



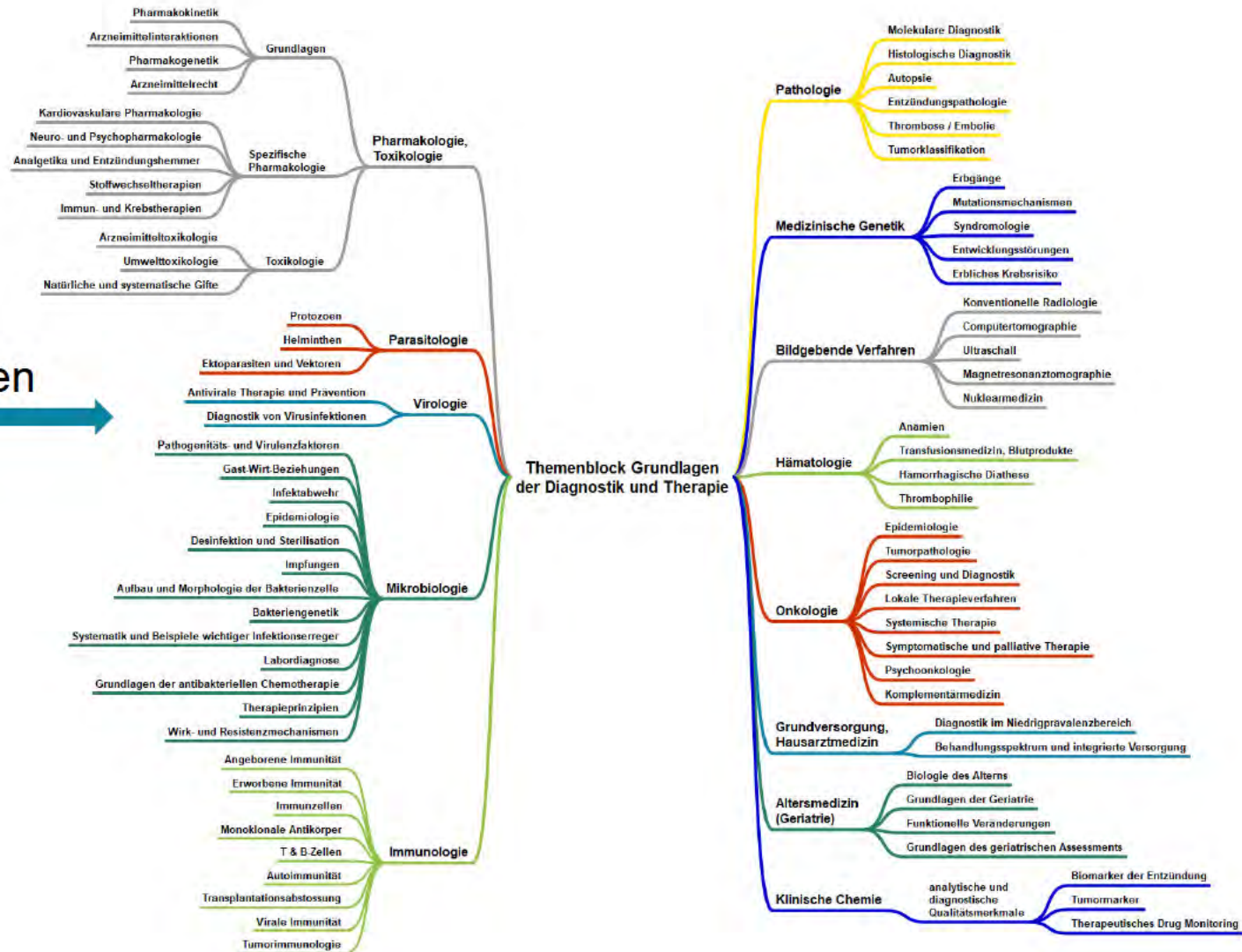
Virologie 6: Diagnostik viraler Erkrankungen

Prof. Dr. Alexandra Trkola

Institut für Medizinische Virologie, Universität Zürich

Mindmap

Virologie Grundlagen





Virologie 6: Diagnostik viraler Erkrankungen

Lernziele der Lektion

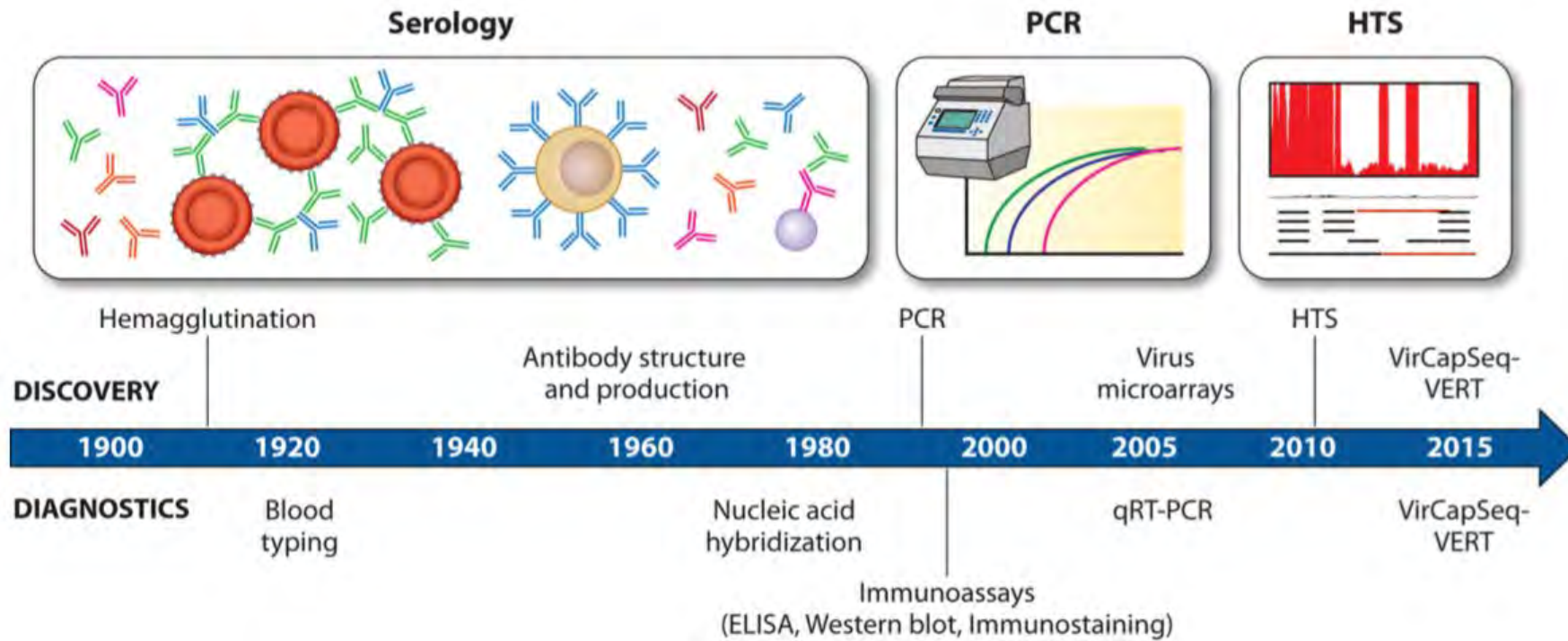
1. Sie können die gängigen Methoden zum Nachweis des Virusgenoms nennen.
2. Sie können die gängigen Methoden zum Nachweis einer Infektion durch spezifische Antikörper benennen.
3. Sie können die essenziellen Kriterien für die erfolgreiche Labordiagnostik von Viren aufzählen.

Themen der heutigen Vorlesung

- ❑ Methoden der Virusdiagnostik
 - ❑ Direkter Nachweis des Virus (Genom, Antigen)
 - ❑ Indirekter Nachweis (Serologie)
- ❑ Das ideale Probenmaterial
- ❑ Welche Methode greift zu welchem Zeitpunkt der Infektion
- ❑ Vorbereitung Kurs

Entwicklung der Virusdiagnostik

High-throughput sequencing



HTS: high throughput sequencing, metagenomic sequencing. Braucht keine Virus spezifischen Primer
VirCapSeq: HTS System um breit virale Infekte zu screenen. Verwendet spezifische Primer.

Labordiagnostik viraler Erkrankungen - Wichtigste Verfahren

Wichtig

(1) Direkter Nachweis des Virus

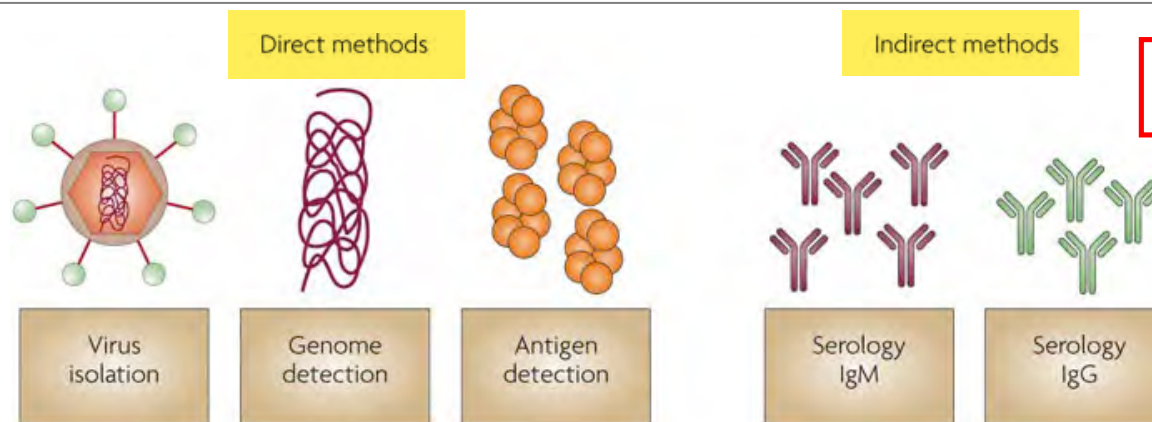
- Antigennachweis (= Nachweis von Virusproteinen)
- Nachweis des Virusgenoms (RNA, DNA)

(2) Indirekter Virusnachweis durch die Immunantwort

- Nachweis virusspezifischer Antikörper (Serologie)
- Nachweis zytopathogener Effekte im Untersuchungsmaterial

(3) Isolierung und Anzüchten des Virus

Diagnose viraler Infektionen



Wichtig

Adapted from R.W. Peeling et al. Nature Reviews Microbiology 8, S30-S37

Direkte Methoden

- Antigennachweis
 - ELISA
 - Immunfluoreszenz von infiziertem Gewebe oder infizierten Zellen
- Nachweis des viralen Genoms
 - durch PCR oder direktes Sequenzieren
- Viruskultur/Isolation und Identifikation durch
 - Nachweis viraler Antigene
 - Genomnachweis
 - teilweise auch Mikroskopie
- Mikroskopie (EM) von infiziertem Gewebe

Indirekte Methoden

- Nachweis von virusspezifischen Antikörpern in Serum
 - virusspezifisches IgG, IgM, IgA nachgewiesen durch ELISA, Western blot, Immunfluoreszenz
- Viruskultur
 - Nachweis zytopathischer Effekt (Mikroskopie)
- Immunantworten (sehr selten verwendet):
 - zelluläre Immunantwort, Interferon, Interferoninduzierte Enzyme

Labordiagnostik viraler Erkrankungen

Detailliertere Bestimmungen / Monitoring

(1) Quantifizierung der Viruslast

- Chronische Viruserkrankungen: Monitoring der Viruslast (HIV, HCV)
- Nachweis der Virusklärung bei akuten Viruserkrankungen
- Methode:
 - heute quantitative PCR
 - früher z.B. Virustiterbestimmung durch Hämagglutinationstest

(2) Bestimmung von Genotypen und Serotypen

- Genotype: Bestimmung durch Sequenzierung oder spezifischer PCR
- Serotype: Antikörperreaktivität

(3) Bestimmung von Medikamentenresistenzen

- HIV-1 : durch Sequenzierung oder spezifische PCR. Essenziell für Therapie

Welches Probenmaterial ist das richtige um Viren nachzuweisen?

Qualität der Probe, die das Labor erhält, ist entscheidend für erfolgreichen Virusnachweis!

