbox"/> PCR	
Enteroviren			<input type="checkbox"/> Kultur	<input type="checkbox"/> PCR	
Herpes Simplex Virus (HSV)	<input type="checkbox"/> IgG	<input type="checkbox"/> IgM	<input type="checkbox"/> Kultur		<input type="checkbox"/> Typisierung
Herpes Simplex Virus Typ 1	<input type="checkbox"/> IgG		<input type="checkbox"/> Kultur	<input type="checkbox"/> PCR	<input type="checkbox"/> Antigen-Nachweis
Herpes Simplex Virus Typ 2	<input type="checkbox"/> IgG		<input type="checkbox"/> Kultur	<input type="checkbox"/> PCR	<input type="checkbox"/> Antigen-Nachweis
HIV 1&2	<input type="checkbox"/> Screeningtest				
Humanes Herpes Virus Typ 6 (HHV-6)				<input type="checkbox"/> PCR	
Influenzavirus A (inkl. H1N1 neu)/B			<input type="checkbox"/> Kultur	<input type="checkbox"/> PCR	
Masernvirus	<input type="checkbox"/> IgG	<input type="checkbox"/> IgM	<input type="checkbox"/> Kultur	<input type="checkbox"/> PCR	
Mumpsvirus	<input type="checkbox"/> IgG	<input type="checkbox"/> IgM	<input type="checkbox"/> Kultur		
Noroviren				<input type="checkbox"/> PCR *	
Parainfluenzavirus 1/2/3/(4)			<input type="checkbox"/> Kultur	<input type="checkbox"/> PCR *	
Parvovirus B19	<input type="checkbox"/> IgG	<input type="checkbox"/> IgM		<input type="checkbox"/> PCR	
BK-Polyomavirus				<input type="checkbox"/> PCR	
JC-Polyomavirus				<input type="checkbox"/> PCR	
Respiratory Syncytial Virus (RSV)			<input type="checkbox"/> Kultur	<input type="checkbox"/> PCR	
Rhinoviren				<input type="checkbox"/> PCR	
Rotaviren					<input type="checkbox"/> Antigen-Nachweis
Rötelnvirus (Rubella)	<input type="checkbox"/> IgG	<input type="checkbox"/> IgM			
Varicella Zoster Virus (VZV)	<input type="checkbox"/> IgG	<input type="checkbox"/> IgM	<input type="checkbox"/> Kultur	<input type="checkbox"/> PCR	<input type="checkbox"/> Antigen-Nachweis
Zeckenencephalitis Virus (FSME)	<input type="checkbox"/> IgG	<input type="checkbox"/> IgM			

☐ Blockanalyse PCR respiratorische Viren

# Überblick Laborkurs Virologie 2024

## **Tag 1: Direkter Nachweis des SARS-CoV-2 Virus**

- Einführung Direkter Virusnachweis
- Durchführung Polymerase Chain Reaction (PCR)
- Durchführung Antigen-Schnelltest
- Arbeitsblatt Negative Predictive Value

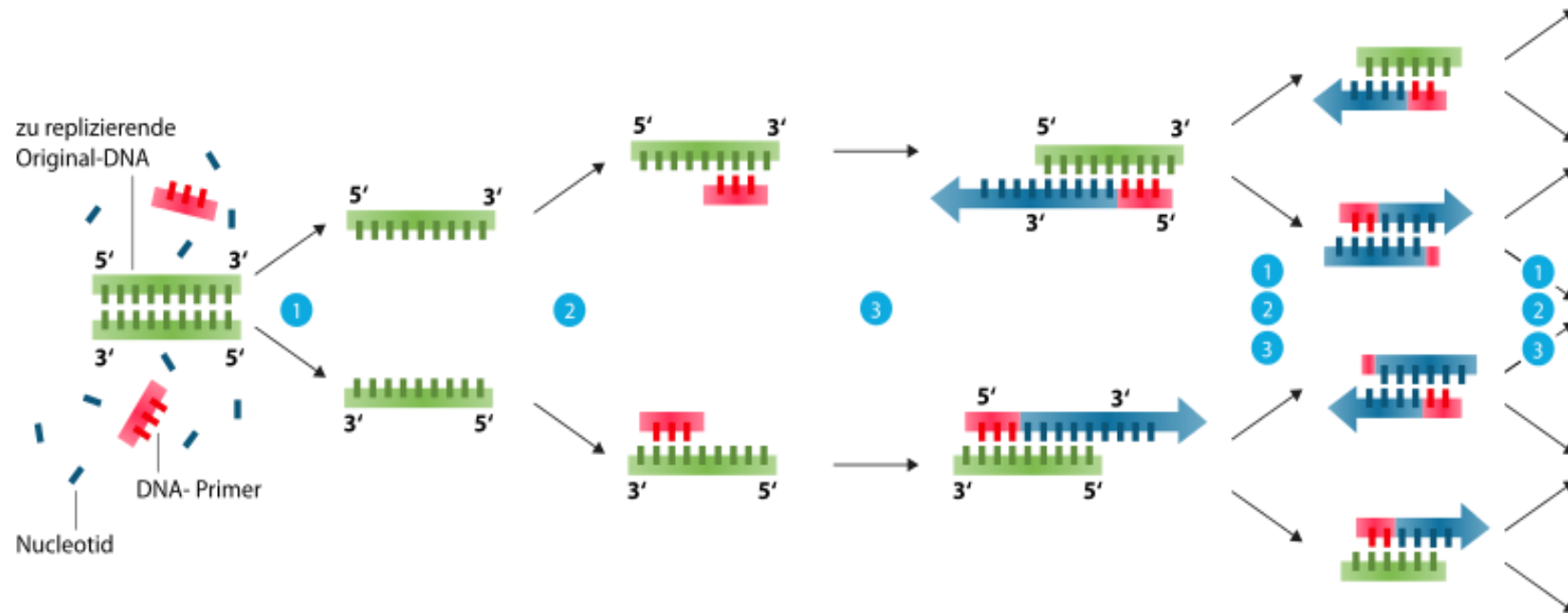
## **Tag 2: Antikörperantwort auf eine Cytomegalovirus (CMV) Infektion**

- Auswertung Tag 1
- Einführung Indirekter Virusnachweis/Serologie
- Durchführung und Auswertung ELISA-Antikörpertest

# Lernziele

- Sie kennen die im Kurs behandelten Analyseverfahren der modernen virologischen Diagnostik.
- Sie verstehen die Vor- und Nachteile und die richtige Anwendung der unterschiedlichen Diagnostikmethoden.
- Sie lernen am Beispiel von SARS-CoV-2 und CMV den Ablauf der Diagnostik kennen.
- Sie führen selber einen Virusnachweis mittels Polymerase Chain Reaction (PCR) und einen Antigentest durch.
- Sie führen selber einen ELISA-Antikörpertest durch.

