

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

الحمد لله



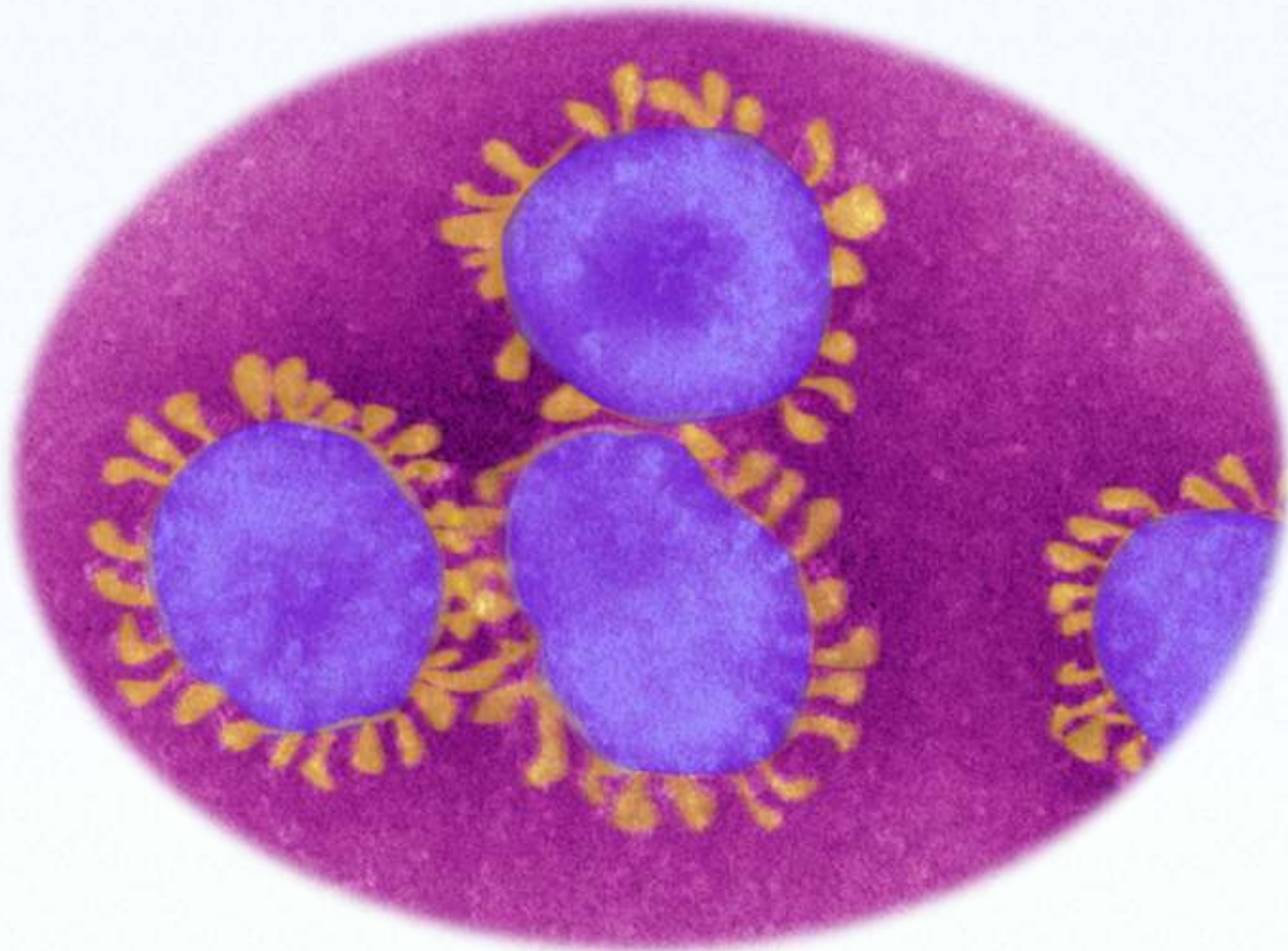
SARS-CoV-2 diagnosis perspective



Behzad Khansarinejad, PhD

Associate professor of Medical Virology, Arak University of
Medical Sciences

What Are Coronaviruses?



