

La diagnostica di laboratorio delle infezioni emergenti Il nuovo coronavirus 2019-nCoV

Concetta Castilletti

**Presentazione delle indicazioni regionali per la gestione di eventuali casi
con sospetta patologia da nuovo coronavirus**

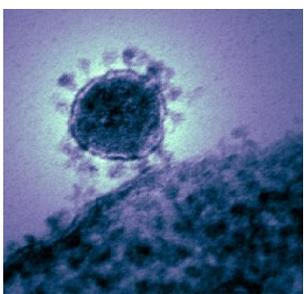
Istituto Nazionale per le Malattie Infettive (INMI) "Lazzaro Spallanzani", Roma
24 gennaio 2020



World Health Organization

*WHO Collaborating Center for clinical care, diagnosis,
response and training on Highly Infectious Diseases*





INMI

La missione del Laboratorio di Virologia

Il Laboratorio di Virologia dell'INMI è impegnato su vari aspetti inerenti la ricerca e la diagnosi di infezioni da virus emergenti

Il Laboratorio fornisce:

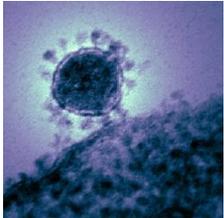
- ✧ Un servizio diagnostico in grado di supportare i clinici nella diagnosi e nella gestione delle infezioni sostenute da patogeni poco comuni (per i quali spesso non esiste alcun test commerciale)
 - ✓ approfondimenti ed esami per la diagnosi differenziale
 - ✓ valutazione, sviluppo e validazione di test
- ✧ Formazione/informazione sugli aspetti diagnostici rilevanti
- ✧ Consulenza/operatività h24



Presentazione delle indicazioni regionali per la gestione di eventuali casi con sospetta patologia da nuovo coronavirus

Istituto Nazionale per le Malattie Infettive (INMI) "Lazzaro Spallanzani"