- **Variablen**

- Zeitpunkt der Probenentnahme
 - zu früh nach Infektion: Virus noch nicht in Peripherie
 - spät nach Infektion: Virus schon geklärt, Nachweis nur noch über Antikörper (wenn Erstinfektion)
- Art der Probe (welches Gewebe, Blut etc.)
- Probenmenge
- Zustand der Probe: "frisch", Temperatur bei Transport und Lagerung

- **Welches Probenmaterial es braucht, hängt von Virus, Zeitpunkt der Infektion und Analyse ab**

- Direkter Virusnachweis am Ort der Replikation (CSF, Schleimhautabstrich, Gewebeproben, Stuhl, Urin, etc)
- Direkter Virusnachweis bei Virämie: Blut
- Serologie: Serum, Plasma, Liquor

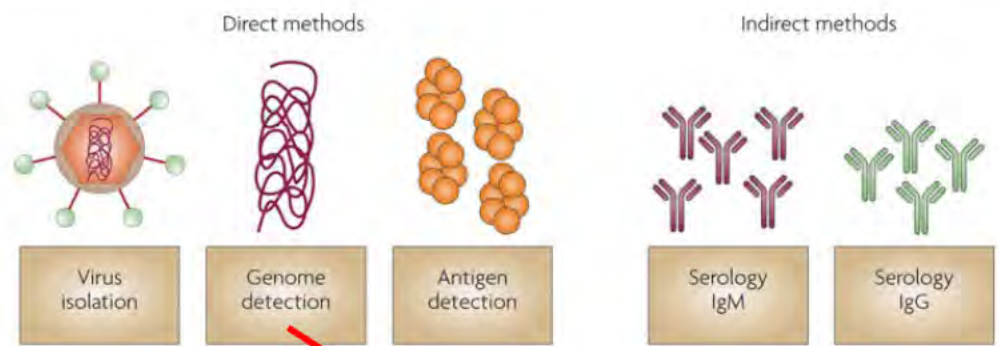
Klinische Angaben		<input type="checkbox"/> Transfusion	<input type="checkbox"/> Immunglobuline
<input type="checkbox"/> Antivirale Therapie: Medikament _____ Therapiebeginn _____		<input type="checkbox"/> Immunsuppression	<input type="checkbox"/> Schwangerschaft
		<input type="checkbox"/> Transplantation: Organ _____	
Untersuchungsmaterial (Erläuterungen siehe Rückseite)			
Datum der Entnahme: <div>Tag</div> <div>Monat</div>	<input type="checkbox"/> Nativblut/Serum	<input type="checkbox"/> Abstrich: Ort _____	<input type="checkbox"/> Stuhl
	<input type="checkbox"/> EDTA-Blut	<input type="checkbox"/> Augenabstrich	<input type="checkbox"/> Urin
	<input type="checkbox"/> Citrat-Blut	<input type="checkbox"/> Rachenabstrich	<input type="checkbox"/> Biopsie
	<input type="checkbox"/> Liquor (Antikörpernachweis nur zusammen mit Blutprobe)	<input type="checkbox"/> Nasopharyngealsekret (NPS)	<input type="checkbox"/> Anderes: _____
		<input type="checkbox"/> Bronchiallavage (BAL)	

Nachweismethoden in der Virusdiagnostik

Nachweis des viralen Genoms durch PCR ist zur wichtigsten Methode in der Diagnostik geworden.

Qualitative PCR:
(Ja/Nein Bestimmung) zum Nachweis einer viralen Infektion

Quantitative PCR:
zur Bestimmung der Viruslast
zB. bei HIV, HCV (disease monitoring)



Untersuchungsmaterial (Erläuterungen siehe Rückseite)			
Datum der Entnahme:		Abschick-Ort:	
<input type="checkbox"/> Tag	<input type="checkbox"/> Monat	<input type="checkbox"/> Stuhl	<input type="checkbox"/> Urin
<input type="checkbox"/> Nativblut/Serum		<input type="checkbox"/> Nasenabstrich	<input type="checkbox"/> Biopsie
<input type="checkbox"/> EDTA-Blut		<input type="checkbox"/> Nasenabstrich	<input type="checkbox"/> Anderes:
<input type="checkbox"/> Citrat-Blut		<input type="checkbox"/> Nasopharyngealsekret (NPS)	
<input type="checkbox"/> Liquor (Antikörpernachweis nur zusammen mit Blutprobe)		<input type="checkbox"/> Bronchialsekret (BAL)	

Erreger:	Antikörpernachweis		Virusnachweis	
	Nachweis:			
Adenoviren	<input type="checkbox"/> IgG	<input type="checkbox"/> IgM	<input type="checkbox"/> Kultur allg. für breites Virusspektrum (Isolierung & Typisierung)	<input type="checkbox"/> Antigen-Nachweis
Cytomegalovirus (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"/> IgG	<input type="checkbox"/> IgM	<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"/> IgM	<input type="checkbox"/> Kultur	<input type="checkbox"/> Antigen-Nachweis
Herpes Simplex Virus Typ 2	<input type="checkbox"/> IgG	<input type="checkbox"/> IgM	<input type="checkbox"/> Kultur	<input type="checkbox"/> Antigen-Nachweis
HSV 1&2	<input type="checkbox"/> Screeningtest			
Humanes Herpes Virus Typ 6 (HHV-6)			<input type="checkbox"/> PCR	
Influenzavirus A (inkl. H1N1 neu)	<input type="checkbox"/> IgG	<input type="checkbox"/> IgM	<input type="checkbox"/> Kultur	<input type="checkbox"/> PCR
Masernvirus	<input type="checkbox"/> IgG	<input type="checkbox"/> IgM	<input type="checkbox"/> Kultur	
Mumpfvirus	<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"/> PCR **	
Parvovirus B19	<input type="checkbox"/> IgG	<input type="checkbox"/> IgM	<input type="checkbox"/> Kultur	<input type="checkbox"/> PCR
BK-Polyomavirus			<input type="checkbox"/> Kultur	<input type="checkbox"/> PCR
JC-Polyomavirus			<input type="checkbox"/> Kultur	<input type="checkbox"/> PCR
Respiratory Syncytial Virus (RSV)			<input type="checkbox"/> Kultur	<input type="checkbox"/> PCR
Rhinoviren			<input type="checkbox"/> Kultur	<input type="checkbox"/> PCR
Rotaviren				<input type="checkbox"/> Antigen-Nachweis
Rotavirus (Rubella)	<input type="checkbox"/> IgG	<input type="checkbox"/> IgM	<input type="checkbox"/> Kultur	<input type="checkbox"/> PCR
Varicella Zoster Virus (VZV)	<input type="checkbox"/> IgG	<input type="checkbox"/> IgM	<input type="checkbox"/> Kultur	<input type="checkbox"/> Antigen-Nachweis
Zerebelläre Enzephalitis Virus (ZSE)	<input type="checkbox"/> IgG	<input type="checkbox"/> IgM		
Toxoplasma gondii	<input type="checkbox"/> IgG	<input type="checkbox"/> IgM	<input type="checkbox"/> IgA	
<input type="checkbox"/> Erstuntersuchung		<input type="checkbox"/> IgG-Avidität		
<input type="checkbox"/> Folgeuntersuchung				

Materialbestellung	
<input type="checkbox"/> Virus-Transportmedium	<input type="checkbox"/> Auftragsformulare
<input type="checkbox"/> Urin-Transportmedium	

* Bei Ausbrüchen in geschlossenen Institutionen (Spitälern, Heimen, etc.) (in Absprache mit den Hygieneverantwortlichen).

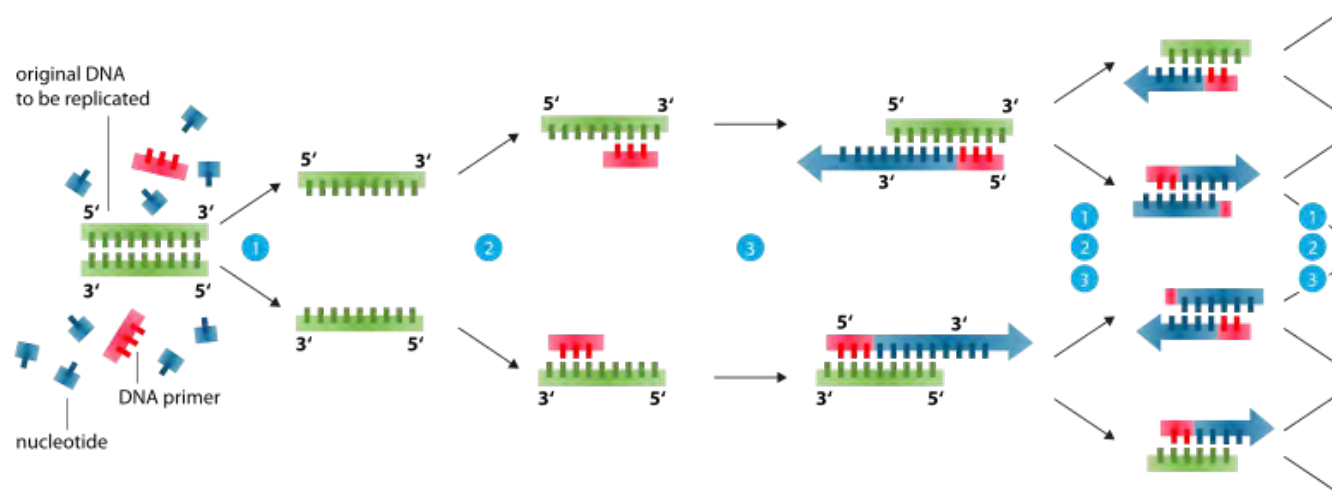
** Nicht im akkreditierten Analysenspektrum.

Animation Prinzip der PCR:

<https://www.dnalc.org/resources/3d/19-polymerase-chain-reaction.html>

Polymerase Chain Reaction (PCR)

- Durch Erhitzen wird dsDNA in Einzelstränge übergeführt (**Denaturation**).
- Primers (kurze Oligonucleotide), die komplementär zum 5' und 3' Ende der Ziel DNA (=Virus DNA von Interesse)sind, können an Einzelstrang DNA binden (primer hybridization, **Annealing**).
- Die DNA Polymerase, die im PCR Reaktionsgemisch enthalten ist startet ausgehend von den Primern die DNA Synthese (**Elongation**). Sie stellt dabei eine Kopie der originalen Einzelstrang Ziel DNA her.
- Zyklen mit Denaturation, Annealing und Elongation werden mehrfach wiederholt und dadurch die Ziel DNA amplifiziert



- 1 **Denaturation** at 94-96°C
- 2 **Annealing** at ~68°C
- 3 **Elongation** at ca. 72 °C

Verdoppelung der Ziel DNA bei jedem Zyklus

- Nach 25 Zyklen: 34 Millionen Kopien
- Nach 40 Zyklen: 10^{12} Kopien



PCR Methoden

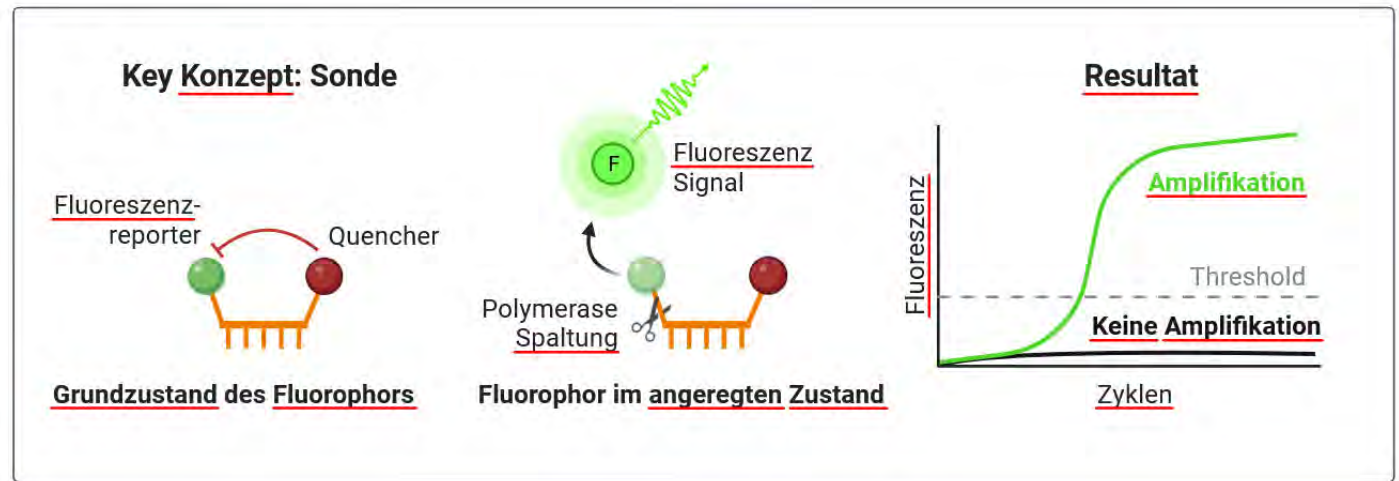
PCR Methoden

- PCR
 - Qualitativer Nachweis einer spezifischen DNA Sequenz
- RT-PCR
 - Qualitativer Nachweis einer spezifischen RNA Sequenz
 - RNA wird revers transkribiert zu DNA complement (cDNA)
 - Die neu synthetisierte cDNA wird dann mittels PCR amplifiziert
- Nested PCR
 - Zwei nacheinander geschaltete PCR Reaktionen um Sensitivität zu erhöhen.
 - Der zweite Primer-Satz amplifiziert ein zweites Target das innerhalb des amplifizieren Produktes der ersten Runde liegt
- Real-time PCR
 - Fluoreszenz von gelabelten DNA Proben wird in jedem Zyklus gemessen (real-time)
 - Anstieg an Fluoreszenz wird zur Quantifizierung verwendet
 - Detektionslimit ist typisch <10 DNA Moleküle

Einsatz in Diagnostik

- Klassische PCR
 - Sehr sensitiv. Höchste Sensitivität wird erreicht wenn Probenmaterial aufgereinigt wird und gereinigte RNA/DNA im Test eingesetzt wird.
 - Aufreinigung ist Kosten- und Zeit-intensiv.
- Direct-PCR
 - hier wird auf Aufreinigung verzichtet. Schneller, billiger aber weniger sensitiv. Nicht für alle Materialien geeignet, nicht für alle PCR adaptierbar.
- Schnelltest-PCR mit integrierter Aufreinigung
 - Einige wenige Verfahren (kommerzielle all-in-one Verfahren)
 - Sensitiv & schnell, kostenintensiv, geringer Durchsatz

Real time PCR Detektion mittels Sonden



Sonde (TaqMan Probe):

Oligonukleotid; komplementär zu Virus DNA, die amplifiziert wird. Sie bindet in einem Abstand zu den Primern an die Zielsequenz. Die Sonde ist mit einem Fluoreszenzreporter und einem Quencher markiert. Das Quencher-Molekül absorbiert alle Energie. Das Reporter-Molekül (Fluorogen) ist nicht angeregt.