# Das Prinzip der Polymerase Chain Reaction (PCR)

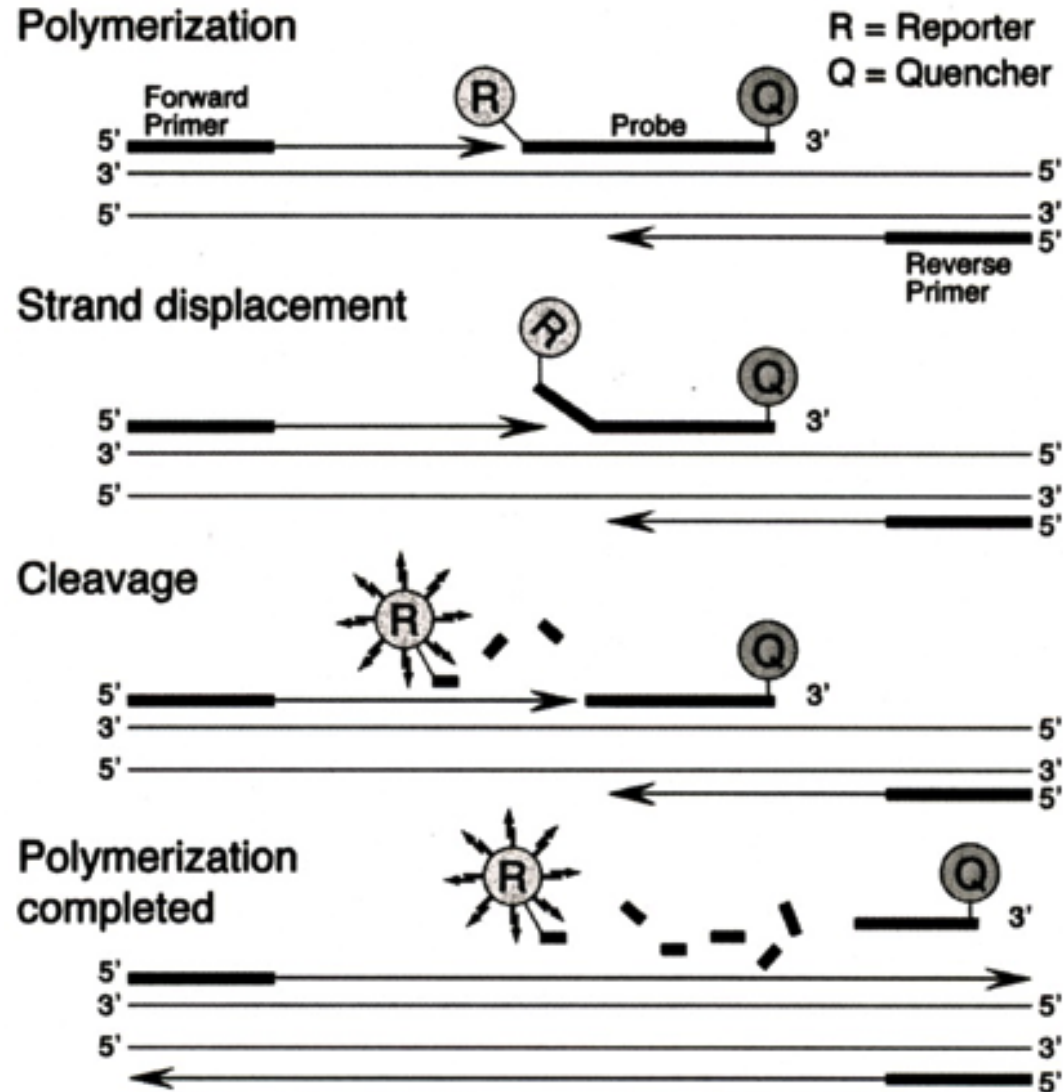


- 1 **Denaturierung** (Schmelzen) bei ca. 96°C
- 2 **Primerhybridisierung** (Anlagerung) bei ca. 68°C
- 3 **Elongation** (Verlängerung) bei ca. 72 °C