Roma 24 gennaio 2020

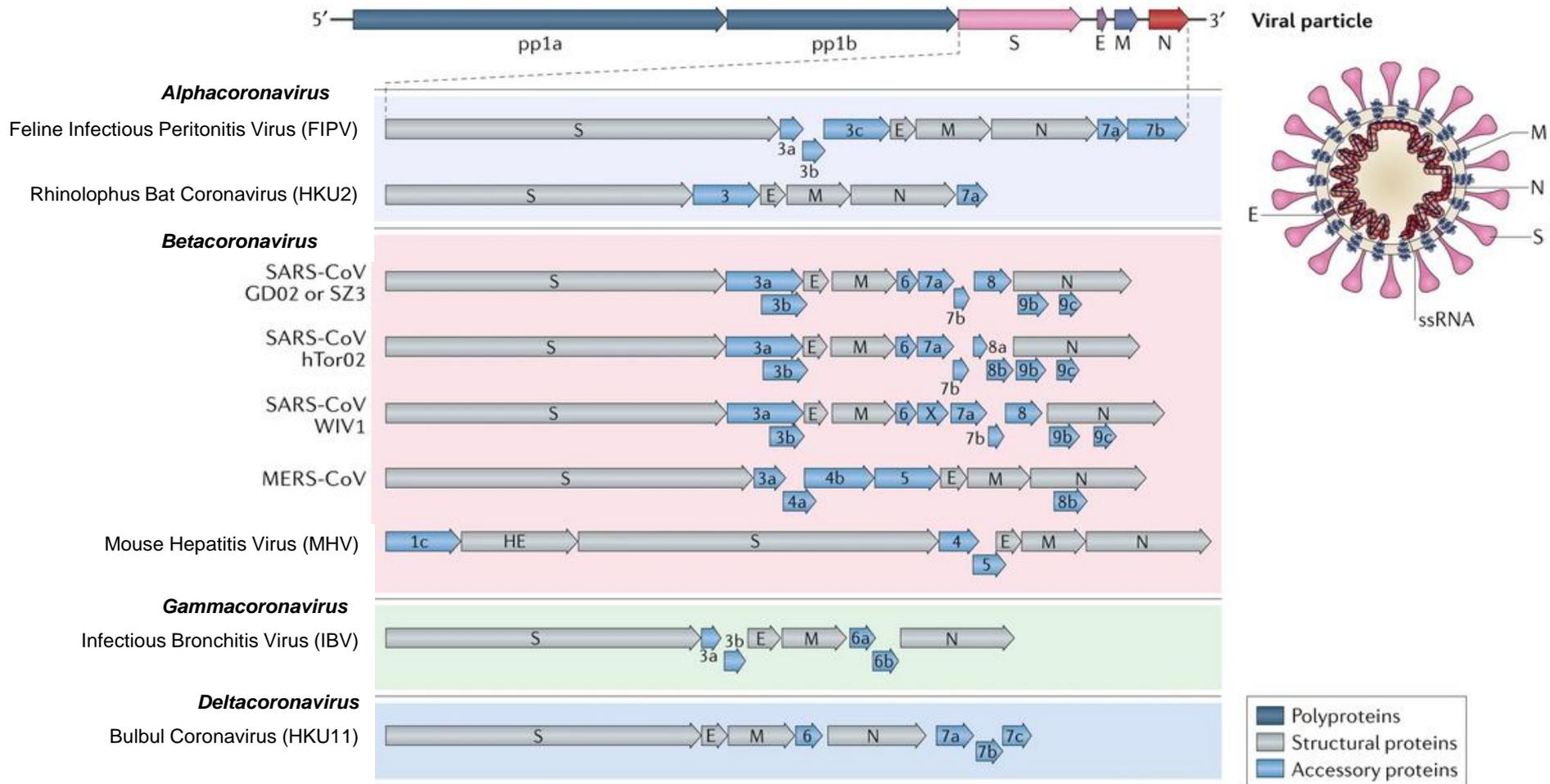


Criticità della diagnostica di laboratorio

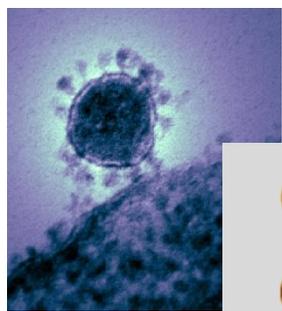
- ✓ Necessità, specie in assenza di un sospetto clinico ben indirizzato, di una diagnosi differenziale ad ampio spettro
- ✓ Scarsità/assenza di kit commercialmente disponibili, validati
- ✓ Scarsità di materiali di riferimento per lo sviluppo e la validazione dei metodi diagnostici
- ✓ Necessità di partecipare ai network internazionali per poter accedere a: metodi, materiali/agenti, EQA, assistenza/conferme dei risultati
- ✓ Necessità di sviluppare, spesso in fretta, metodi nuovi e, in assenza di standard di riferimento, di sviluppare metodi di conferma
- ✓ Necessità elevato biocontenimento



Genomes, genes and proteins of different coronaviruses



- Enveloped and spherical particles of 100–160 nm in diameter.
- Positive-sense, single-stranded RNA (ssRNA, size 27–32 kb)
- 5'-terminal polyprotein (**pp1ab**: 16 nonstructural proteins involved in genome transcription and replication)
- 3' terminus encodes for structural proteins (envelope glycoproteins spike (S), envelope (E), membrane (M) and nucleocapsid (N))
- In addition, there are accessory genes that are species-specific and dispensable for virus replication.



Recommendations for specimen collection

Global Surveillance for human infection with novel coronavirus (2019-nCoV)

Interim guidance

21 January 2020

[WHO/2019-nCoV/SurveillanceGuidance/2020.3](https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-SurveillanceGuidance-2020.3)

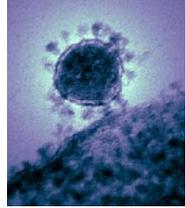


- Lower respiratory specimens likely have a higher diagnostic value than upper respiratory tract specimens for detecting 2019-nCoV infection (sputum, endotracheal aspirate, or bronchoalveolar lavage)
- If patients do not have signs or symptoms of lower respiratory tract disease or if the collection is not possible, upper respiratory tract specimens such as a nasopharyngeal aspirate or combined nasopharyngeal and oropharyngeal swabs should be collected.