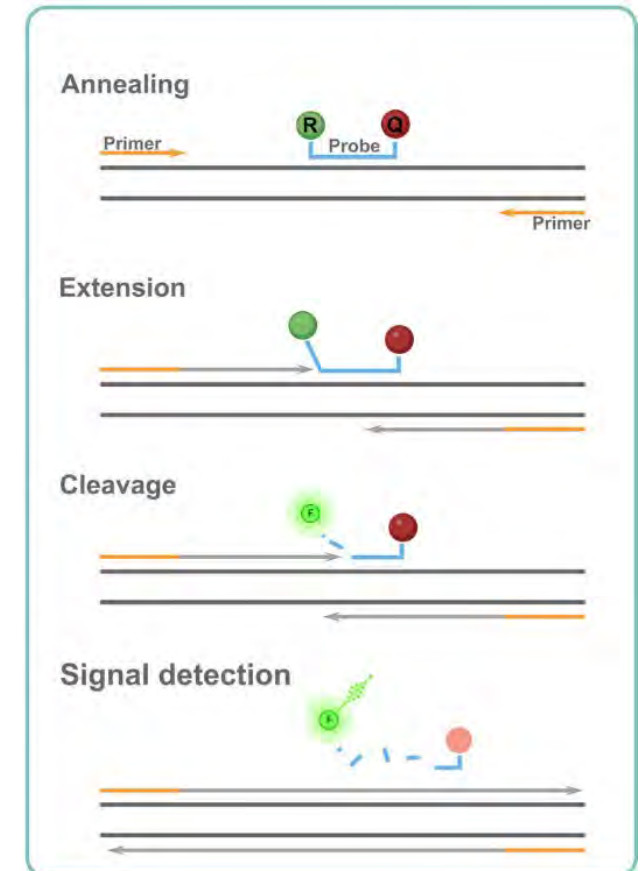
Annealing: PCR Primer und Sonde binden an die Zielsequenz in der Probe. **Die Sonde leuchtet NICHT.**

Extension: Die DNA Synthese beginnt am Primer vom 5'-Ende der Zielsequenz und wird bis zur Sonde fortgesetzt.

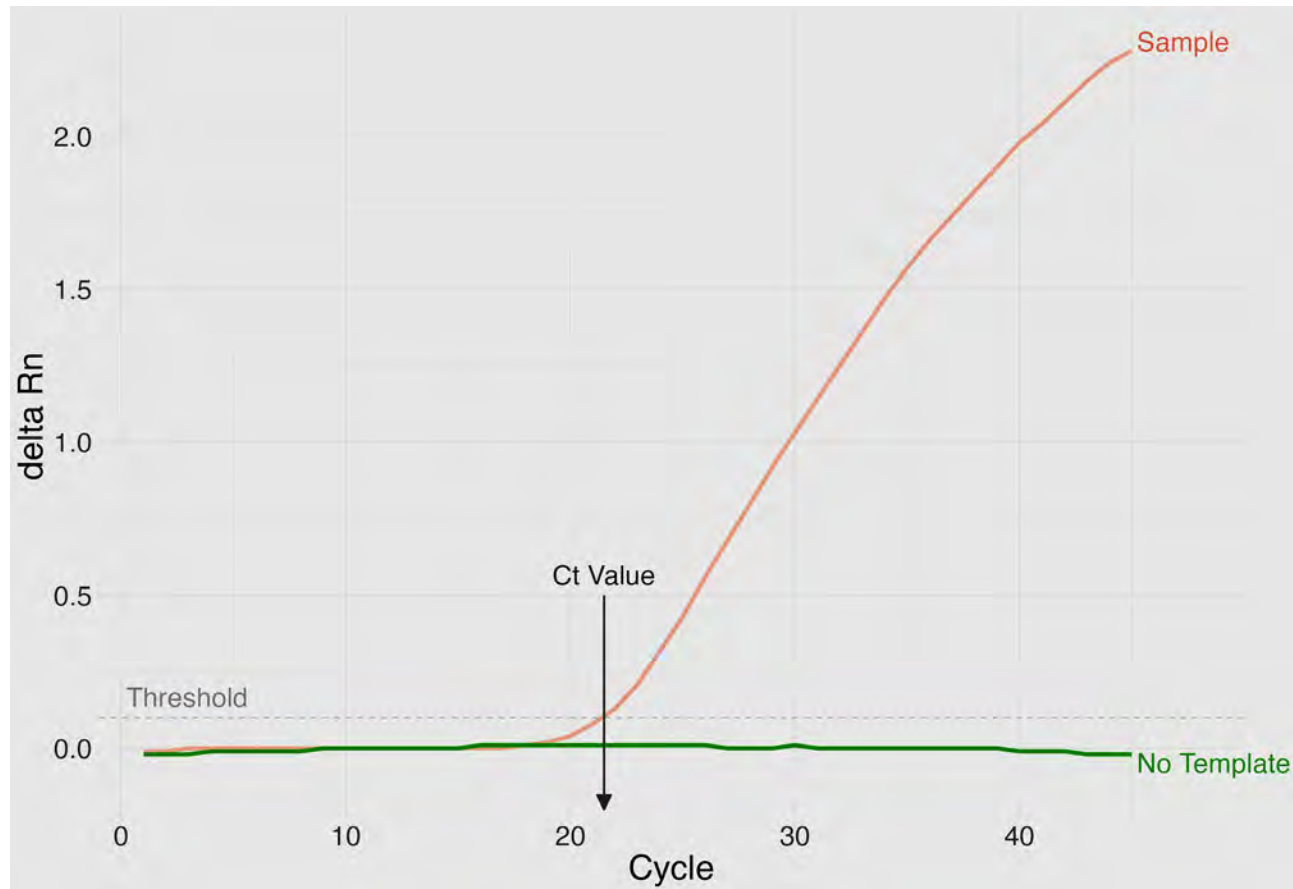
Strand displacement: Die Polymerase löst die Sonde vom Template-DNA-Strang.

Cleavage: Dabei hydrolisiert die Polymerase die Sonde. **Das Reporter-Molekül wird abgespalten** und gerät ausserhalb der Reichweite des Quencher-Moleküls **und beginnt dadurch zu leuchten.**

Polymerisation vervollständigt: Synthese bis zum 3'-Ende der Zielsequenz beendet. **Die Menge des freigesetzten Lichts wird gemessen.**



Auswertung der real time PCR



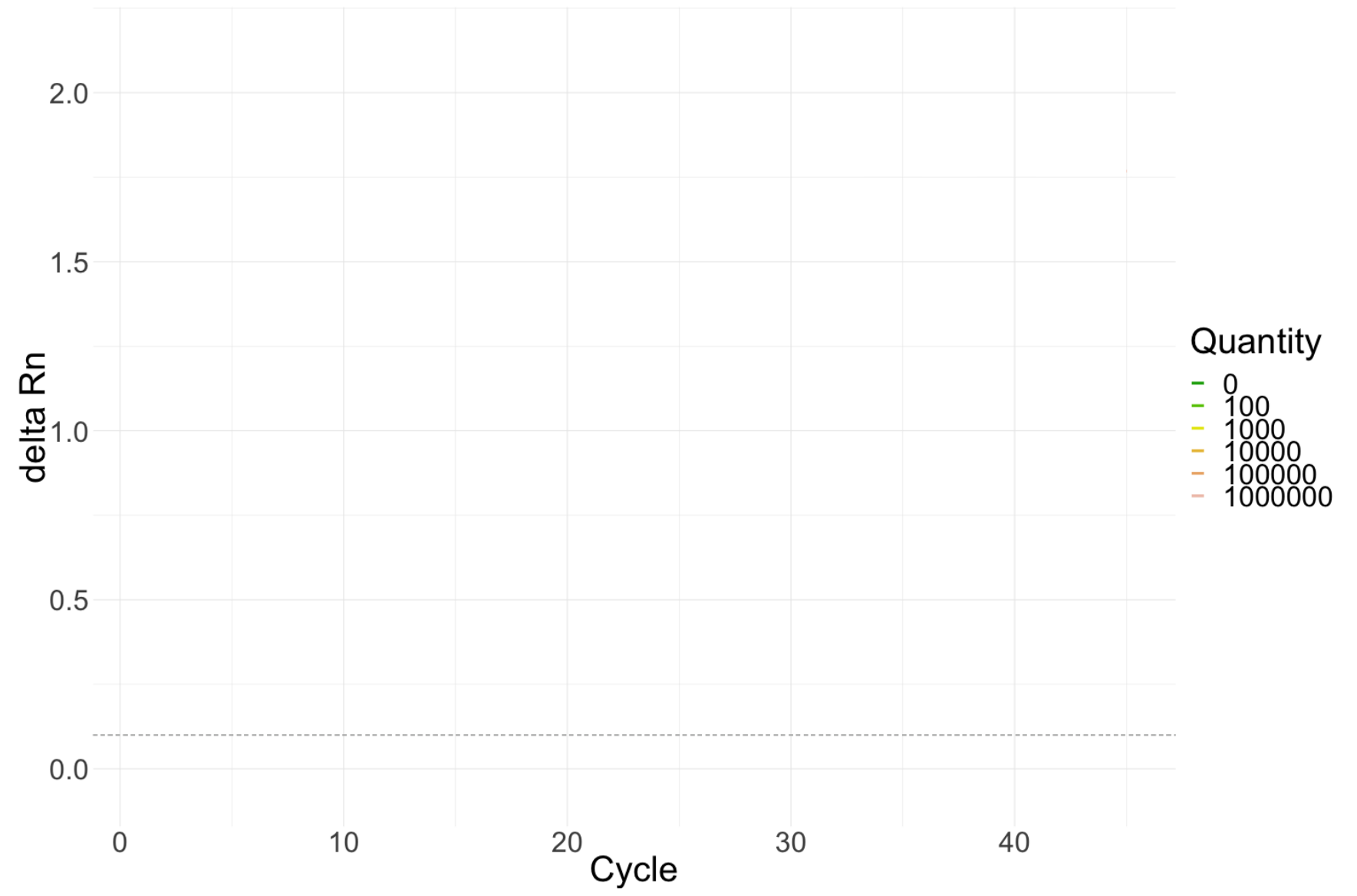
Ct-Wert

- Ct = cycle threshold
- Markiert wenn die Fluoreszenz über den Hintergrundwert (threshold) ansteigt.

ΔRn

- Anstieg des Fluoreszenzsignals bei jedem Zeitpunkt

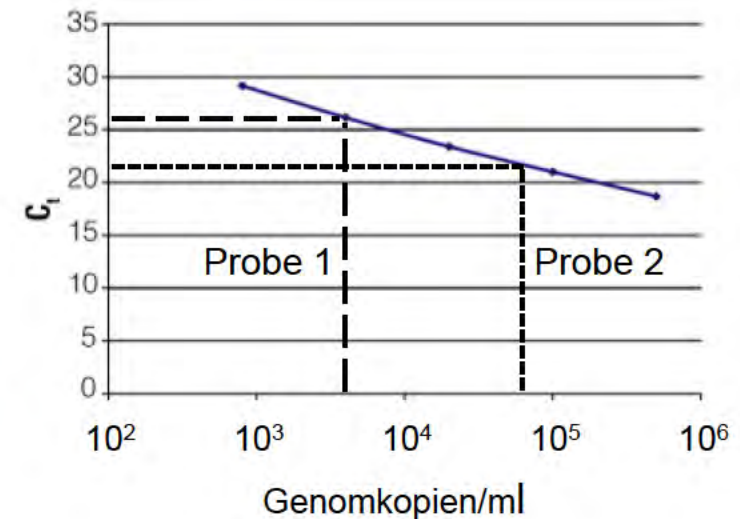
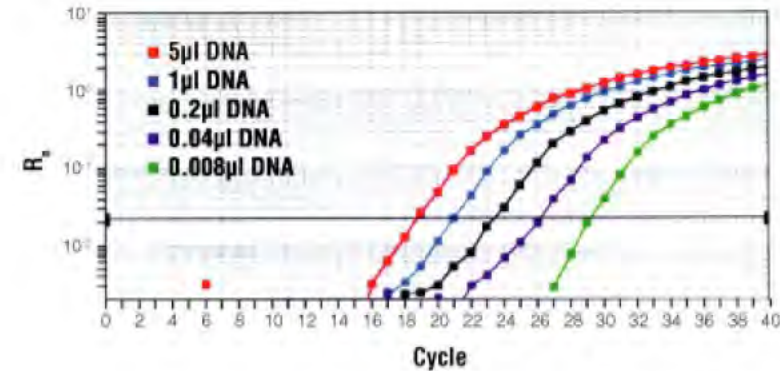
Quantifizierung mittels real-time PCR



Quantifizierung mittels real-time PCR

1. **Messung einer Verdünnungsreihe**
(Standard; DNA-Konzentration bekannt)
2. **Messung der Proben**
3. **Aufzeichnen der Eichkurve**
(Standard Genomkopien/ml versus Ct-Wert)
4. **Quantifizierung der DNA-Konzentration in den unbekannten Proben**
5. **Niedriger Ct Wert:**
 - Bedeutet, dass Signal schon nach wenigen PCR Zyklen ablesbar war daher:

niedriger Ct = hohe Konzentration der Virus DNA in Probe!



Multiplex PCR

Wird vermehrt in Routinediagnostik angewandt, um schnell auf mehrere Viren zu screenen.

Prinzip:

die PCR Reaktion enthält Primer und unterschiedliche markierte Sonden für verschiedene Viren. So können in einer Amplifikation verschiedene Viren nachgewiesen werden.