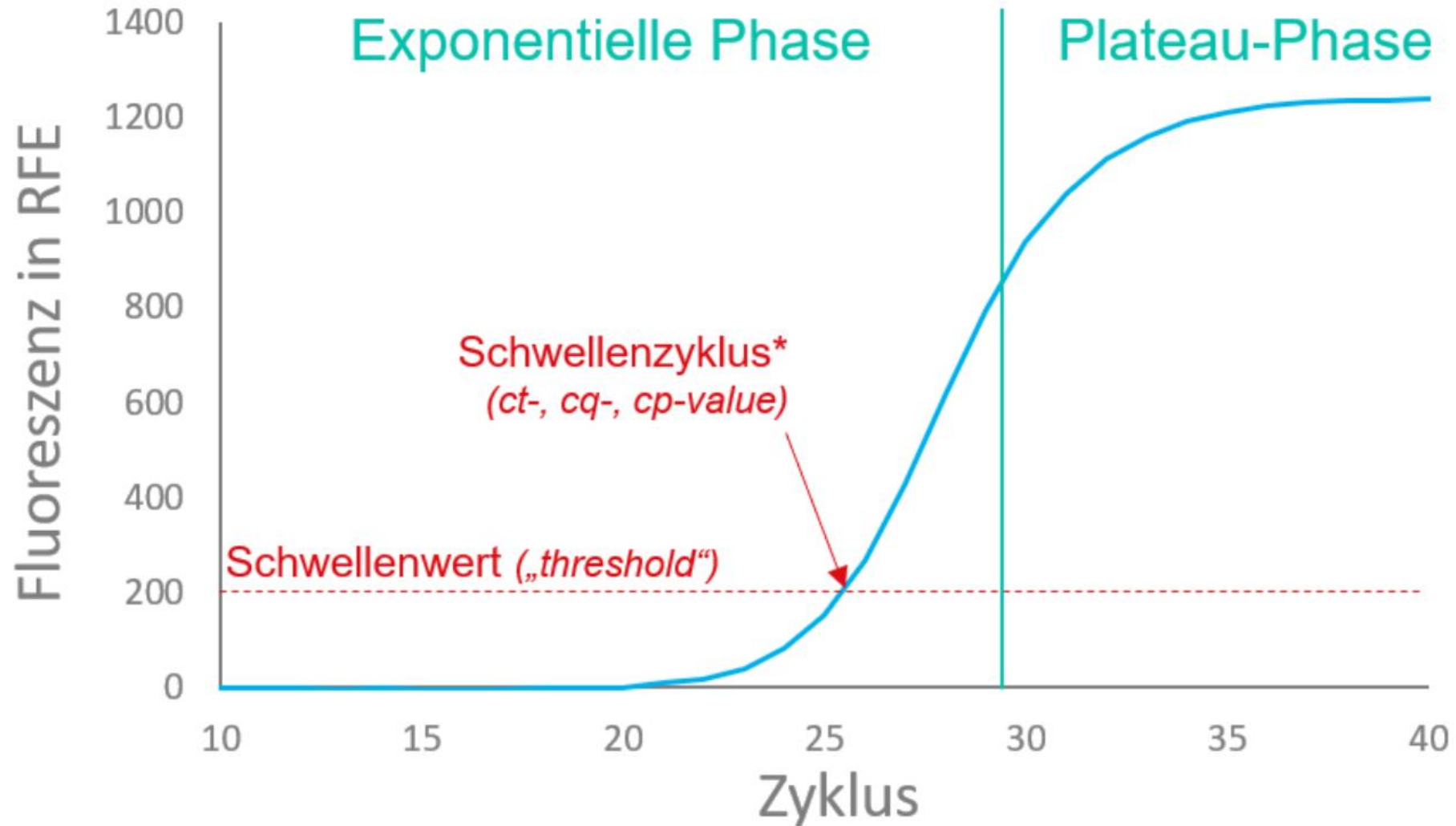




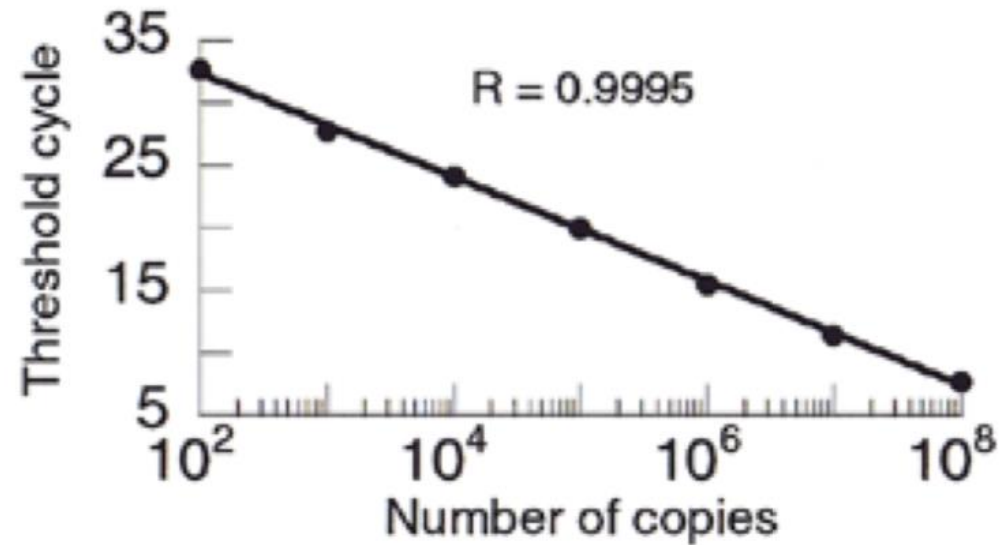
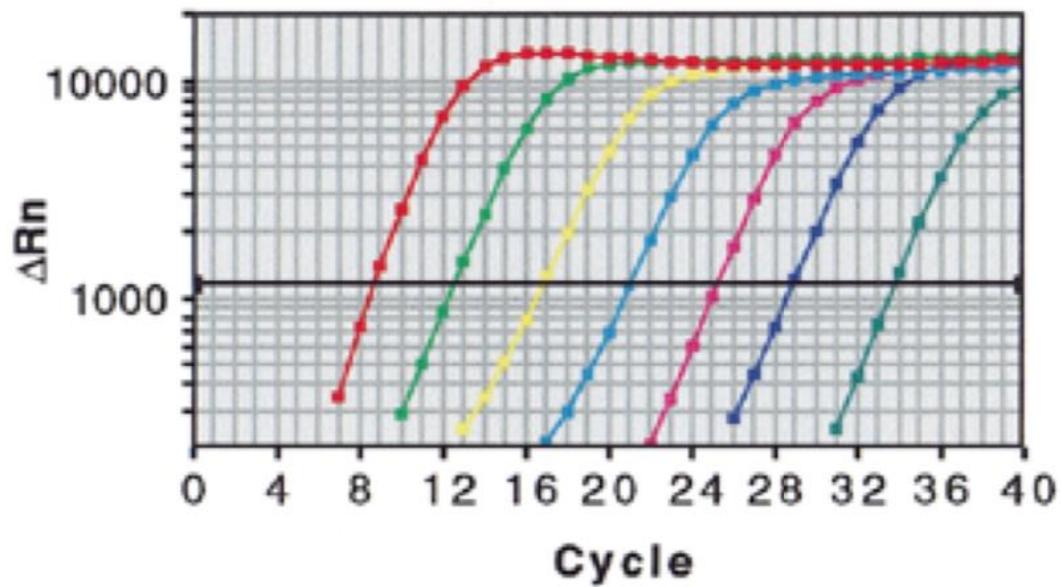
# Detektion der Amplifikate mittels real-time PCR