History

- † Common cause of respiratory and enteric diseases of humans and domestic animals
- † Corona = Crown and Avian infectious bronchitis virus (IBV) was first observed by EM with an structure similar to crown
- † First identified by this morphology in 1965 by Tyrrell and Boyne when organ culture of ciliated trachea were used to study human infections (HCoV-OC43)
- † Mouse hepatitis virus (MHV), human respiratory coronaviruses (HCoV), and coronaviruses of domestic animals were found to share the same structure and, later, the same genome organization and replication strategy



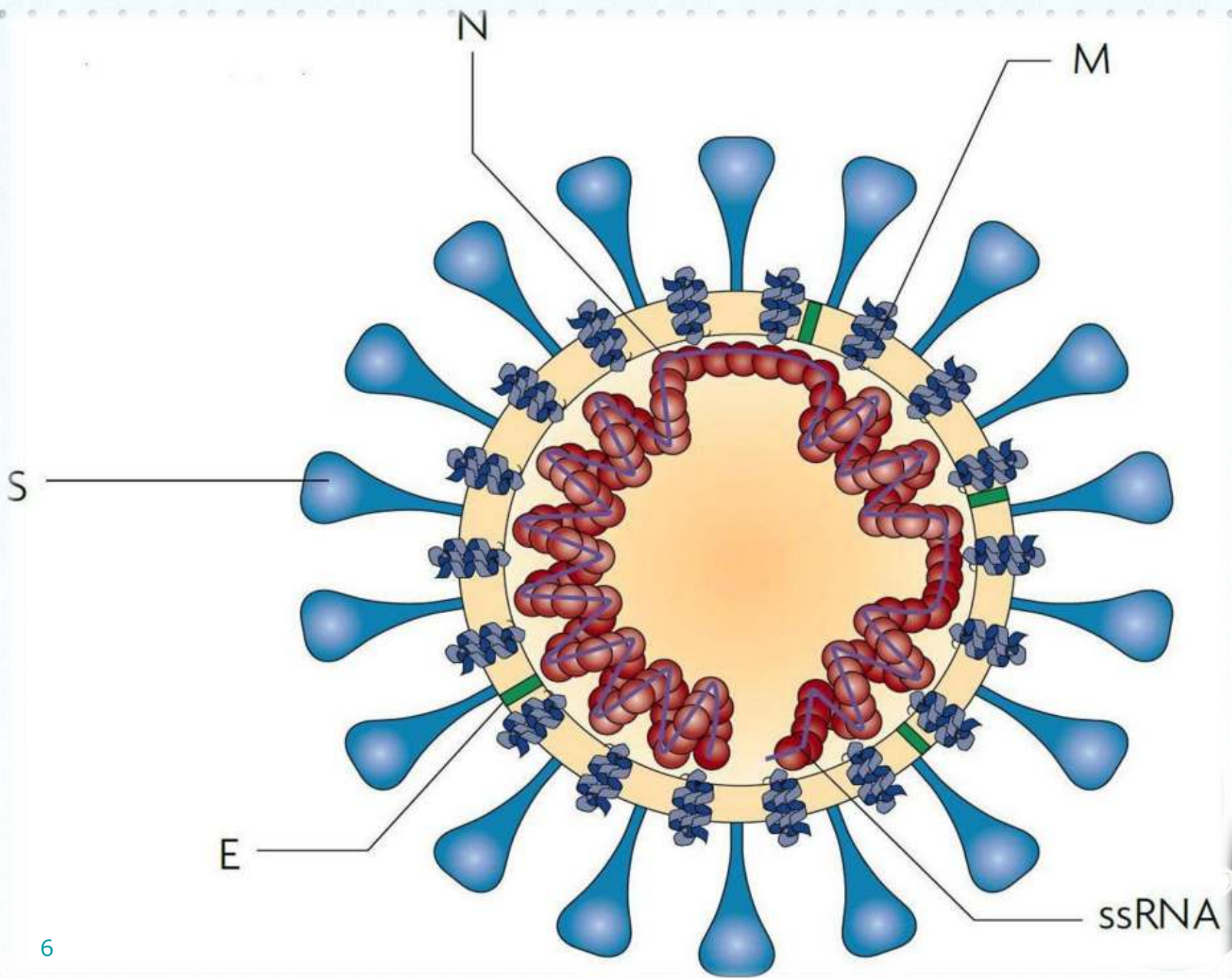
Human Corona viruses

- ✓ HCoV-229E
- ✓ HCoV-OC43
- ✓ HCoV-NL63
- ✓ HCoV-HKU1
- ✓ SARS-CoV
- ✓ MERS-CoV
- ✓ SARS-CoV-2

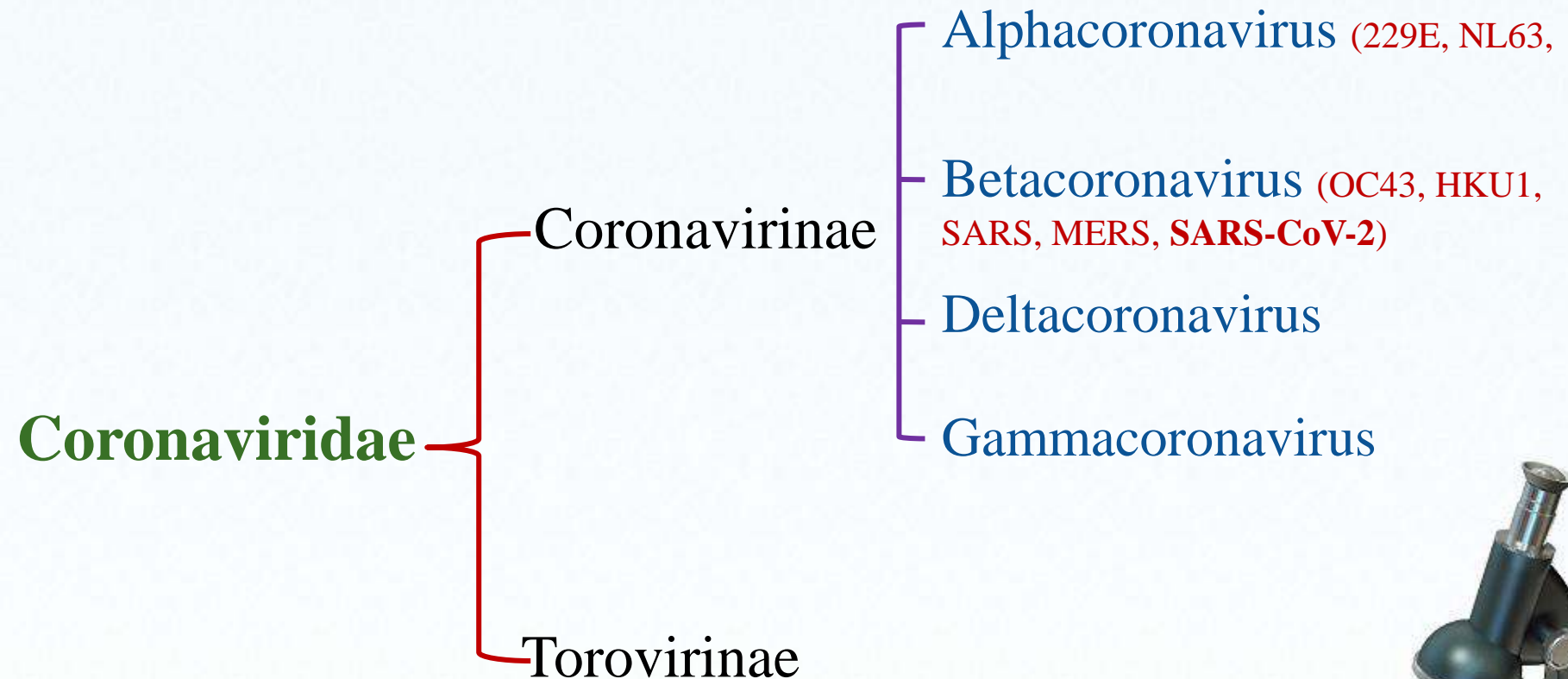
Animal Corona viruses

MHV, IBV, BCoV, TGEV, PRCoV, FECoV, CCoV, FIPV, HEV, RbCoV, TCoV, ...