Vorteil:

- Kostengünstiger als viele einzelne PCR und oft relativ schnell

Probleme:

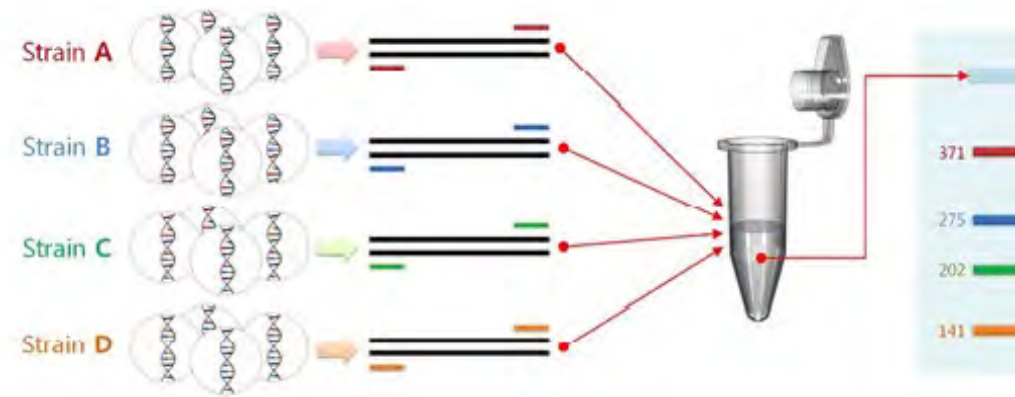
- Schwierig zu etablieren, da Reaktion (Temperatur etc.) nicht individuell angepasst werden kann.
- Zum Teil weniger sensitiv als Einzeltest. Nicht alle Viren werden im Panel gleich sensitiv erkannt.
- Relativ geringer Durchsatz

Kommerzielle Anbieter

Verwendung:

z.B. für screening bei respiratorischen Viren und Bakterien wird ein Multiplex assay angewandt, der 20 verschiedene Erreger erkennen.

Adenovirus, Alpha Coronavirus 229E und NL63, Beta Coronavirus OC43, und HKU1, MERS-CoV, SARS-CoV-2, Rhinovirus/Enterovirus, Influenza A (inkl. Differenzierung H1, H1-2009, H3), Influenza B, Metapneumovirus, Parainfluenza 1, -2, -3, -4, RSV, Bordetella pertussis, Bordetella parapertussis, Chlamydomphila pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae



Sequenzierung

Wichtige Methode in Diagnostik und Forschung

- Medikament Resistenzmutationen
- Genotyping
- Phylogenetische Analysen
- Identifikation neuer Viren mit Next Generation Sequencing (NGS)
- NGS als neues Diagnose Tool

Maximal capacity of Sanger capillary sequencing:

1 million bases per day

=

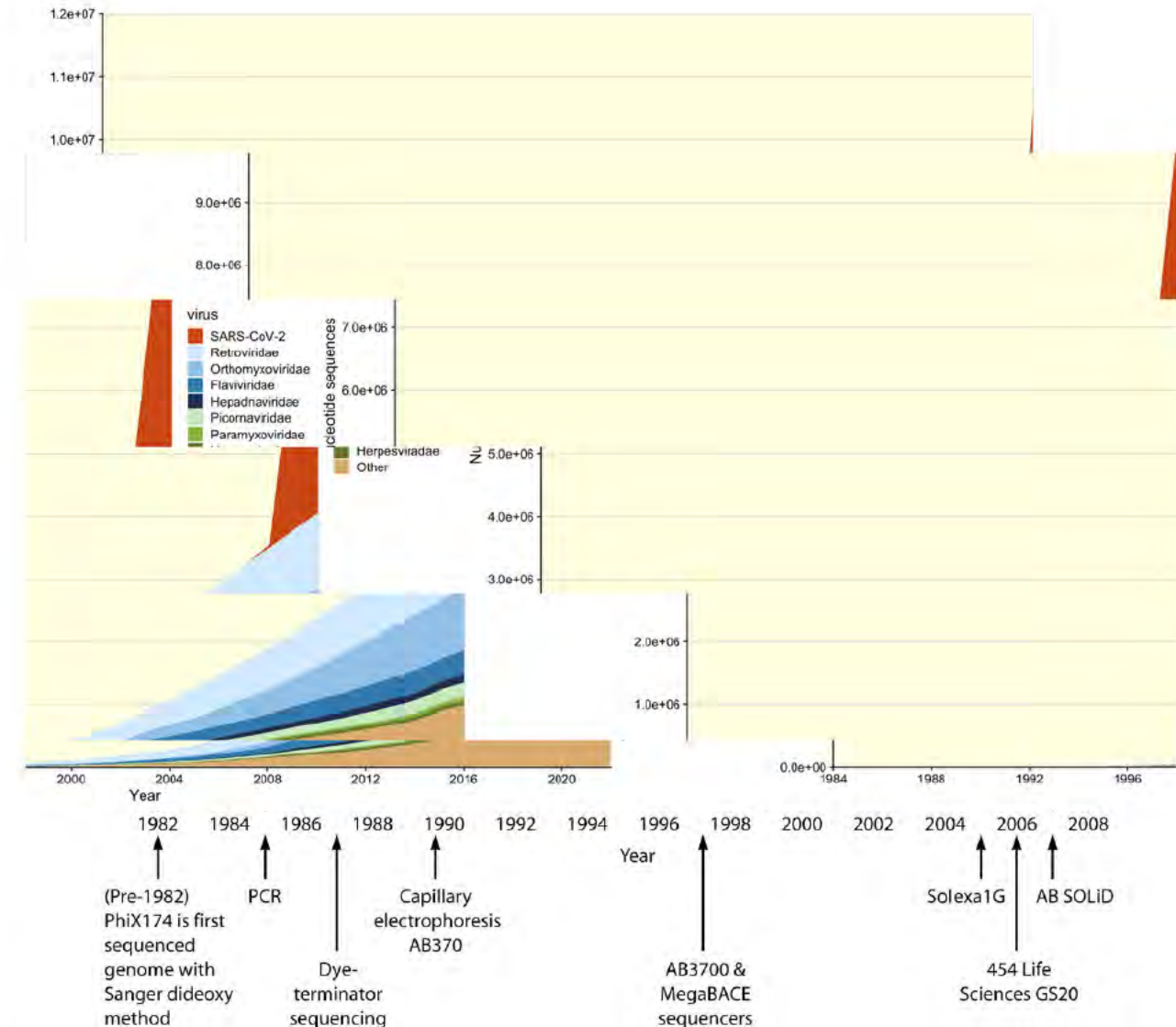
roughly one human genome in 8 years



Capacity of Illumina HiSeq 2000:
500 gigabases of sequence in 10 days

=

roughly one human genome every 2 hr



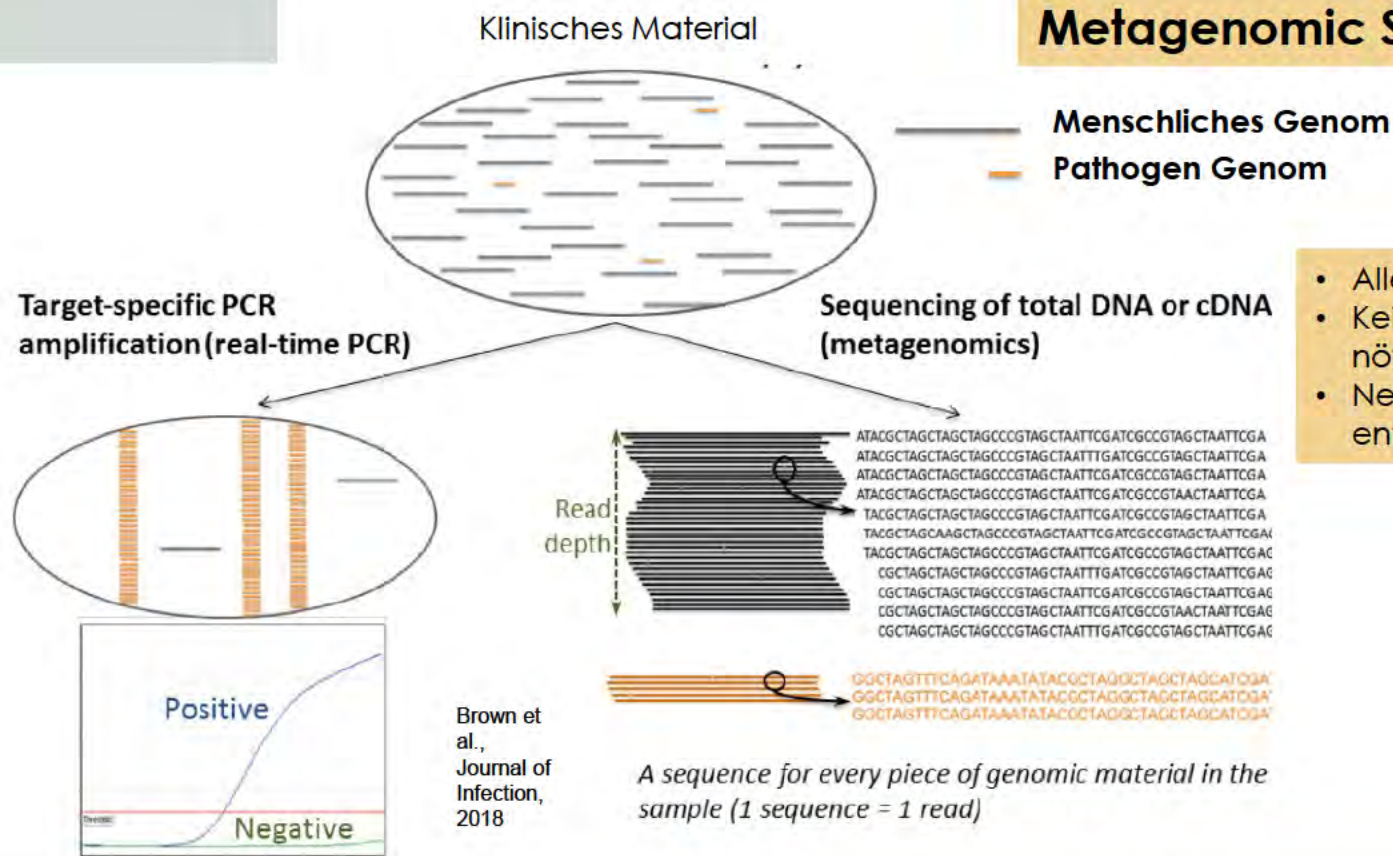
Metagenomic Virus Sequencing

Klassische PCR

Nur spezifisches Genom
amplifiziert (Primer und
Detektoren sind
spezifisch!)

Vorteile:
Hochspezifisch, sensitiv, schnell, günstig

Nachteile:
man findet nur das wonach man sucht!



Brown et al.,
Journal of Infection,
2018

A sequence for every piece of genomic material in the sample (1 sequence = 1 read)

Metagenomic Sequencing

- Alle DNA wird sequenziert.
- Keine spezifischen Sonden nötig.
- Neue/seltene Viren können entdeckt werden.

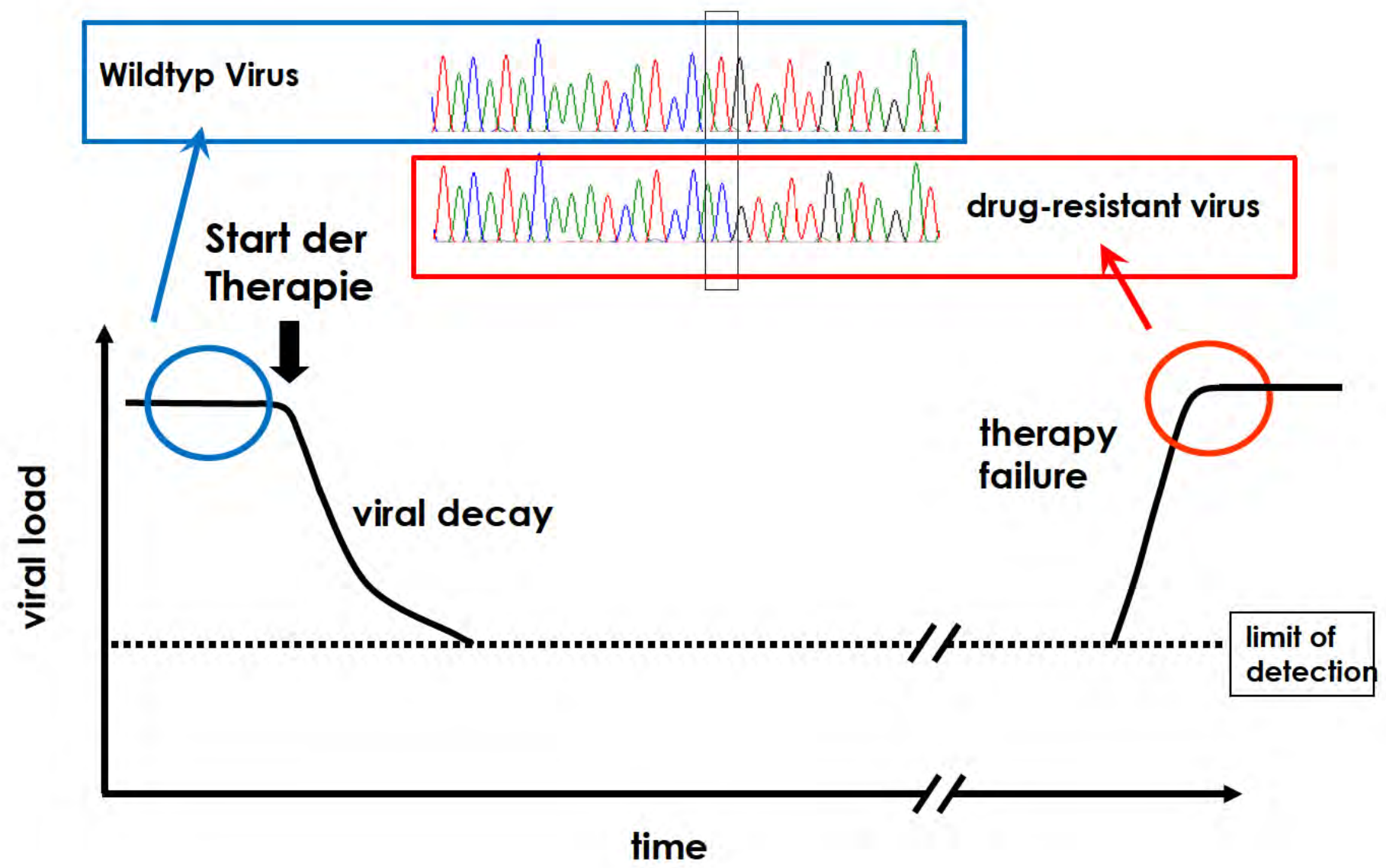
Vorteile:
Unbiased, alles Genome, die in Probe vorhanden sind, können im Prinzip nachgewiesen werden