Presentazione delle indicazioni regionali per la gestione di eventuali casi con sospetta patologia da nuovo coronavirus
Istituto Nazionale per le Malattie Infettive (INMI) "Lazzaro Spallanzani"

Roma 24 gennaio 2020



Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases

Interim guidance
17 January 2020

WHO/2019-nCoV/laboratory/2020.3



Table 2. Tests to be performed in expert laboratories for patients meeting the case definition

| Test | Type of sample | Comments |
|--|--------------------|--|
| In laboratories that have validated broad coronavirus RT-PCR assays it is advised to check the primers against the published 2019-nCoV sequence and check if primers are overlapping and have the capacity to detect the 2019-nCoV. <u>On a positive results sequencing should be performed to determine the precise virus detected (e.g. on an amplicon of a non-conserved region).</u> | Respiratory sample | Collect on presentation. Done by an expert laboratory. |
| NAAT for 2019n-CoV when it becomes available (assays currently under validation) | Respiratory sample | Collect on presentation. Done by an expert laboratory until validation has been finalized. |
| Whole genome sequencing | Respiratory sample | Collect on presentation. Done by an expert laboratory. |
| Serology, broad corona virus serology on paired samples if available. | Serum | Paired samples necessary for confirmation, the first sample collected in week 1 of illness and the second collected 3-4 weeks later. If a single serum sample can be collected, collect at least 3 weeks after onset of symptoms. Done by expert laboratory until more information on performance of available assays. |





Risk assessment: Outbreak of acute respiratory syndrome associated with a novel coronavirus, Wuhan, China; **first update 22 Jan 2020**

Diagnosi differenziale

I sintomi più comuni consistono in febbre, tosse secca, mal di gola, difficoltà respiratorie. Sembra che il virus possa causare sia una forma lieve, simil-influenzale, che una forma più grave di malattia. E' indispensabile eseguire la diagnosi differenziale nei confronti dei più comuni patogeni pneumotropi.

Ma....

«A positive test result for another respiratory pathogen does not rule out a 2019-nCoV infection, as little is currently known about co-infections»



Presentazione delle indicazioni regionali per la gestione di eventuali casi con sospetta patologia da nuovo coronavirus
Istituto Nazionale per le Malattie Infettive (INMI) "Lazzaro Spallanzani"

Roma 24 gennaio 2020

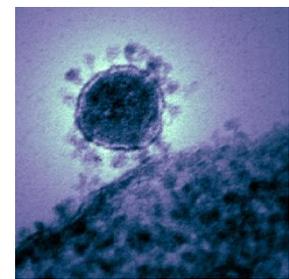


Risk assessment: Outbreak of acute respiratory syndrome associated with a novel coronavirus, Wuhan, China; **first update 22 Jan 2020**

Options for response might change when more epidemiological and clinical data become available.

Testing guidance for 2019-nCoV in the EU/EEA

- ECDC has developed a guidance document Laboratory testing of suspect cases of novel coronavirus (2019-nCoV) using RT-PCR for the EU/EEA Member States.
- Laboratories are advised to implement molecular tests specific for 2019-nCoV, the RT-PCR test developed at the Institute of Virology, Charité, Berlin, or the RT-PCR test developed at the School of Public Health, Hong Kong University.
- Any positive test should be confirmed by a second RT-PCR test targeting a different 2019-nCoV gene.



Infection prevention and control during health care when novel coronavirus (nCoV) infection is suspected

Interim guidance

January 2020

[WHO/2019-nCoV/IPC/v2020.1](#)



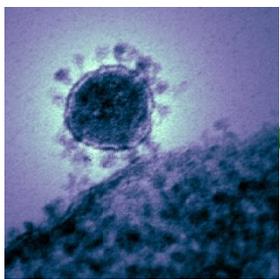
World Health
Organization

Le indicazioni dell'OMS riguardo le misure di protezione da adottare nel laboratorio per la manipolazione dei campioni clinici raccomandano di precauzioni standard ed al corretto utilizzo dei dispositivi di protezione individuale, ponendo particolare attenzione alla protezione delle vie respiratorie nei casi particolari in cui ci fosse il rischio di generare aerosol, in questi casi è bene utilizzare un filtrante respiratorio **FFP2 o superiore**.