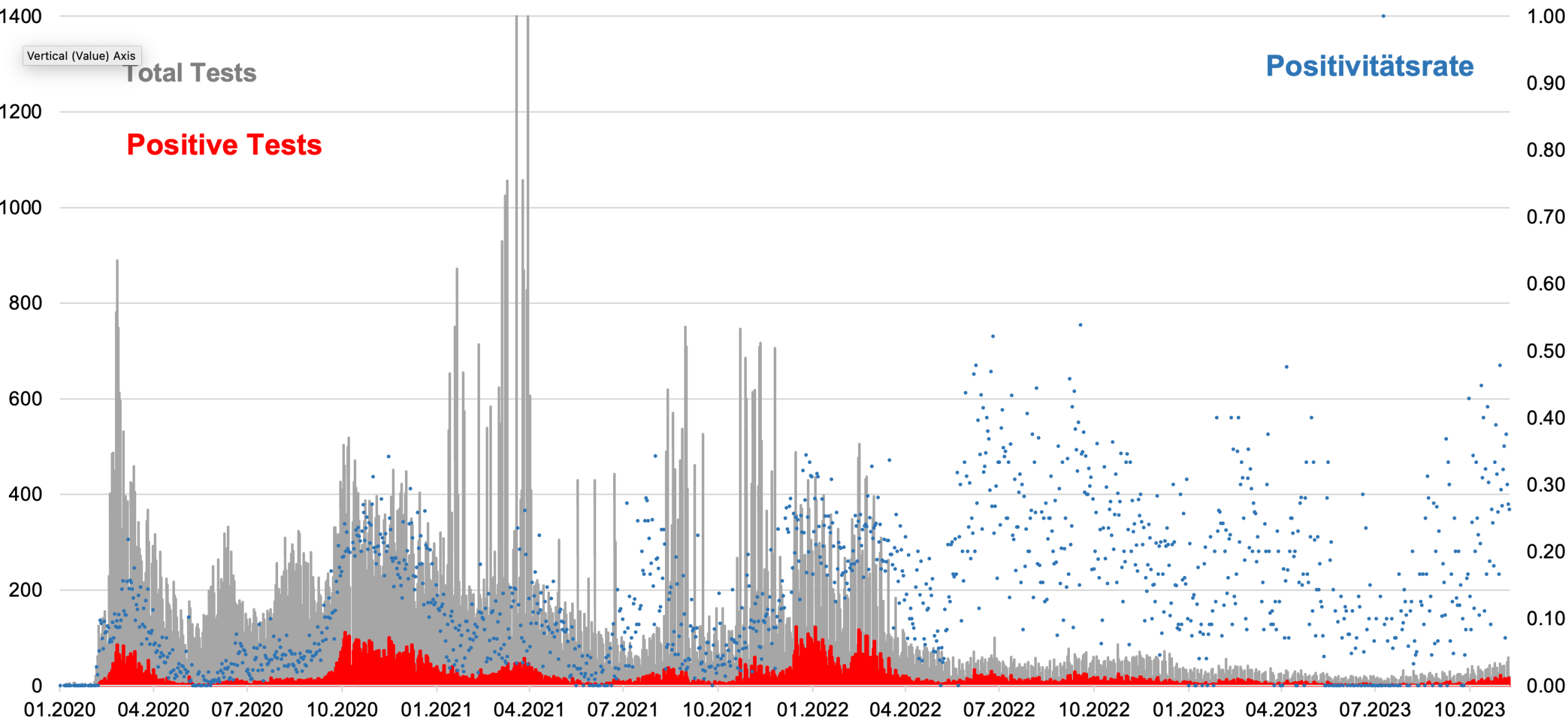
# Profil einer real-time PCR



# Quantifizierung mittels real-time PCR



# SARS-CoV-2 Tests am IMV während der Pandemie



# Vor- und Nachteile der PCR im Vergleich zu Antigen Schnelltests

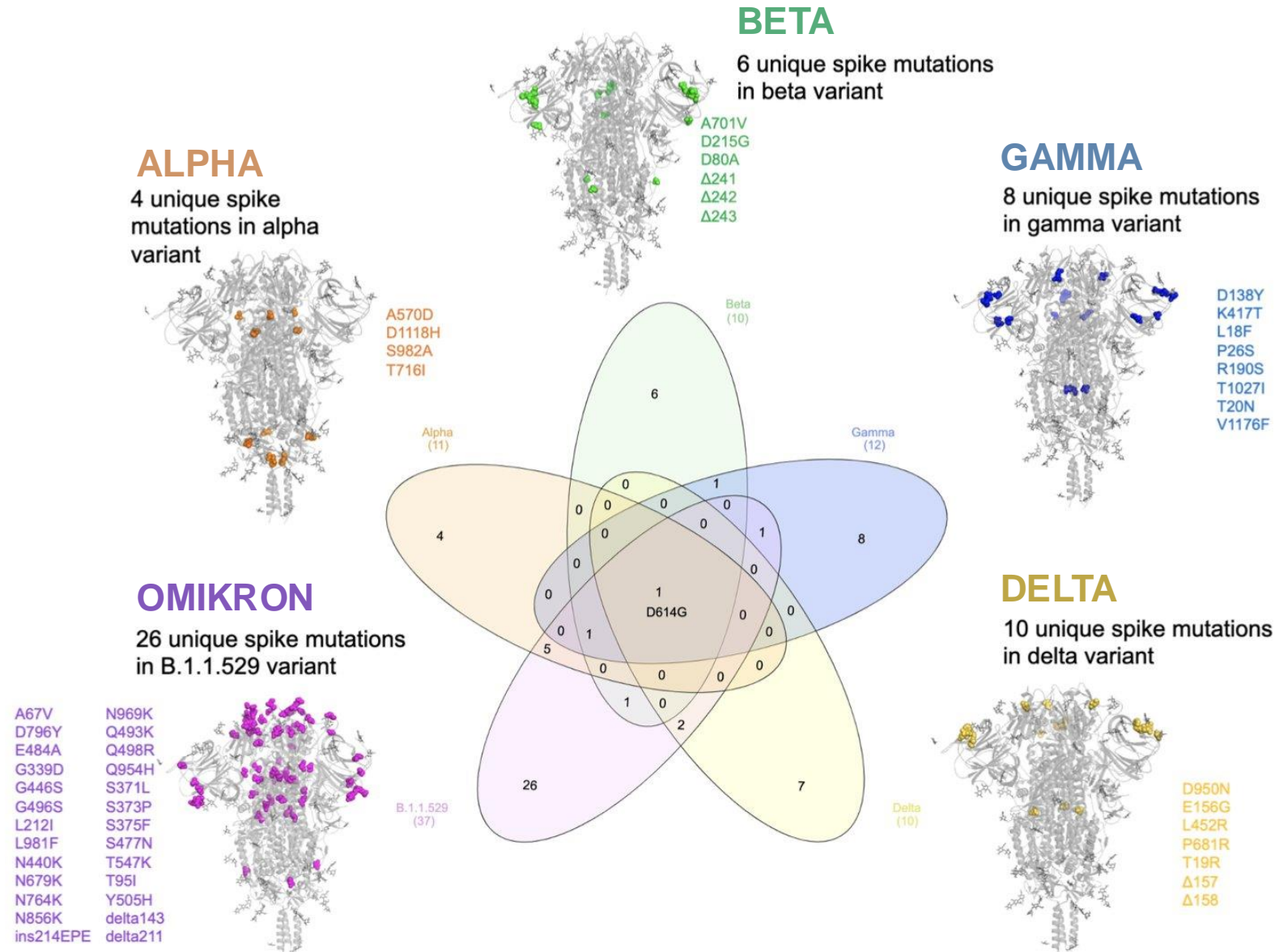
## PCR

- hohe Sensitivität dank Amplifikation
- Nasenrachenabstrich, Saliva/Sputum, BAL, Plasma, Stuhl
- 2-3 Stunden für 96 Proben (inkl. Aufreinigung, Reverse Transkription, Amplifikation)
- hoher Durchsatz
- Labor, Thermocycler

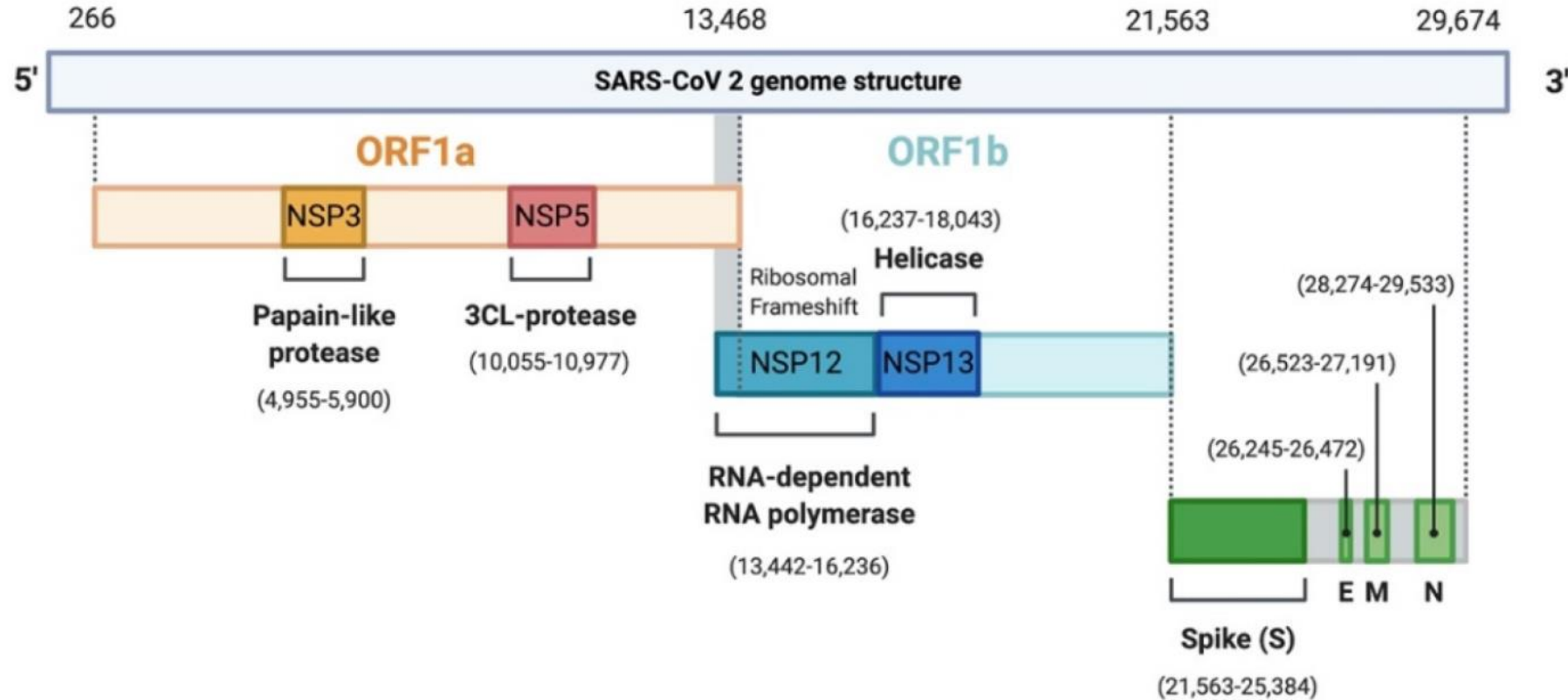
## Antigen Schnelltests

- weniger sensitiv als PCR
- Nasenrachenabstrich
- schnell, z.T. nur 15 Minuten
- Point-of-Care Test (POCT)