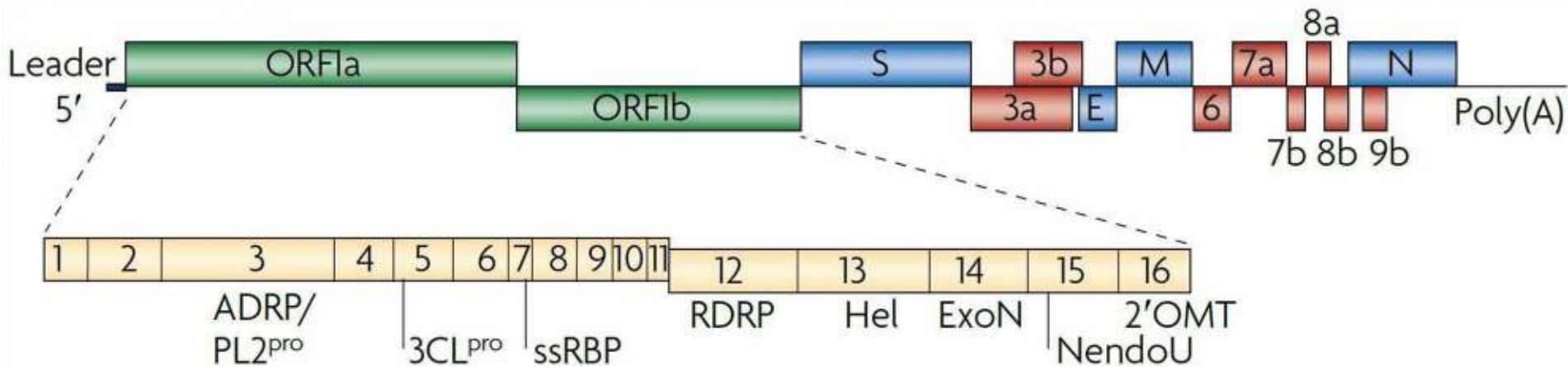


Coronaviridae classification



MERS-CoV genes and genome

- ↑ The RNA genome is about 30kb in size and has cap and polyA
- ↑ Has a 65 to 98 nucleotides leader sequence at 5`
- ↑ The order of genes in all coronaviruses is:
5`-**Pol-S-E-M-N**-3`



The variable nature of Coronaviruses genome

↑ Virus Mutants

✿ **Point mutations:** Is due to the high error frequencies of RDRP enzyme.

✿ **Deletion mutants:**

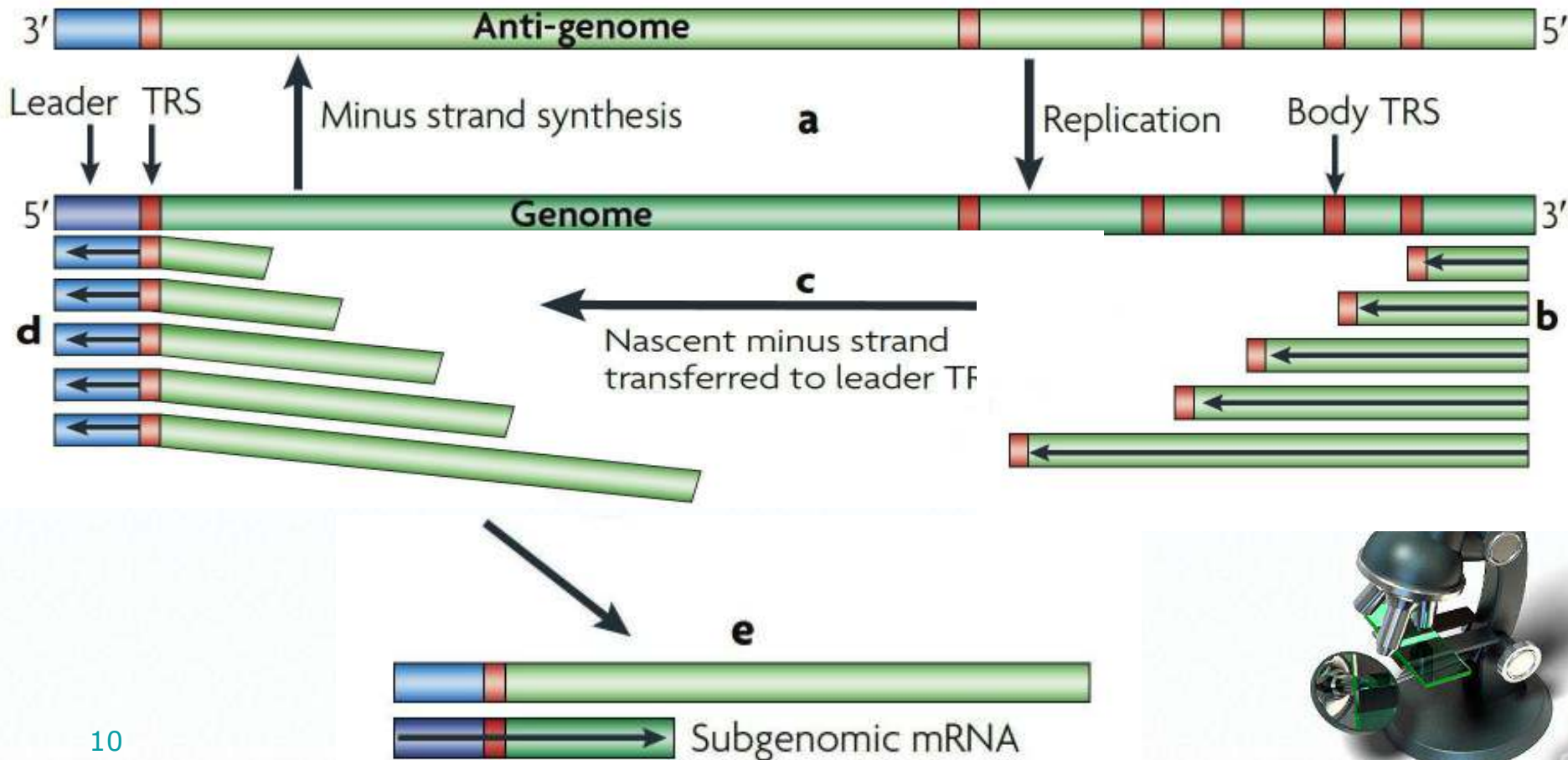
🍃 **Example:** 1- the emergence of PRCoV from TGEV in the early 1980s. 2- SARS-CoV of human and civet cat isolates also differ by a 29-nucleotide deletion in the ORF 8.