Presentazione delle indicazioni regionali per la gestione di eventuali casi con sospetta patologia da nuovo coronavirus
Istituto Nazionale per le Malattie Infettive (INMI) "Lazzaro Spallanzani"

Roma 24 gennaio 2020

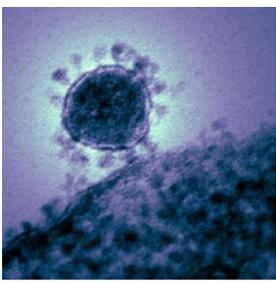


Considerazioni sui livelli di biosicurezza

- La ricerca dell'acido nucleico virale viene effettuata con metodi molecolari
- I tamponi di lisi utilizzati per l'estrazione degli acidi nucleici (es. AVL + etanolo) inattivano l'infettività virale
- L'aggiunta del tampone di lisi al campione clinico deve essere effettuata ad un livello di biosicurezza commisurato alla valutazione del rischio
- L'isolamento del virus va effettuato in laboratorio a livello di biosicurezza 3
- La sierconversione viene valutata attualmente mediante metodi non commerciali, il cui allestimento richiede la disponibilità di colture virali, e quindi di laboratorio a livello di biosicurezza 3

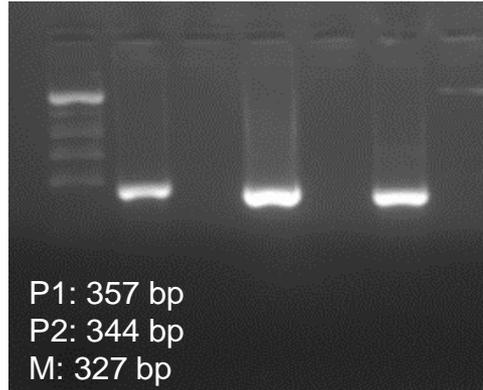


2019-nCoV diagnosi molecolare INMI

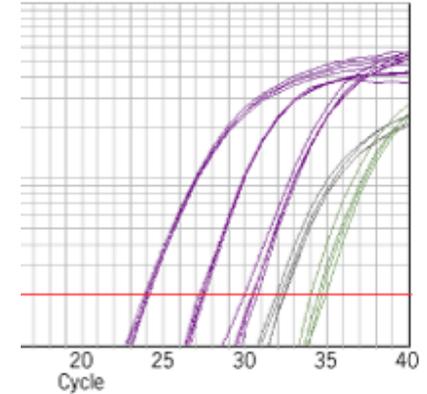


RT-PCR classica
2 geni target:

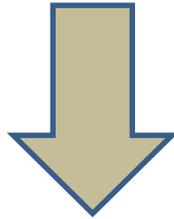
| P1 | | P2 | | M | |
|----|---|----|---|---|---|
| + | - | + | - | + | - |
| | | | | | |



real time RT-PCR
3 geni target:
RpRd, E, N



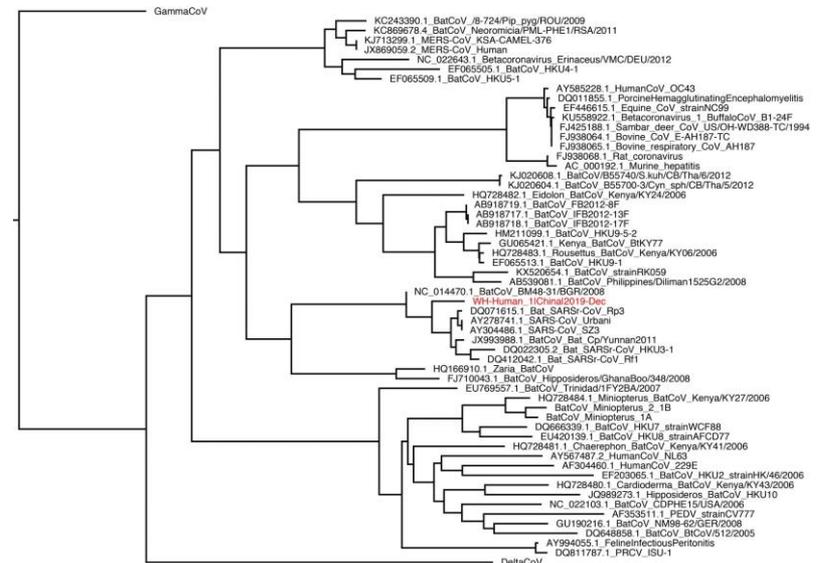
Positive real time RT-PCR or
RT-PCR



RT-PCR with different target
(end point)