Nachteile:
Braucht spezielle Technologie, Bioinformatik, teurer, langsamer als PCR

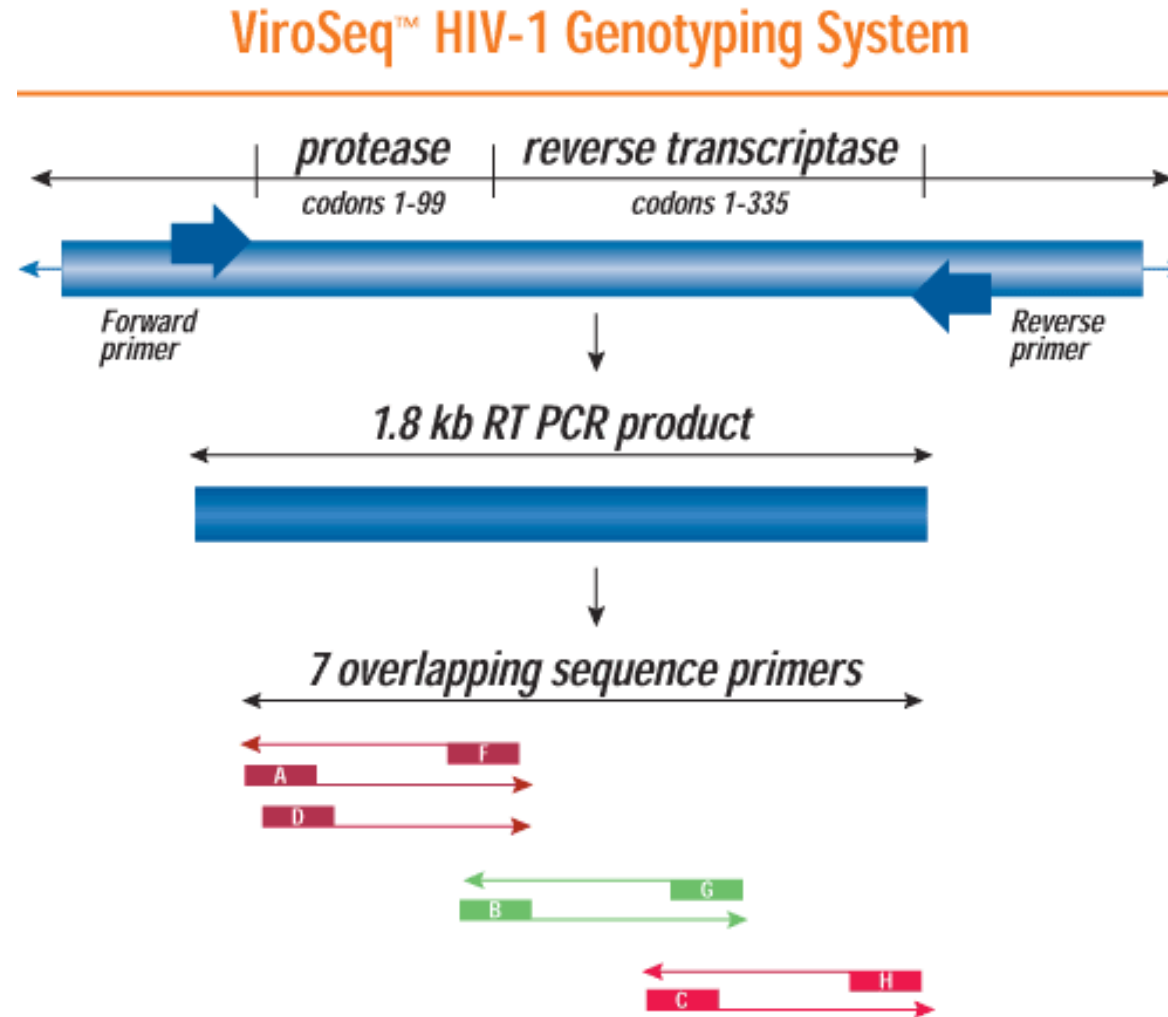
Spezialdiagnostik: genetische Resistenztestung

HIV-Diagnostik			
A. HIV-Screening			Material
<input type="checkbox"/>	HIV-1/2 Screening 4 th Generation (Antibody + p24 Antigen)	<input type="checkbox"/>	HIV-1 p24 Antigen (ohne Dissoziation)
			Plasma oder Serum, 1 mL
B. HIV-Bestätigung gemäss HIV-Testkonzept des BAG			
<input type="checkbox"/>	Line Immunoassay HIV-1 & HIV-2	<input type="checkbox"/>	HIV RNA, erstmalige Viruslast
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	HIV Resistenztest (PR+RT)
			HIV Resistenztest (IN)
EDTA-Blut 7–10 mL oder EDTA-Plasma 2–3 mL			
Bitte alle vorbestehenden Resultate angeben — sie werden für die HIV-Meldung ans BAG benötigt:			
HIV-Screening: <input type="checkbox"/> positiv <input type="checkbox"/> indeterminat Signal/Cutoff Ratio = <input type="text"/>			
HIV-1 RNA <input type="text"/> cc/mL Verwendeter Test: <input type="checkbox"/> Roche TaqMan v2.0 <input type="checkbox"/> Abbott RealTime <input type="checkbox"/> anderer: <input type="text"/>			
C. HIV Genetische Resistenztestung & Korezeptor-Tropismus CCR5/CXCR4			
<input type="checkbox"/>	HIV-1 PR+RT (=Standard)	<input type="checkbox"/>	Neu diagnostiziert
<input type="checkbox"/>	HIV-1 Integrase	<input type="checkbox"/>	Vor 1. Therapie
<input type="checkbox"/>	HIV-1 Env TM	<input type="checkbox"/>	Vor Rescue-TX / Umstellung
<input type="checkbox"/>	HIV-1 Tropismus CCR5/CXCR4	<input type="checkbox"/>	KohortenpatientIn
<input type="checkbox"/>	HIV-2 PR+RT*	<input type="checkbox"/>	ja — bitte Koh.-Nr. auf der Rückseite angeben!
		<input type="checkbox"/>	nein
		Viruslast aktuell	<input type="text"/> cc/mL am <input type="text"/> (Datum)
		vorherige Viruslast	<input type="text"/> cc/mL am <input type="text"/> (Datum)
EDTA-Blut 7–10 mL oder EDTA-Plasma 2–3 mL Liquor 1–2 mL			
Gegenwärtige Therapie: <input type="checkbox"/> Keine <input type="checkbox"/> NRTI <input type="checkbox"/> NNRTI <input type="checkbox"/> PI <input type="checkbox"/> IN <input type="checkbox"/> Fusion TM <input type="checkbox"/> Korezeptor-Antagonist			
D. Virus Load bei gesicherter HIV Infektion			
<input type="checkbox"/>	HIV-1 RNA Viruslast Kopien/mL		
<input type="checkbox"/>	Partikel-assoziierte Reverse Transcriptase mittels PERT Assay, quantitativ		
EDTA-Blut 7–10 mL oder EDTA-Plasma 2–3 mL; Liquor 1–2mL			
E. Einzeltests HIV			
<input type="checkbox"/>	¹ HIV-1 & HIV-2 Screening 4 th Generation	<input type="checkbox"/>	² HIV-1 + HIV-2 Line Immunoassay
<input type="checkbox"/>	³ HIV-1 p24 Antigen, ultrasensitiv	<input type="checkbox"/>	⁴ HIV-1 DNA PCR*
<input type="checkbox"/>	⁵ HIV-1 DNA Gruppe O*	<input type="checkbox"/>	⁶ HIV-2 DNA PCR*
<input type="checkbox"/>	⁷ HIV-1 DNA MEGA-PCR high-input*	<input type="checkbox"/>	⁸ HIV-2 DNA MEGA-PCR high-input*
<input type="checkbox"/>	⁹ HIV-1 RNA-PCR, qualitative (in house)*	<input type="checkbox"/>	¹⁰ HIV-2 RNA-PCR, qualitativ*
<input type="checkbox"/>	¹¹ HIV-1 Gruppe O RNA-PCR, qualitativ*	<input type="checkbox"/>	¹² Reverse Transcriptase mit PERT Assay
<input type="checkbox"/>	¹³ HIV Phylogenetische Analyse*	<input type="checkbox"/>	¹⁴ HIV Virusisolation*
EDTA-Plasma (Serum) ≥1 mL EDTA-Blut 7–10 mL EDTA-Blut 4 x 10 mL (!!!) EDTA-Blut 7–10 mL oder EDTA-Plasma 2–3 mL			
HTLV-1/2 Diagnostik			
<input type="checkbox"/>	^{15A} HTLV-1 & HTLV-2 Antikörper Screening	<input type="checkbox"/>	^{15B} HTLV-1 & HTLV-2 Antikörper Bestätigung/Typisierung mit Line-Immunoassay
<input type="checkbox"/>	¹⁶ HTLV-1 DNA-PCR*	<input type="checkbox"/>	¹⁷ HTLV-2 DNA-PCR*
<input type="checkbox"/>	¹⁸ HTLV-1 Virusisolation*	<input type="checkbox"/>	¹⁹ HTLV-2 Virusisolation*
<input type="checkbox"/>	²⁰ HTLV-1 RNA-PCR*	<input type="checkbox"/>	²¹ HTLV-2 RNA-PCR*
EDTA-Plasma (Serum) ≥1 mL EDTA-Blut 7–10 mL EDTA-Plasma 2–3 mL			
Andere Retroviren			
<input type="checkbox"/>	²² Partikel-assoziierte Reverse Transcriptase mit PERT Assay, quantitativ		
<input type="checkbox"/>	²³ Virusisolation*		
		EDTA-Plasma 2–3 mL EDTA-Blut 7–10 mL	

Resistenzentwicklung gegen antivirale Medikamente



HIV-1 resistance testing: Genotype (bulk sequencing)



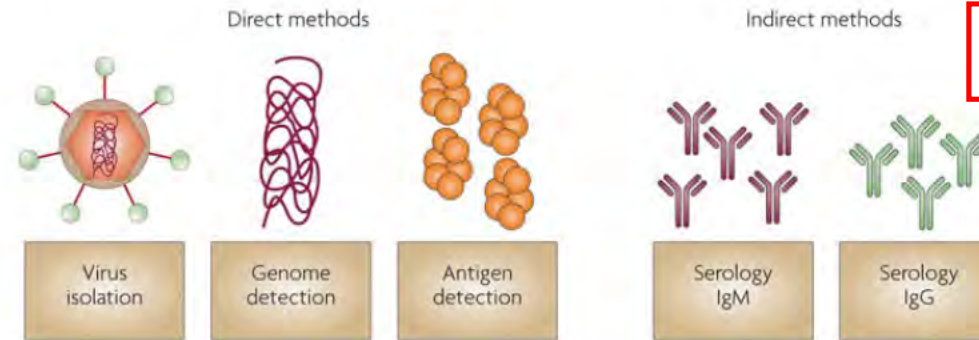
Wichtig

IgM Nachweis = Indikation dass es eine Erstinfektion ist!!!

Wichtig

Serologie:
Nachweis von Virus-
spezifischen Antikörpern:

IgM und IgG, (seltener IgA)