# SARS-CoV-2 Varianten unterscheiden sich im Spike-Protein



# PCR-Test detektieren sicherheitshalber mehrere Amplifikate



PCR-Test	ORF1	Spike	E	N
Cobas	✓		✓	
GeneXpert			✓	✓
TapPath	✓	✓		✓



# Syndromische Multiplex-PCR-Panels werden häufig genutzt

## FTD Respiratory pathogens 21

### Overview

Five tube multiplex for detection of influenza A virus, influenza A(H1N1) swl virus, influenza B virus, human rhinovirus, human coronavirus NL63, 229E, OC43 and HKU1 ; human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 ; human metapneumoviruses A/B, human bocavirus, human respiratory syncytial viruses A/B, human adenovirus, enterovirus, human parechovirus, *Mycoplasma pneumoniae* and internal control

### Principle

Multiplex real-time PCR for detection of pathogen genes by TaqMan® technology

### Targets

First tube multiplex PCR:

- influenza A virus
- influenza B virus
- influenza A(H1N1) swl virus
- human rhinovirus

Second tube multiplex PCR:

- human coronavirus NL63
- human coronavirus 229E
- human coronavirus OC43
- human coronavirus HKU1

Third tube multiplex PCR:

- human parainfluenza 2
- human parainfluenza 3
- human parainfluenza 4
- internal Control

Fourth tube multiplex PCR:

- human parainfluenza 1
- human metapneumoviruses A/B
- human bocavirus
- *Mycoplasma pneumoniae*

Fifth tube multiplex PCR:

- human respiratory syncytial viruses A/B
- human adenovirus
- enterovirus
- human parechovirus

## THE BIOFIRE RESPIRATORY 2.1 PANEL MENU

Overall 97.1% sensitivity and 99.3% specificity (prospective specimens) <sup>1</sup>

SARS-CoV-2 98.4% PPA and 98.9% NPA<sup>2</sup>

Sample Type: Nasopharyngeal swab in transport media or saline

### VIRUSES:

- Adenovirus
- Coronavirus 229E
- Coronavirus HKU1
- Coronavirus NL63
- Coronavirus OC43
- **Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)**
- Human Metapneumovirus
- Human Rhinovirus/Enterovirus
- Influenza A virus
- Influenza A virus A/H1
- Influenza A virus A/H3
- Influenza A virus A/H1-2009
- Influenza B virus
- Parainfluenza virus 1
- Parainfluenza virus 2
- Parainfluenza virus 3
- Parainfluenza virus 4
- Respiratory syncytial virus

### BACTERIA:

- *Bordetella parapertussis*
- *Bordetella pertussis*
- *Chlamydia pneumoniae*
- *Mycoplasma pneumoniae*



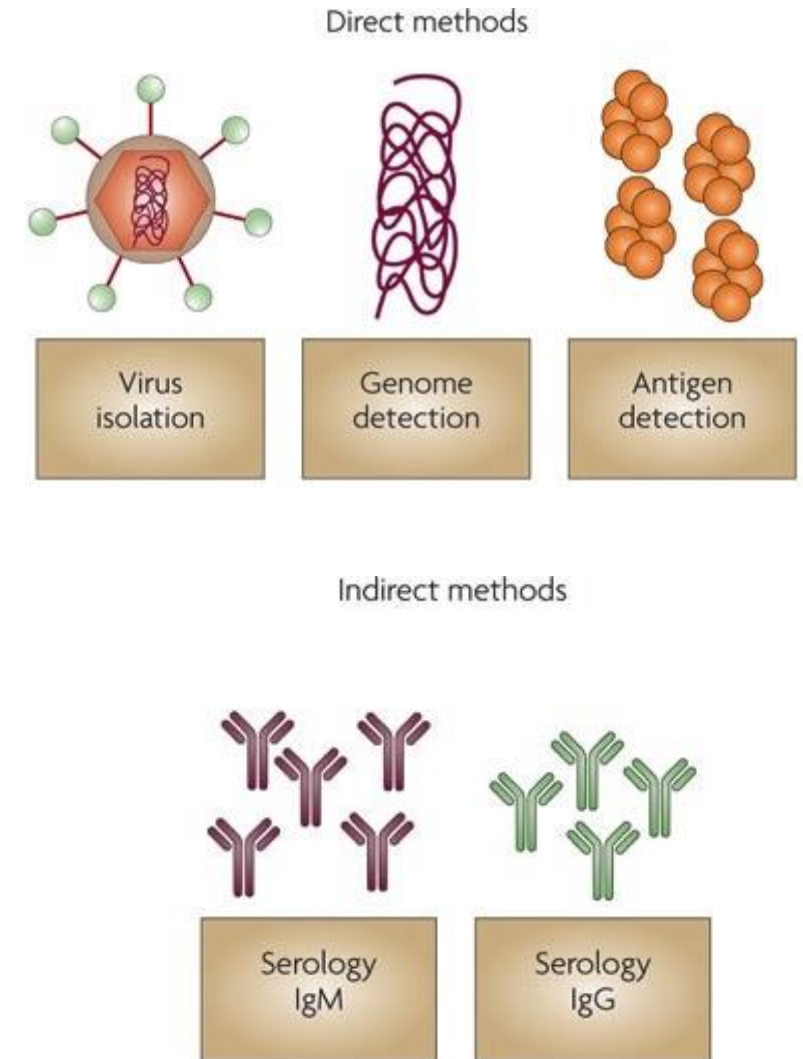


# Herausforderungen der Diagnostik neuer Viren

Spezifische Reagenzien sind nötig, um

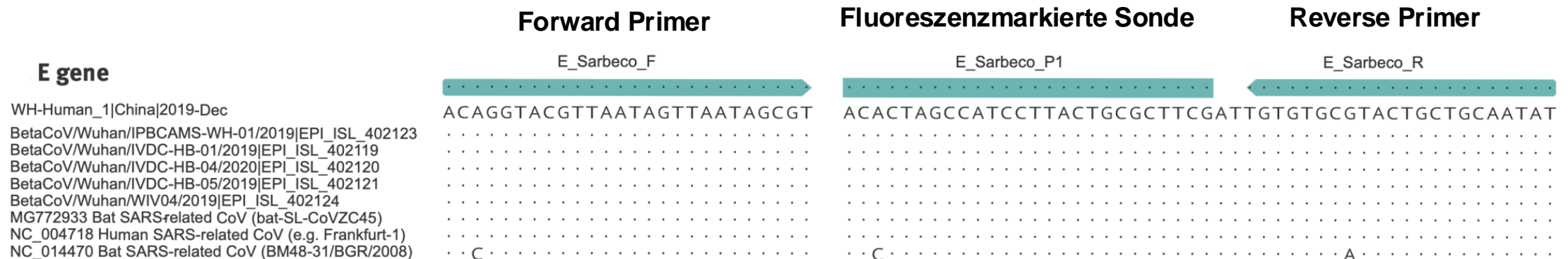
- das Genom eines Virus
- virale Antigene
- virus-spezifische Antikörper zu detektieren.

→ Neue Viren können nicht detektiert werden, da die entsprechenden Reagenzien fehlen.