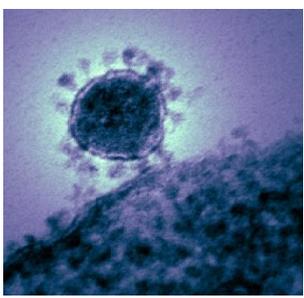
Amplicon sequencing for

- ✓ confirmation and
- ✓ Molecular characterization



Presentazione delle indicazioni regionali per la gestione di eventuali casi con sospetta patologia da nuovo coronavirus
Istituto Nazionale per le Malattie Infettive (INMI) "Lazzaro Spallanzani"

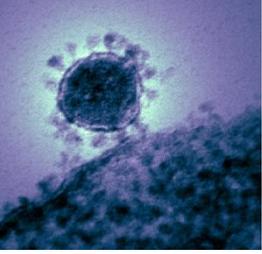
Roma 24 gennaio 2020



Strategie diagnostiche

- Fuori dalle aree epidemiche:
screening con 1 test seguito da conferma con un secondo test con target diverso e da caratterizzazione mediante sequenziamento (1 gene all'inizio e successivamente WGS)
- Nei luoghi di epidemia:
screening con 1 test con target diverso e conferma con un secondo test solo per i casi dubbi.
Utilizzo del WGS per scoprire cluster epidemici a supporto delle indagini epidemiologiche





Istruzioni operative per l'invio dei campioni

SISTEMA SANITARIO REGIONALE



IRCCS
LAZZARO SPALLANZANI



REGIONE
LAZIO

*Istituto Nazionale per le Malattie Infettive
Struttura Complessa Laboratorio di Virologia.*

Direttore: D.ssa M.R. Capobianchi

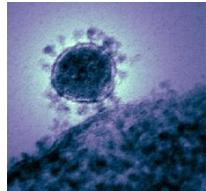
e-mail: maria.capobianchi@inmi.it; Tel. 0655170434 Fax 065594555

Istruzioni operative per l'invio di campioni relativi alla diagnosi di infezione da Coronavirus emergenti (MERS-CoV, SARS, nCoV-2019) (Rev. 01, 20 gennaio 2019)



Presentazione delle indicazioni regionali per la gestione di eventuali casi con sospetta patologia da nuovo coronavirus
Istituto Nazionale per le Malattie Infettive (INMI) "Lazzaro Spallanzani"

Roma 24 gennaio 2020



Tipologia di campione

| Fase della malattia | Tipologia di campioni |
|--|--|
| <i>I) Inizio sintomatologia</i> | <ul style="list-style-type: none">- Prelievo del tratto respiratorio inferiore o superiore (Bal, espettorato, tampone faringeo o naso-faringeo o altro**)- Sangue senza anticoagulanti per sierologia (1 provetta)- Urine- Feci (se con sintomatologia diarroica) |
| <i>II) Fasi avanzate della malattia</i> | <ul style="list-style-type: none">- Prelievo del tratto respiratorio inferiore o superiore (Bal, espettorato, tampone faringeo o naso-faringeo o altro**)- Sangue senza anticoagulanti per sierologia (1 provetta)- Urine- Feci (se con sintomatologia diarroica) |
| <i>III) > 14 giorni dall'esordio (siero convalescente)*</i> | <ul style="list-style-type: none">- Sangue senza anticoagulanti per sierologia (1 provetta)- Urine |

*In analogia con quanto osservato per gli altri coronavirus respiratori emergenti, la sieroconversione per nCoV-2019 potrebbe richiedere tempi più lunghi; l'OMS consiglia un intervallo di 21 giorni fra prelievo acuto e convalescente