Untersuchungsmaterial (Erläuterungen siehe Rückseite)			
Datum der Entnahme:		<input type="checkbox"/> Nasenblut/Serum <input type="checkbox"/> EDTA-Blut <input type="checkbox"/> Citrat-Blut <input type="checkbox"/> Liquor (Antikörpernachweis nur zusammen mit Blutprobe) <input type="checkbox"/> Abschab-Ort <input type="checkbox"/> Augenabstrich <input type="checkbox"/> Rachenabstrich <input type="checkbox"/> Nasopharyngealsekret (NPS) <input type="checkbox"/> Schallblase (BAL) <input type="checkbox"/> Stuhl <input type="checkbox"/> Urin <input type="checkbox"/> Biopsie <input type="checkbox"/> Anderes: _____	
Tsg. Monat			
Gewünschte Untersuchungen			
Erreger:	Antikörpernachweis		Virusnachweis
	Nachweis:		
Adenoviren	<input type="checkbox"/> IgG <input type="checkbox"/> IgM	<input type="checkbox"/> Kultur allg. für breites Virusspektrum (Isolierung & Typisierung)	<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	<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	<input type="checkbox"/> Kultur <input type="checkbox"/> PCR
Enteroviren	<input type="checkbox"/> IgG <input type="checkbox"/> IgM	<input type="checkbox"/> Kultur <input type="checkbox"/> PCR	<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"/> PCR	<input type="checkbox"/> Kultur <input type="checkbox"/> PCR
Herpes Simplex Virus Typ 1	<input type="checkbox"/> IgG <input type="checkbox"/> IgM	<input type="checkbox"/> Kultur <input type="checkbox"/> PCR	<input type="checkbox"/> Kultur <input type="checkbox"/> PCR
Herpes Simplex Virus Typ 2	<input type="checkbox"/> IgG <input type="checkbox"/> IgM	<input type="checkbox"/> Kultur <input type="checkbox"/> PCR	<input type="checkbox"/> Kultur <input type="checkbox"/> PCR
HMV 1&2	<input type="checkbox"/> Screeningtest	<input type="checkbox"/> Kultur <input type="checkbox"/> PCR	<input type="checkbox"/> Kultur <input type="checkbox"/> PCR
Humanes Herpes Virus Typ 6 (HHV-6)	<input type="checkbox"/> Screeningtest	<input type="checkbox"/> Kultur <input type="checkbox"/> PCR	<input type="checkbox"/> Kultur <input type="checkbox"/> PCR
Influenzavirus A (inkl. H1N1 neu) B	<input type="checkbox"/> Screeningtest	<input type="checkbox"/> Kultur <input type="checkbox"/> PCR	<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	<input type="checkbox"/> Kultur <input type="checkbox"/> PCR
Mumpfvirus	<input type="checkbox"/> IgG <input type="checkbox"/> IgM	<input type="checkbox"/> Kultur <input type="checkbox"/> PCR	<input type="checkbox"/> Kultur <input type="checkbox"/> PCR
Noroviren	<input type="checkbox"/> Screeningtest	<input type="checkbox"/> Kultur <input type="checkbox"/> PCR	<input type="checkbox"/> Kultur <input type="checkbox"/> PCR
Parainfluenzavirus 1/2/3/4	<input type="checkbox"/> Screeningtest	<input type="checkbox"/> Kultur <input type="checkbox"/> PCR	<input type="checkbox"/> Kultur <input type="checkbox"/> PCR
Parvovirus B19	<input type="checkbox"/> IgG <input type="checkbox"/> IgM	<input type="checkbox"/> Kultur <input type="checkbox"/> PCR	<input type="checkbox"/> Kultur <input type="checkbox"/> PCR
BK-Polyomavirus	<input type="checkbox"/> Screeningtest	<input type="checkbox"/> Kultur <input type="checkbox"/> PCR	<input type="checkbox"/> Kultur <input type="checkbox"/> PCR
JC-Polyomavirus	<input type="checkbox"/> Screeningtest	<input type="checkbox"/> Kultur <input type="checkbox"/> PCR	<input type="checkbox"/> Kultur <input type="checkbox"/> PCR
Respiratory Syncytial Virus (RSV)	<input type="checkbox"/> Screeningtest	<input type="checkbox"/> Kultur <input type="checkbox"/> PCR	<input type="checkbox"/> Kultur <input type="checkbox"/> PCR
Rhinoviren	<input type="checkbox"/> Screeningtest	<input type="checkbox"/> Kultur <input type="checkbox"/> PCR	<input type="checkbox"/> Kultur <input type="checkbox"/> PCR
Rotaviren	<input type="checkbox"/> Screeningtest	<input type="checkbox"/> Kultur <input type="checkbox"/> PCR	<input type="checkbox"/> Kultur <input type="checkbox"/> PCR
Rotavirus (Rubella)	<input type="checkbox"/> IgG <input type="checkbox"/> IgM	<input type="checkbox"/> Kultur <input type="checkbox"/> PCR	<input type="checkbox"/> Kultur <input type="checkbox"/> PCR
Varicella Zoster Virus (VZV)	<input type="checkbox"/> IgG <input type="checkbox"/> IgM	<input type="checkbox"/> Kultur <input type="checkbox"/> PCR	<input type="checkbox"/> Kultur <input type="checkbox"/> PCR
Zeckenencephalitis Virus (FSME)	<input type="checkbox"/> IgG <input type="checkbox"/> IgM	<input type="checkbox"/> Kultur <input type="checkbox"/> PCR	<input type="checkbox"/> Kultur <input type="checkbox"/> PCR
Toxoplasma gondii	<input type="checkbox"/> IgG <input type="checkbox"/> IgM <input type="checkbox"/> IgA	<input type="checkbox"/> Kultur <input type="checkbox"/> PCR	<input type="checkbox"/> Kultur <input type="checkbox"/> PCR
<input type="checkbox"/> Erstuntersuchung	<input type="checkbox"/> IgG-Avidität	<input type="checkbox"/> Kultur <input type="checkbox"/> PCR	<input type="checkbox"/> Kultur <input type="checkbox"/> PCR
<input type="checkbox"/> Folgeuntersuchung	<input type="checkbox"/> IgG-Avidität	<input type="checkbox"/> Kultur <input type="checkbox"/> PCR	<input type="checkbox"/> Kultur <input type="checkbox"/> PCR
* Bei Ausbrüchen in geschlossenen Institutionen (Spitäler, Heimen, etc.) (in Absprache mit dem Hygieneverantwortlichen) ** Nicht im akkreditierten Analysenspektrum		Materialbestellung <input type="checkbox"/> Virus-Transportmedium <input type="checkbox"/> Auftragsformulare <input type="checkbox"/> Urin-Transportmedium	

Korrekte Diagnose benötigt geeignete Proben und Nachweismethode zum richtigen Zeitpunkt

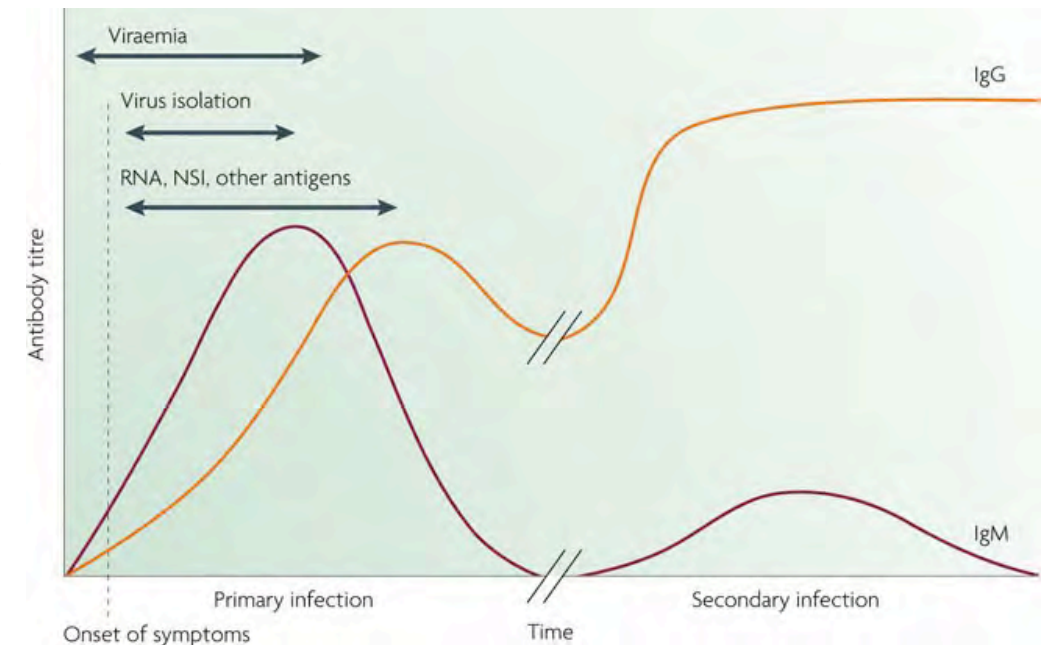
Erfolgreiche Diagnostik braucht profundes Wissen über:

- **Gewebsspezifität**

- Wo repliziert das Virus? **Wichtig**
 - Welche Gewebeproben muss ich entnehmen, welche machen keinen Sinn?
- Ist das Virus virämisch?
 - Kann Virus in Blut nachgewiesen werden?

- **Replikationskinetik des Virus:**

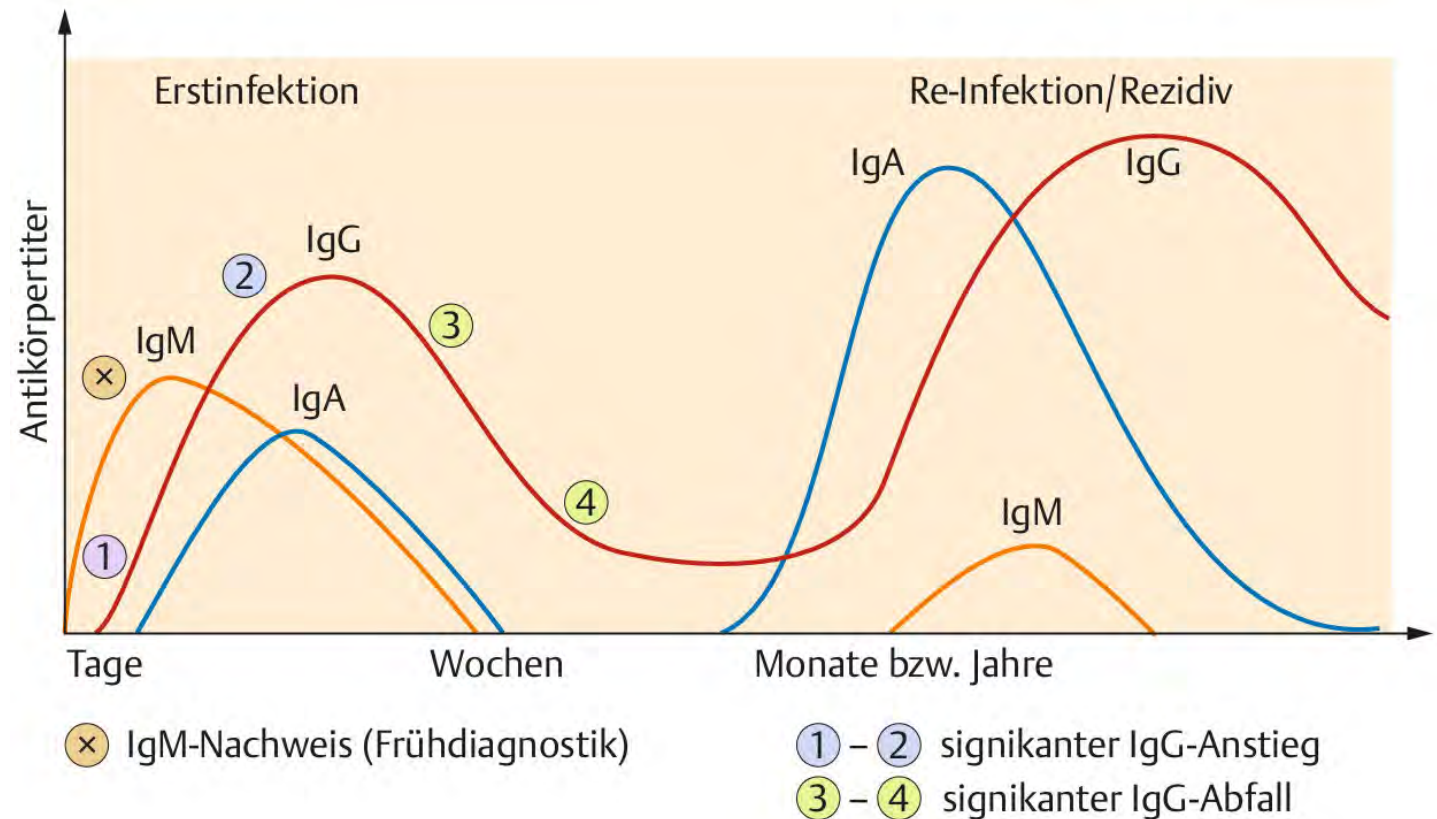
- Wie schnell nach Infektion repliziert das Virus?
- Ab wann ist es wo nachweisbar?
- Welche Antigene sind wann in der Infektion nachweisbar?



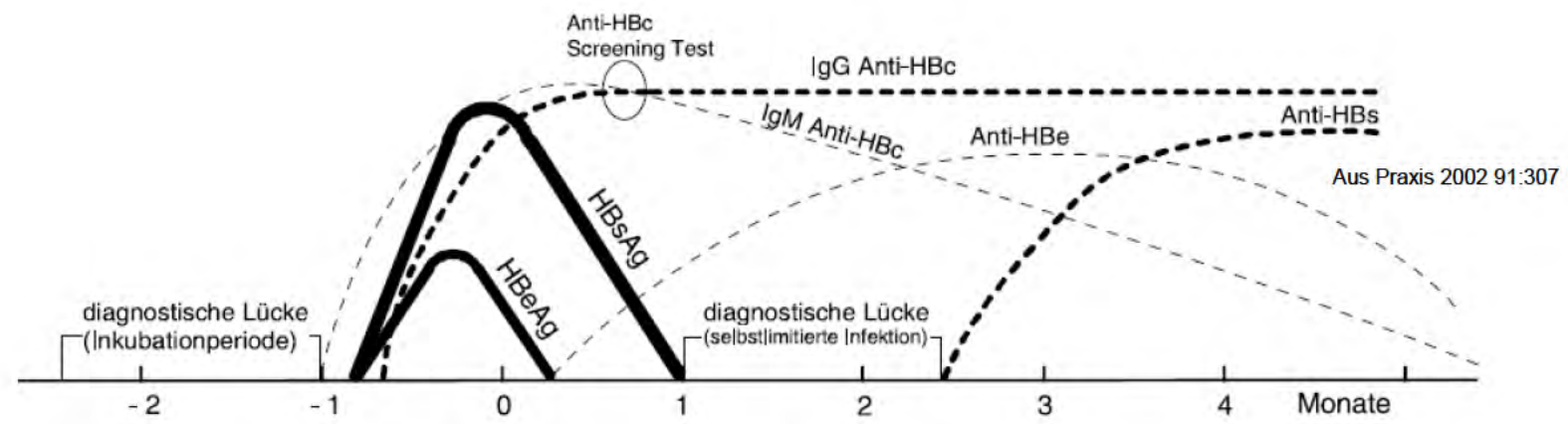
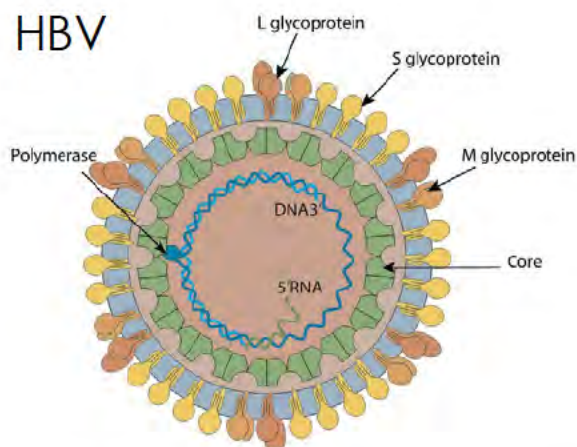
Beispiel Dengue Virusinfektion

Ig Subtyp, Titer Abfall und Anstieg können Aufschluss zum Status der Infektion bieten

- ❑ IgM , IgA und IgG Titer variieren, je nachdem ob Primär- oder Sekundärinfektion vorliegt.
- ❑ Abfall und Anstieg von IgM und Kombination mit IgG Titer gibt Hinweise, ob Erstinfektion vorliegt
- ❑ Bestimmung braucht serielle (longitudinale) Proben!