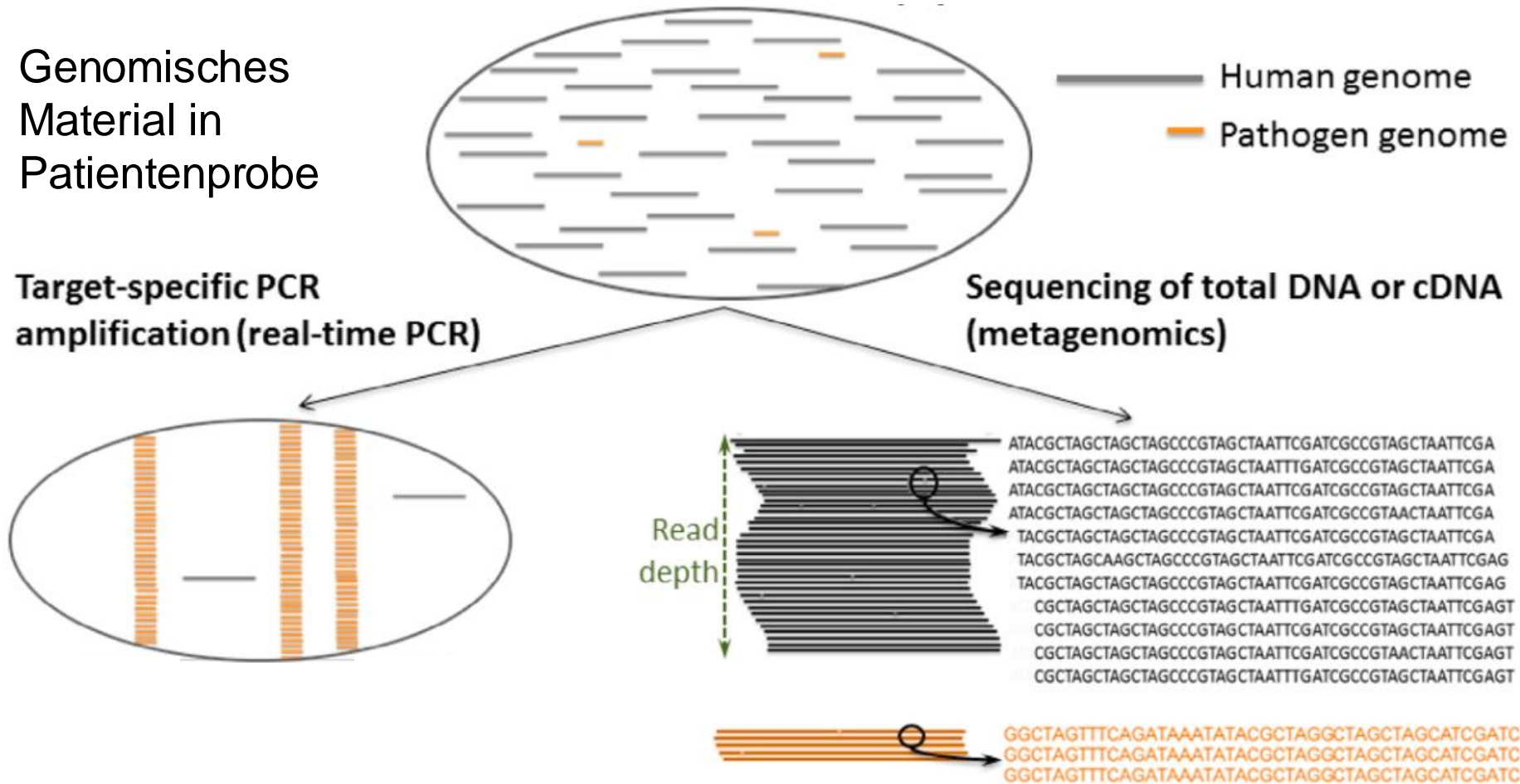


# Etablierung eines Tests zum Genomnachweis

1. Identifikation von konservierten Genabschnitten
2. Design von spezifischen Primern für die Amplifikation und Sonden für die Quantifizierung
3. Zusammenstellen von Kontrollen (Positivkontrollen, Verdünnungsreihen, Patientenproben)



# Metagenomische Sequenzierung für die offene Diagnostik



**Vorteile:** Schnell, kostengünstig, sensitiv

**Nachteile:** Unerwartete oder neue Erreger werden nicht erkannt; mehrere Reaktionen für mehrere Erreger erforderlich

**Vorteile:** Pan-Pathogen-Nachweis in einer einzigen Reaktion

**Nachteil:** Teurer und langsamer als PCR

# Identifikation von SARS-CoV and SARS-CoV-2

PCR-basierte random-Amplifikation und Sequenzierung wurde verwendet, um SARS-CoV und SARS-CoV-2 zu identifizieren

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

ORIGINAL ARTICLE

## Identification of a Novel Coronavirus in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome

Christian Drosten, M.D., Stephan Günther, M.D., Wolfgang Preiser, M.D.,  
Sylvie van der Werf, Ph.D., Hans-Reinhard Brodt, M.D., Stephan Becker, Ph.D.,

### Article

## A new coronavirus associated with human respiratory disease in China

<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>

Received: 7 January 2020

Accepted: 28 January 2020

Fan Wu<sup>1,7</sup>, Su Zhao<sup>2,7</sup>, Bin Yu<sup>3,7</sup>, Yan-Mei Chen<sup>1,7</sup>, Wen Wang<sup>4,7</sup>, Zhi-Gang Song<sup>1,7</sup>, Yi Hu<sup>2,7</sup>,  
Zhao-Wu Tao<sup>2</sup>, Jun-Hua Tian<sup>3</sup>, Yuan-Yuan Pei<sup>1</sup>, Ming-Li Yuan<sup>2</sup>, Yu-Ling Zhang<sup>1</sup>, Fa-Hui Dai<sup>1</sup>,  
Yi Liu<sup>1</sup>, Qi-Min Wang<sup>1</sup>, Jiao-Jiao Zheng<sup>1</sup>, Lin Xu<sup>1</sup>, Edward C. Holmes<sup>1,5</sup> & Yong-Zhen Zhang<sup>1,4,6</sup>✉

2003

“A volume of 2 µl of RNA solution was analyzed with a **random reverse-transcriptase (RT)–PCR** assay.”