**In base alla sintomatologia, da concordare con il laboratorio.



Tipologia di campione e conservazione

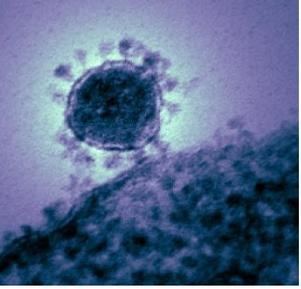
| Tipologia di campione | Trasporto in laboratorio | Conservazione | Commento |
|--|--------------------------|-------------------------|---|
| Tampone nasofaringeo o faringeo | 4°C | ≤5gg: 4°C >5gg:-70°C | I tamponi Naso- e Oro-faringeo dovrebbero essere raccolti in un'unica provetta per aumentare la carica virale |
| Broncolavaggio, aspirato tracheale nasale o nasofaringeo | 4°C | ≤48h: 4°C >48h:-70°C | |
| Espettorato | 4°C | ≤48h: 4°C >48h:-70°C | Assicurarsi che il materiale provenga dalle basse vie respiratorie |
| Tessuto proveniente da biopsie incluso polmone | 4°C | ≤5gg: 4°C >5gg:-70°C | Per biologia molecolare su virus ad RNA inviare campioni freschi o, nel caso di indagine retrospettiva, congelati. i campioni in paraffina non sono idonei |
| Siero | T.A. | ≤5gg: 4°C >5gg:-70°C | Inviare due campioni distanziati, per valutare il movimento anticorpale: -Fase acuta entro la prima settimana dall'inizio sintomi -Fase convalescente- 18-25 gg dopo inizio sintomi |
| Sangue intero | T.A. | ≤5gg: 4°C >5gg:-70°C | Nella prima settimana dall'inizio sintomi |
| Feci | 4°C | ≤48h: 4°C >48h:-70°C | In caso di sintomatologia diarroica |
| Urine | 4°C | ≤5gg: 4°C >5gg:-70°C | |

Presentazione delle indicazioni regionali per la gestione di eventuali casi con sospetta patologia da nuovo coronavirus

Istituto Nazionale per le Malattie Infettive (INMI) "Lazzaro Spallanzani"

Roma 24 gennaio 2020

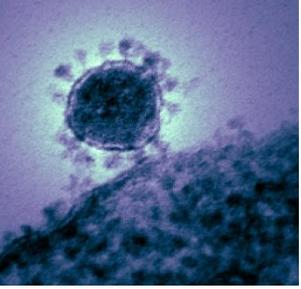




Preparazione dei campioni.1

- I campioni vanno mantenuti a $+4^{\circ}$ C prima dell'invio
- Il trasporto al Laboratorio deve essere effettuato entro il più breve tempo possibile, preferibilmente entro le 24 ore e a temperatura refrigerata
- Per tempi di consegna più prolungati, concordare con il Laboratorio le modalità di preparazione e conservazione

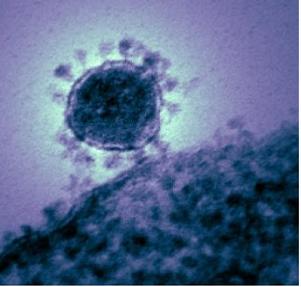




Preparazione dei campioni.2

- I campioni diagnostici devono essere accompagnati dalla scheda dati, riportata in calce alle istruzioni, compilata in tutte le sue parti
- Su ogni singolo campione deve essere apposta un'etichetta riportante a chiare lettere il nome del paziente, la tipologia del campione (Tampono faringeo, BAL, siero, altro) e la data di prelievo.
- Le informazioni riportate sulle provette **devono essere coerenti** con quelle riportate nella scheda dati.

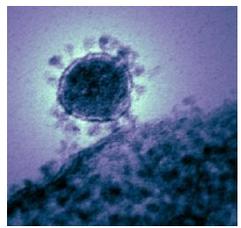




Imprevisti

- Il campione è fuoriuscito dalla provetta primaria
 - ✓ Necessità di bonificare la superficie esterna
 - ✓ Difficoltà a recuperare il campione residuo disponibile
- Le informazioni sull'etichetta sono incongruenti con quelle della scheda
 - ✓ Necessità di contattare chi ha inviato il campione per escludere scambi di provette
- Il campione contiene inibitori o sostanze che interferiscono con il saggio
 - ✓ Necessità di ricominciare dall'estrazione
- Altre circostanze impreviste





Prima di inviare campioni, è necessario contattare il laboratorio.