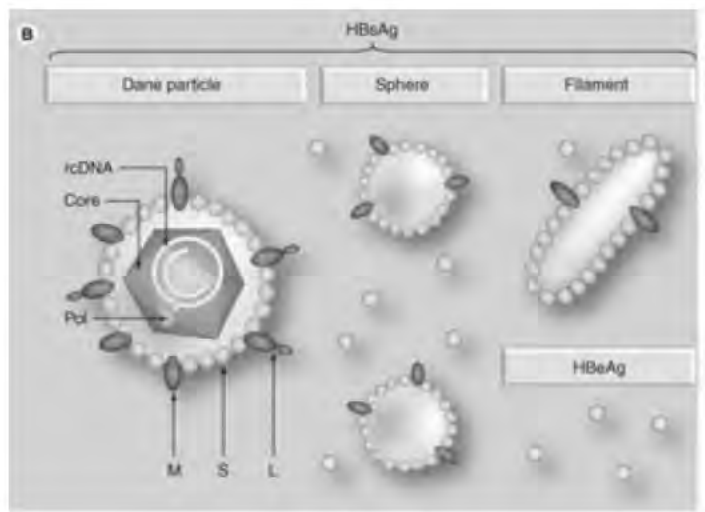


Diagnose der Hepatitis B Virus Infektion: Komplex!



HBV Proteine	
S	Small surface protein
M	Middle surface protein
L	Large surface protein
Core	Capsidprotein
HBeAg	Secreted antigen
Pol	Polymerase
HBx	X protein (not secreted)

Wichtige Antigene für Serologie Diagnostik



Diagnose der Hepatitis B Virus Infektion: Komplex!

Antigen und Ig Profil gibt Auskunft über Infektionsstatus

Status der HBV Infektion	HBs-Antigen	Anti-HBc IgM	Anti-HBc IgG/IgM	Anti-HBs
Akute Infektion mit HBV	+	+	-/+	-
Chronische Infektion mit HBV	+	-	+	-
Status nach geklärter HBV Infektion	-	-	+	+
Immun durch Impfung	-	-	-	+

IgM verschwindet schnell

Direkte und indirekte Information zur Infektiösität

Information zur Infektiösität	HBV DNA PCR	HBe-Antigen	Anti-HBe
Quantifizierung infektiöser Partikel	Direkter Nachweis		
Hohe Infektiösität		Freies HBe im Blut nachweisbar	nein
Niedrige Infektiösität		Abnehmendes/kein HBe	ja

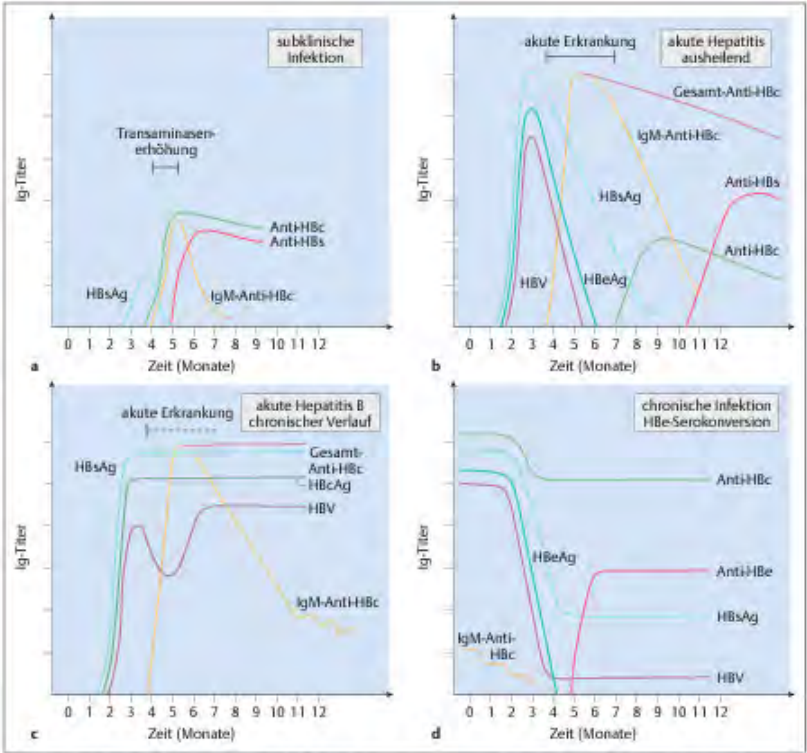
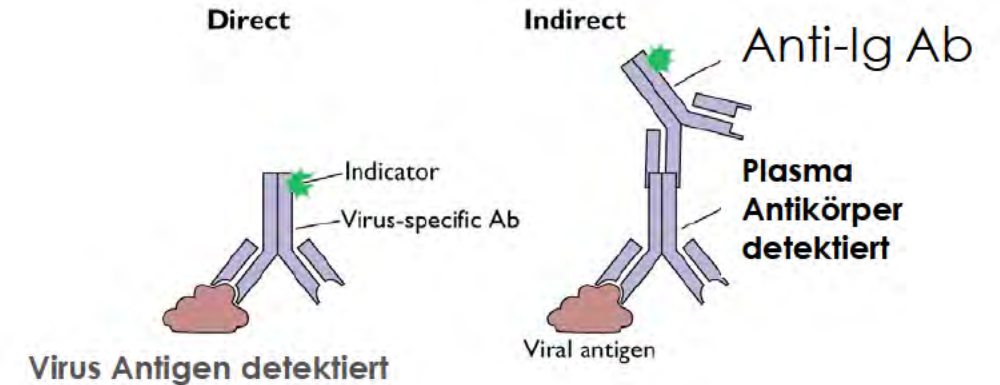


Abb. 36.10a-d Verläufe verschiedener HBV-Infektionsformen. Anmerkung: HBV selbst ist nicht zytopathogen – Erkrankung durch Zytopathogene.

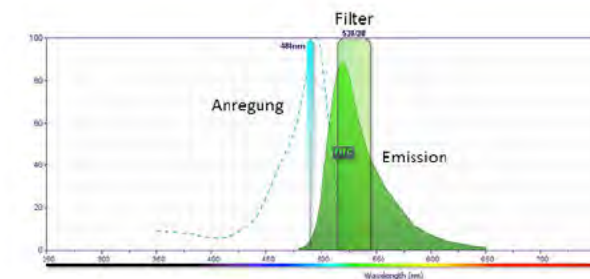
Immunfärbung (Immunostaining)

- **Nachweis in Gewebe, Zellkultur**
- **Direkte Immunfärbung von Virusantigen**
 - markierter Detektor-Antikörper wird verwendet, um virale Proteine in infizierten Zellen zu markieren
- **Indirektes Immunostaining von Patientenantikörpern**
 - Virus infizierte Zellen werden präpariert. Reaktivität von Plasmaantikörpern des Patienten mit Virusantigenen untersucht.
 - Patienten Antikörper werden durch markierten anti-Ig Antikörper detektiert.
- **Markierungs/Labeling Verfahren:**
 - enzymatisch
 - kolorimetrisch
 - fluoreszierend
 - lumineszierend
 - radioaktiv



Beispiel Fluorescein isothiocyanat (FITC) label:

- Anregung bei 488 nm (blau)
- Emission bei 520 nm (grün)
- Detektionsfilter: 530/30



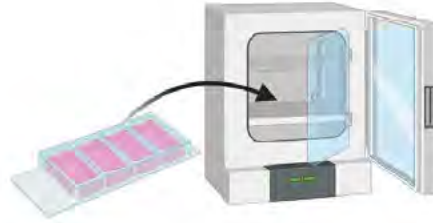
Virus–Antigennachweis mittels Immunfluoreszenz



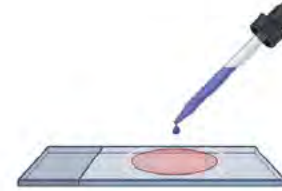
Patienten Urin-
Probe mit
Verdacht auf
CMV Infektion



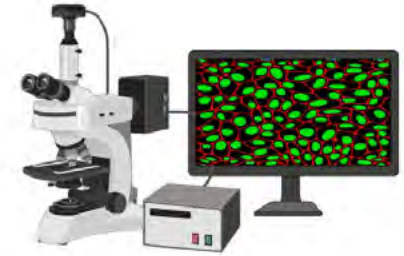
Zugabe von Urin-
Probe auf
Objektträger mit
MRC-5 Zellen



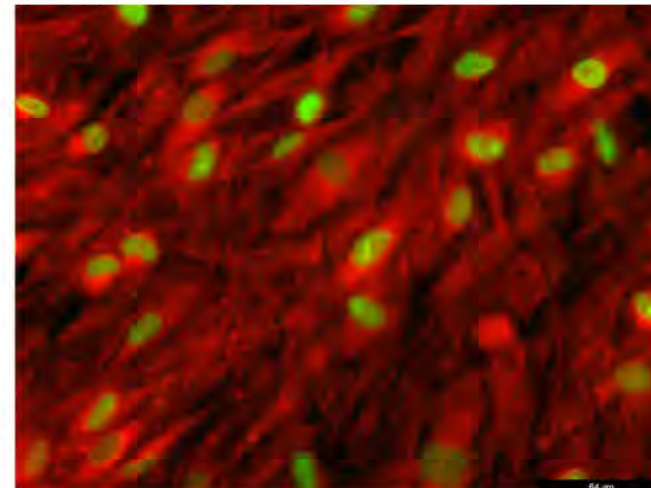
Inkubation des
Objektträgers bei
37°C für 2 Tage



Fixieren und Färbung der
Zellen mit **fluoreszenz-
markierten monoklonalen
Antikörpern** gegen CMV
Antigen



Auswertung unter
dem Immun-
fluoreszenz-
mikroskop



MRC-5 Zellen in rot
CMV Antigen in grün

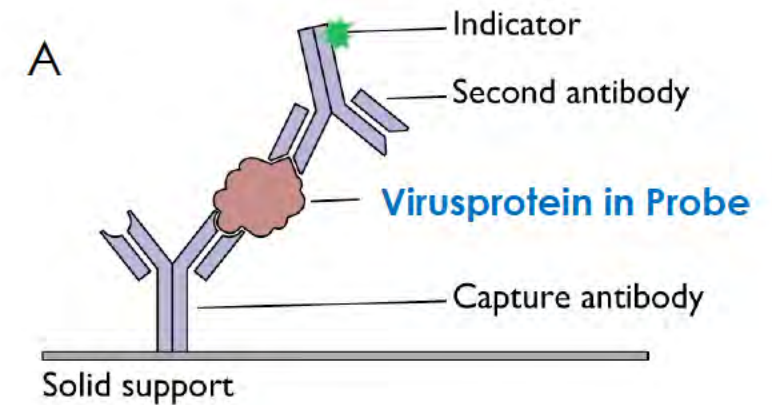
Ansicht durchs
Mikroskop

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ELISA ermöglichen den Nachweis von **viralen Antigenen** und **virusspezifischen Antikörpern**

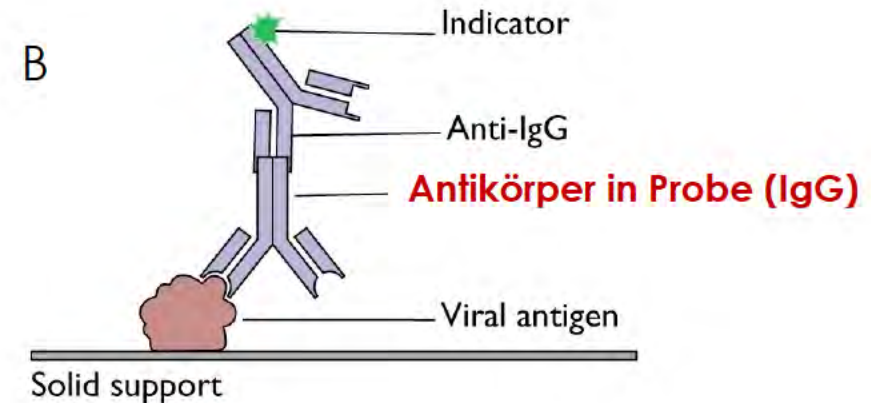
(A) Antigen capture ELISA

- Virusprotein soll nachgewiesen werden
- ELISA wird als Sandwich ELISA durchgeführt:
Capture Antikörper ist auf MTrägermaterial immobilisiert
- **Prinzip genutzt für Antigen-Schnelltests**