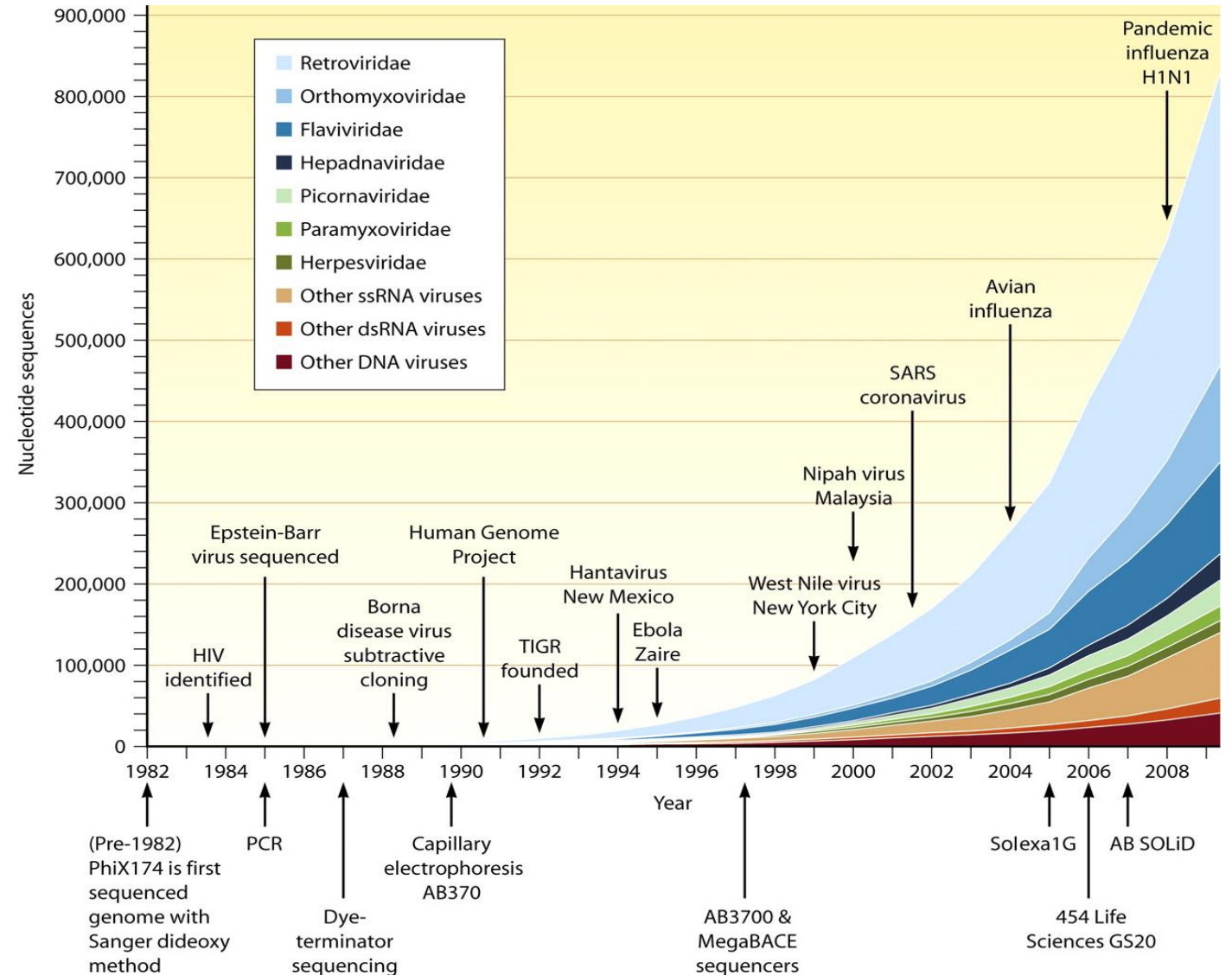
2019

“**Metagenomic RNA sequencing** of a sample of bronchoalveolar lavage fluid from the patient identified a new RNA virus strain from the family *Coronaviridae*...”

# Sequenzierung von Viren

Sehr wichtige Methode sowohl in der Forschung als auch in der klinischen Diagnostik

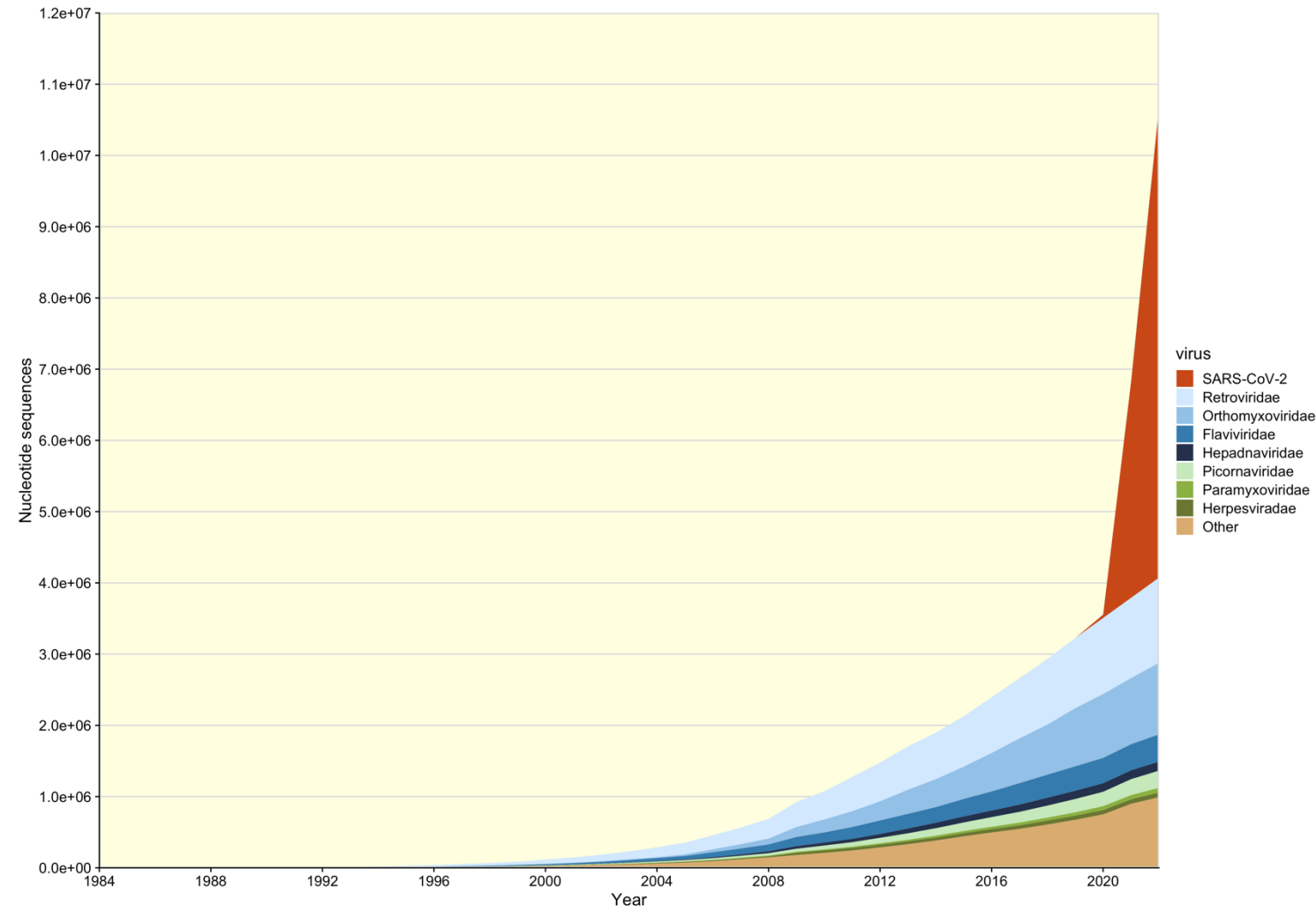
- Genotypisierung
- phylogenetische Analyse
- Nachweis von Resistenzmutationen
- Nachweis und Identifizierung von neuen Viren (Metagenomische Sequenzierung)