Il Laboratorio di Virologia è attivo **h24**.

Il virologo di turno può essere reperito ai seguenti numeri:

- 0655170666
- 3204343793

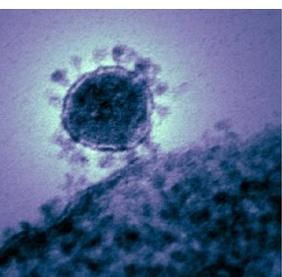
Il virologo di turno effettuerà con il richiedente la valutazione congiunta preliminare, e provvederà ad attivare le procedure interne.

Ulteriori recapiti utili:

Accettazione: tel 0655170674; fax 0655170676

Segreteria: 0655170690; fax 065594555





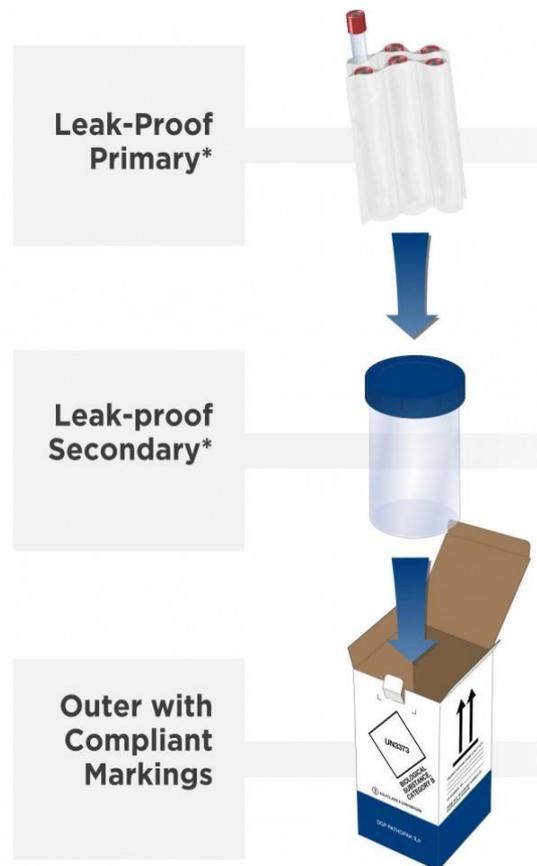
Confezionamento e trasporto dei campioni

- Il campione va confezionato seguendo il principio del **triplo involucre**
- Il trasporto dei campioni al laboratorio va eseguito secondo le raccomandazioni per i campioni a rischio biologico

(Circolare Ministeriale n° 3/2003

“Raccomandazioni per la sicurezza del trasporto di materiali infettivi e di campioni diagnostici”)

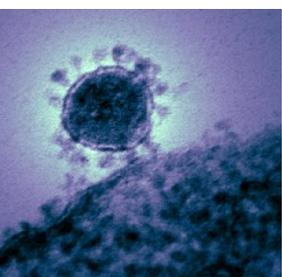
L'invio va concordato con il Laboratorio



Presentazione delle indicazioni regionali per la gestione di eventuali casi con sospetta patologia da nuovo coronavirus
Istituto Nazionale per le Malattie Infettive (INMI) "Lazzaro Spallanzani"

Roma 24 gennaio 2020





Consegna dei campioni

L'indirizzo cui inviare in campioni è:

Laboratorio di Virologia

Padiglione Baglivi

Istituto Nazionale per le Malattie Infettive “L. Spallanzani”

Ingresso carrabile:

via Giacomo Folchi, 6a

00149 Roma



Presentazione delle indicazioni regionali per la gestione di eventuali casi con sospetta patologia da nuovo coronavirus
Istituto Nazionale per le Malattie Infettive (INMI) “Lazzaro Spallanzani”

Roma 24 gennaio 2020