(B) Antibody ELISA

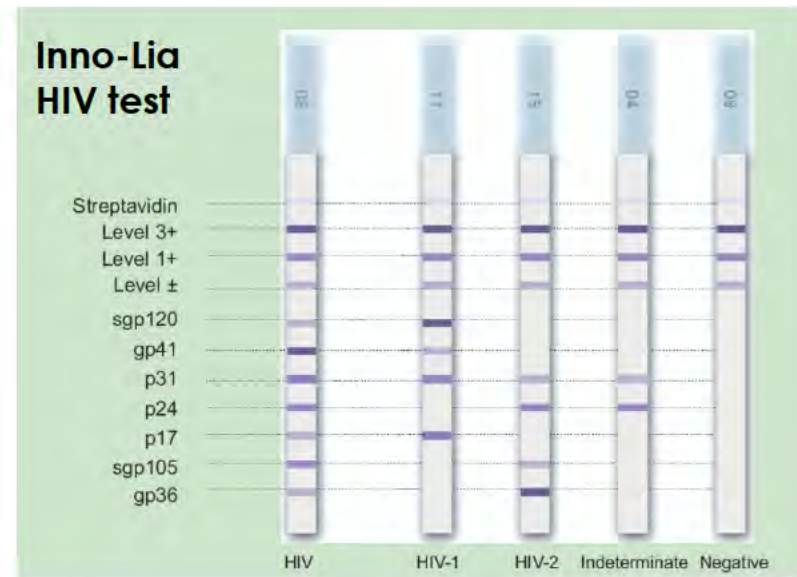
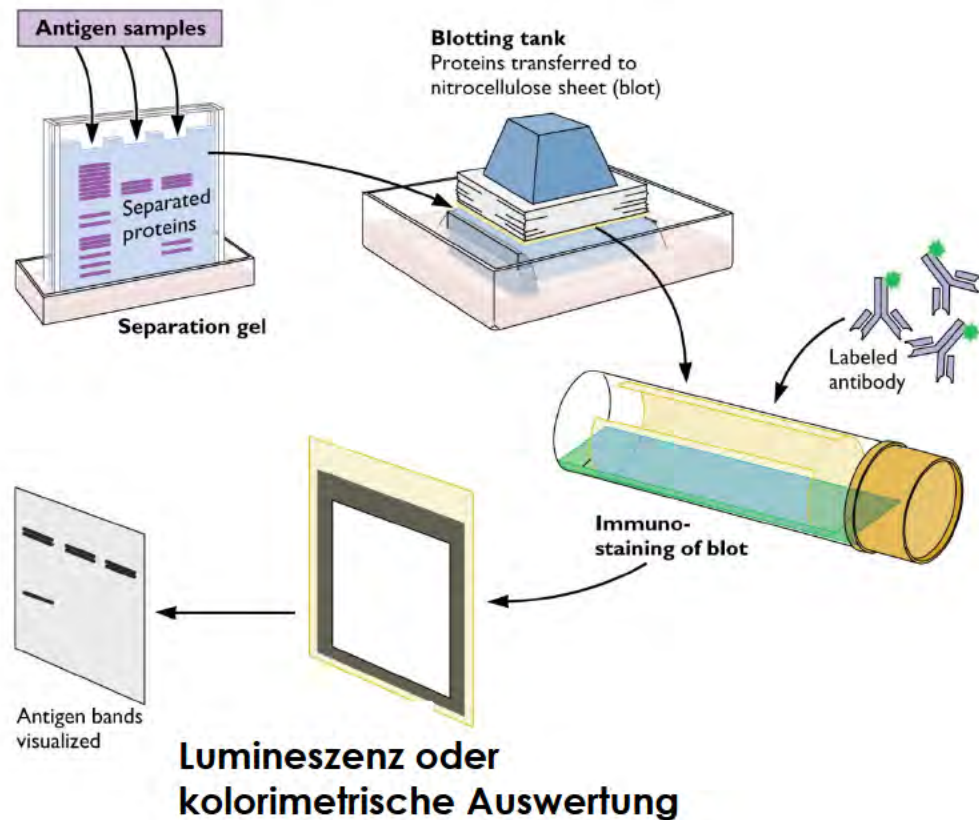
- Virusspezifische Antikörper werden im Serum des Pateinten nachgewiesen
- Zum Teil mehrere ELISA für verschiedene Antigene notwendig (HBV)
- ELISA kann verschieden durchgeführt werden:
 - mit direkt an Platte gekoppeltem Antigen (siehe B)
 - indirekt (Sandwich ELISA)



Western Blot

Wird in Diagnostik verwendet

- um Antikörper gegen virale Proteine zu erkennen
- um Virusantigene zu detektieren



Virusisolation – Vorteile und Nachteile

VORTEILE



Breites Virenspektrum
erfassbar



Hohe Sensitivität



Kostengünstiges
Verfahren



Identifikation neuer
Virusstämme

NACHTEILE



Zeitaufwändig



Braucht viel Erfahrung



Einige Viren können
nicht kultiviert werden
(z.B. HBV, HCV)

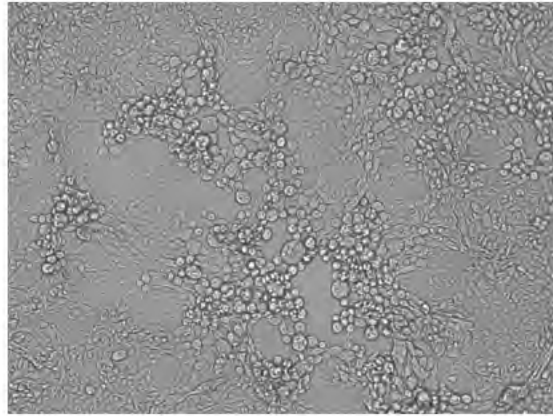
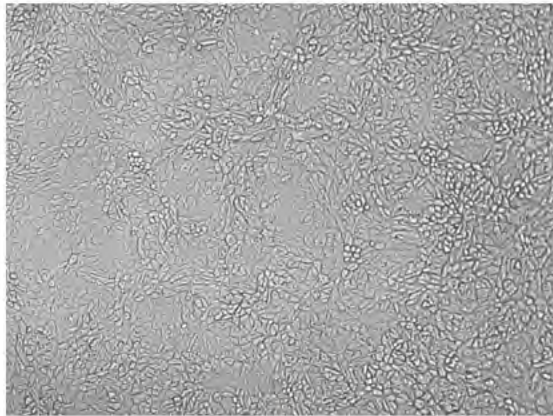
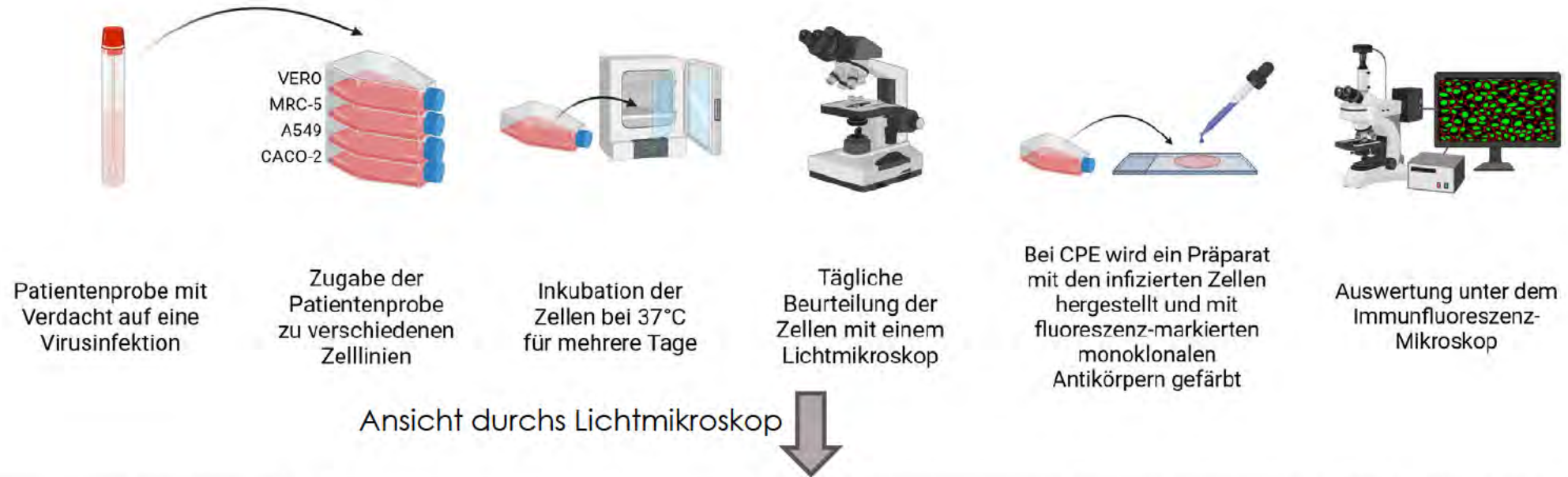


Bakterien in der Probe
schaden den Zellen

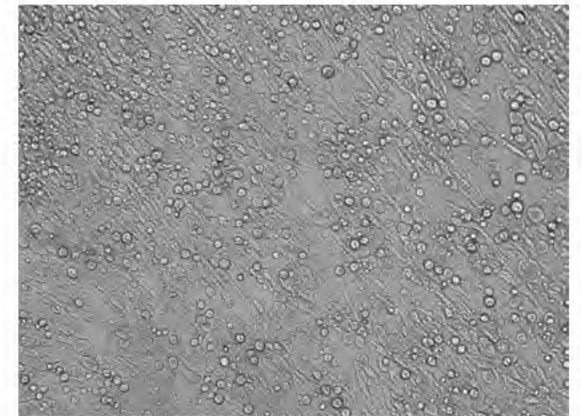
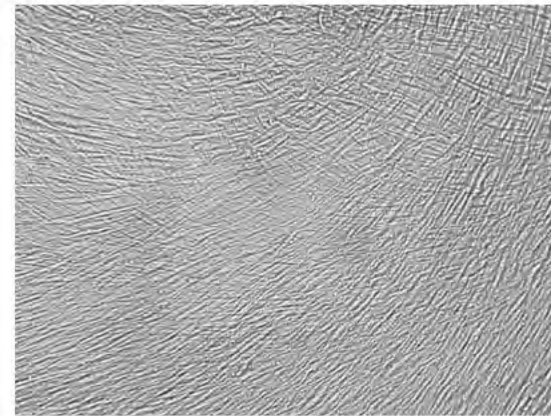


Transport und Lagerung
können der Vermehrungs-
fähigkeit der Viren schaden

Virusisolation – Beurteilung des Zytopathischen Effekts (CPE)



VERO Zellen ohne und mit zytopathischem Effekt (CPE) aufgrund einer HSV-Infektion



MRC-5 Zellen ohne und mit zytopathischem Effekt aufgrund einer HSV-Infektion

Überblick Laborkurs Virologie

Thema: Diagnostik von SARS-CoV-2



Kurstag 1: Direkter Virusnachweis – SARS-CoV-2

Einführung: Methoden zum Virusnachweis

- Welche Methoden gibt es?
- Welche Vor - und Nachteile bieten die unterschiedlichen Methoden?
- Ablauf Probenerfassung und Durchführung der PCR im Diagnostiklabor des IMV

Praktischer Teil:

- Durchführung eines Antigen-Schnelltests
- Durchführung einer PCR
- Übung zur Sensitivität und Spezifität von Schnelltests

Überblick Laborkurs Virologie

Kurstag 2: CMV Serologie

Datenanalyse Kurstag 1

- Besprechung der PCR und Schnelltest Resultate

Einführung: Indirekter Virusnachweis Serologie

- Welche Methoden gibt es?
- Welche Vor - und Nachteile bieten die unterschiedlichen Methoden?
- Ablauf im Diagnostiklabor des IMV

Praktischer Teil:

- Durchführung eines Antikörper Elisa Tests
- Arbeitsblatt: CMV Diagnostik

Überblick Laborkurs Virologie

Durchführung:

- In Präsenz an zwei Kurstagen
- Raum Y14-F-41
- **Bitte Laptop o.ä. mitbringen, um an interaktiven Übungen teilzunehmen!**

Tag 1	Datum	Start	Ende	Gruppe
Montag	02.12.2024	14:00	15:45	Humanmedizin B 5. FS 65-88
Dienstag	03.12.2024	16:15	18:00	Humanmedizin B 5. FS 1-6, Chiro Chiropraktik B 5. FS 1a-4a, HSG StGallen B 5. FS 1-6, LU Luzern B 5. FS 1-6
Donnerstag	05.12.2024	14:00	15:45	Humanmedizin B 5. FS 7-16, HSG StGallen B 5. FS 7-14, LU Luzern B 5. FS 7-13
Donnerstag	05.12.2024	16:15	18:00	Humanmedizin B 5. FS 17-40
Tag 2				
Montag	9.12.2024	14:00	15:45	Humanmedizin B 5. FS 65-88
Dienstag	10.12.2024	16:15	18:00	Humanmedizin B 5. FS 1-6, Chiro Chiropraktik B 5. FS 1a-4a, HSG StGallen B 5. FS 1-6, LU Luzern B 5. FS 1-6
Donnerstag	12.12.2024	16:15	18:00	Humanmedizin B 5. FS 17-40
Freitag	13.12.2024	16:30	18:15	Humanmedizin B 5. FS 7-16, HSG StGallen B 5. FS 7-14, LU Luzern B 5. FS 7-13

Was Sie aus dieser Vorlesung mitnehmen sollten



- ☐ Der Nachweis von Virusinfekten benötigt direkte und indirekte Methoden
- ☐ Direkte Methoden weisen das Virusgenom oder Antigen nach
 - ☐ Der Nachweis des Genoms mittels PCR gehört heute zu den wichtigsten Verfahren
 - ☐ Sie verstehen das Prinzip der qualitativen und quantitativen PCR
- ☐ Indirekte Methoden weisen die Immunantwort zu Viren nach
 - ☐ Serologischer Nachweis
- ☐ Das richtige Probenmaterial zum richtigen Zeitpunkt ist essenziell für die Diagnose

Fragen zur Vorlesung?