# Sequenzierung von Viren

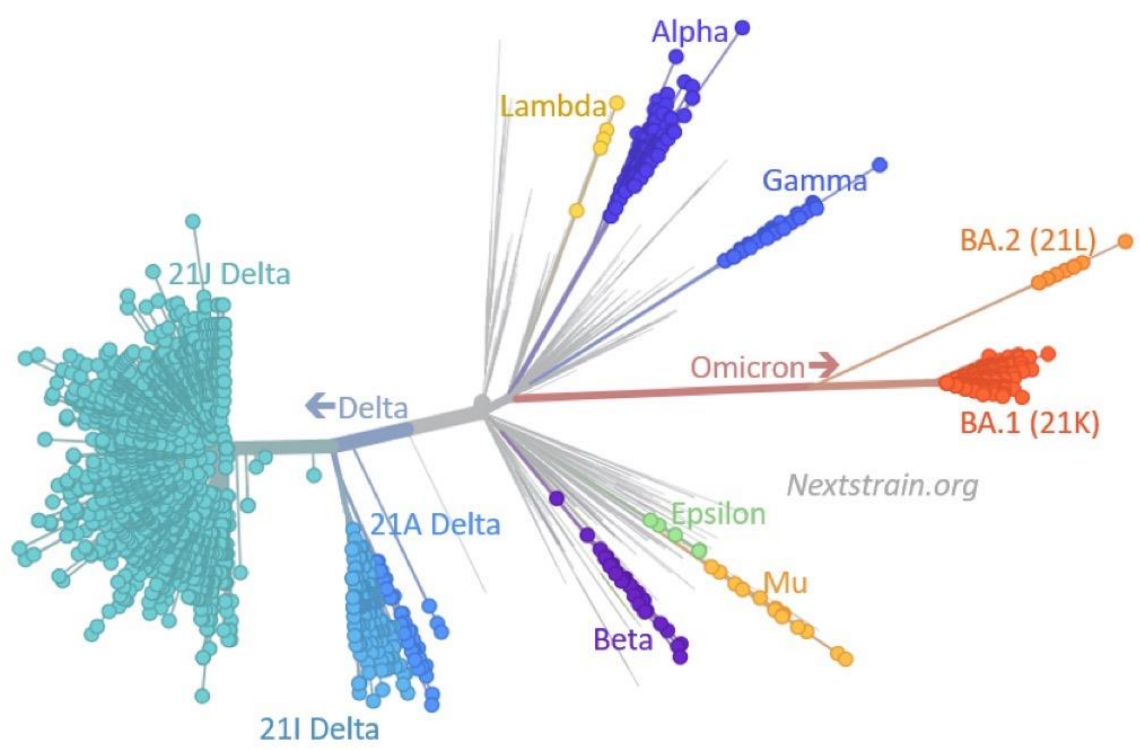
Sehr wichtige Methode sowohl in der Forschung als auch in der klinischen Diagnostik

- Genotypisierung
- phylogenetische Analyse
- Nachweis von Resistenzmutationen
- Nachweis und Identifizierung von neuen Viren (Metagenomische Sequenzierung)

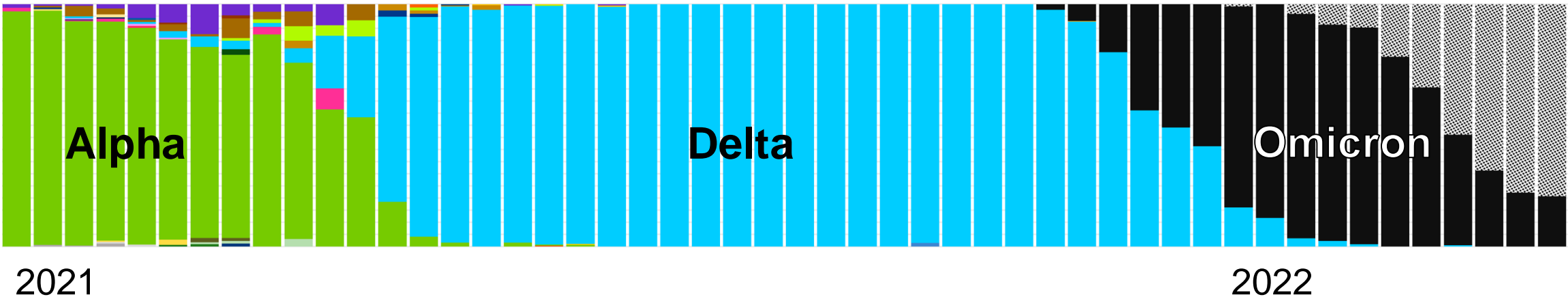




# SARS-CoV-2-Sequenzierung am IMV



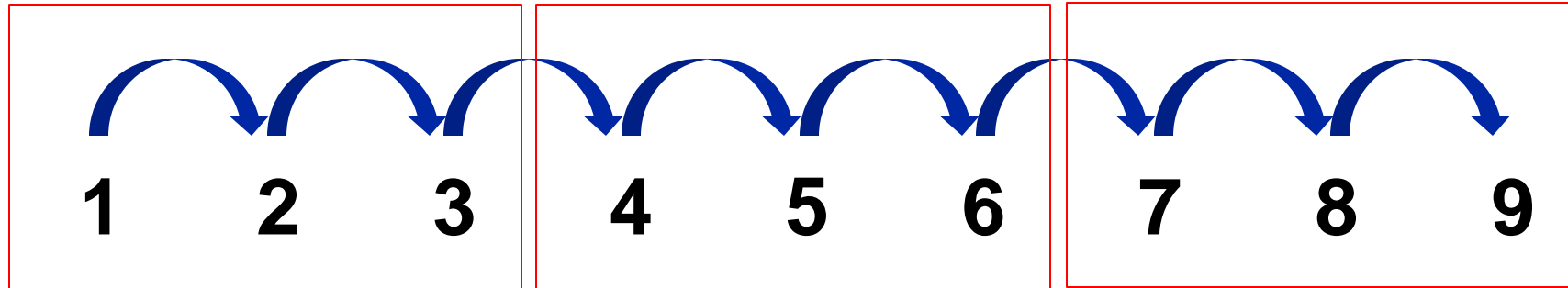
Daten aus der Sequenzierung am IMV



# **PRAKTISCHER TEIL**



# Fragestellung praktischer Teil



Hohe Konzentration

Tiefe Konzentration

PCR positiv?

Wie sensitive ist die PCR?

Antigen-Schnelltest positiv?

Wie sensitive ist der Antigen-Schnelltest?

# Arbeitsblatt Negative Predictive Value Antigentest

Sensitivität = Anteil der korrekt erkannten positiven Fälle

Spezifität = Anteil der korrekt erkannten negativen Fälle

	PCR-Test	Antigen-Schnelltest
Sensitivität	99%	80%
Spezifität	99%	98%

Negative Predictive Value (NPV) = Wahrscheinlichkeit, dass ein negatives Ergebnis wirklich negativ ist.

Prävalenz = Häufigkeit einer Krankheit in einer Population zu einem bestimmten Zeitpunkt

**Was ist der NPV bei einer Prävalenz von 3% bzw. 30%?**

# Auflösung Übung zu Spezifität/Sensitivität

**Prävalenz 3%**

NPV PCR-Test	NPV Antigentest
100%	<b>99.4%</b>

Falsch negative PCR	Falsch negative Antigentest
0	<b>0.6</b>

**Prävalenz 30%**

NPV PCR-Test	NPV Antigen-Test
99.6%	<b>92%</b>

Falsch negative PCR	Falsch negative Antigentest
0.4	<b>8</b>

- Bei höherer Prävalenz hat der gleiche Test einen tieferen Negativen Prädiktiven Wert, bzw. produziert anteilmässig mehr falsch negative Resultate (7.4).
- Beim sensitiveren PCR-Test ist der Effekt viel weniger ausgeprägt.