↑ RNA Recombination:

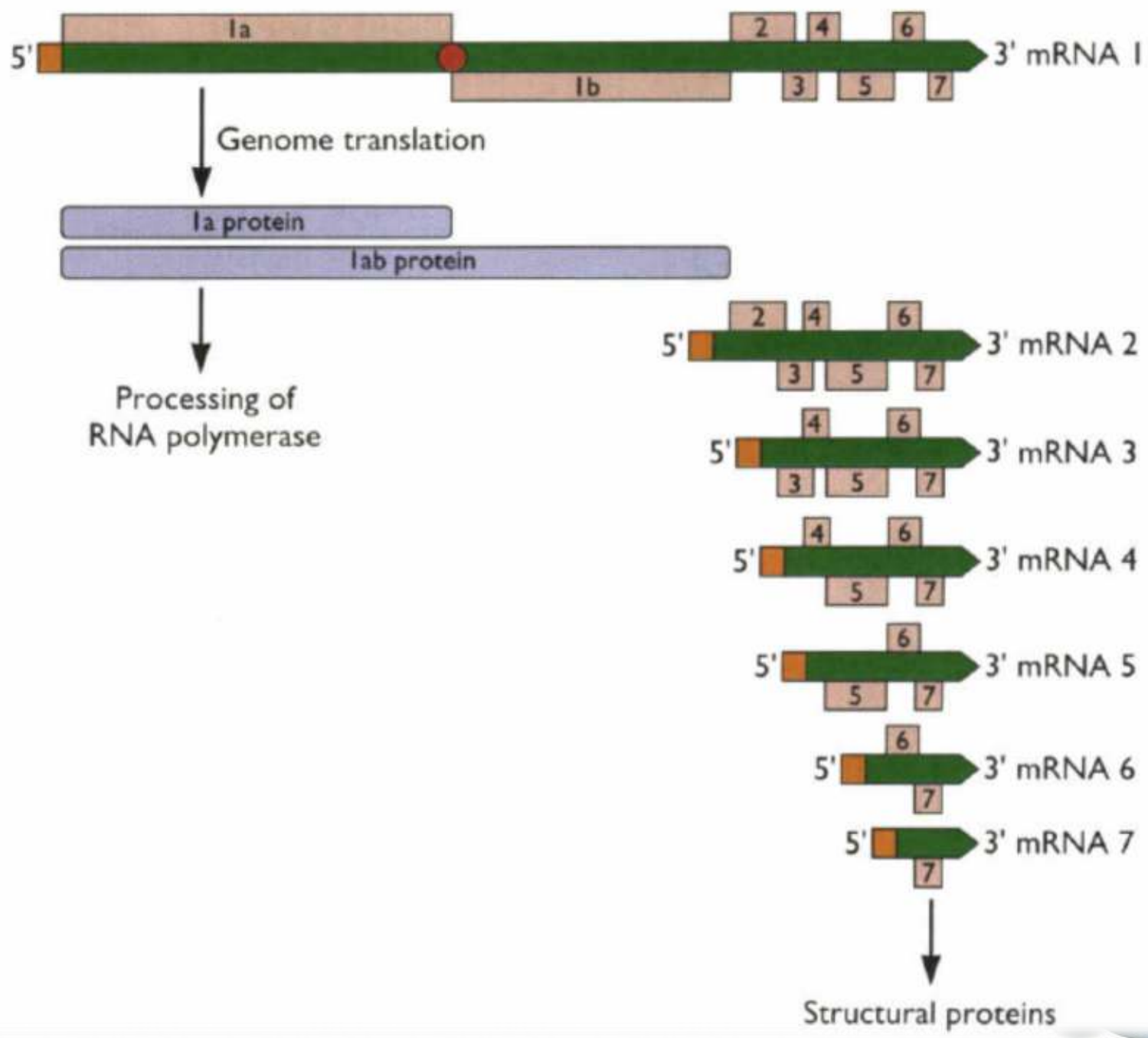
Is the result of the unique mechanism of their RNA synthesis



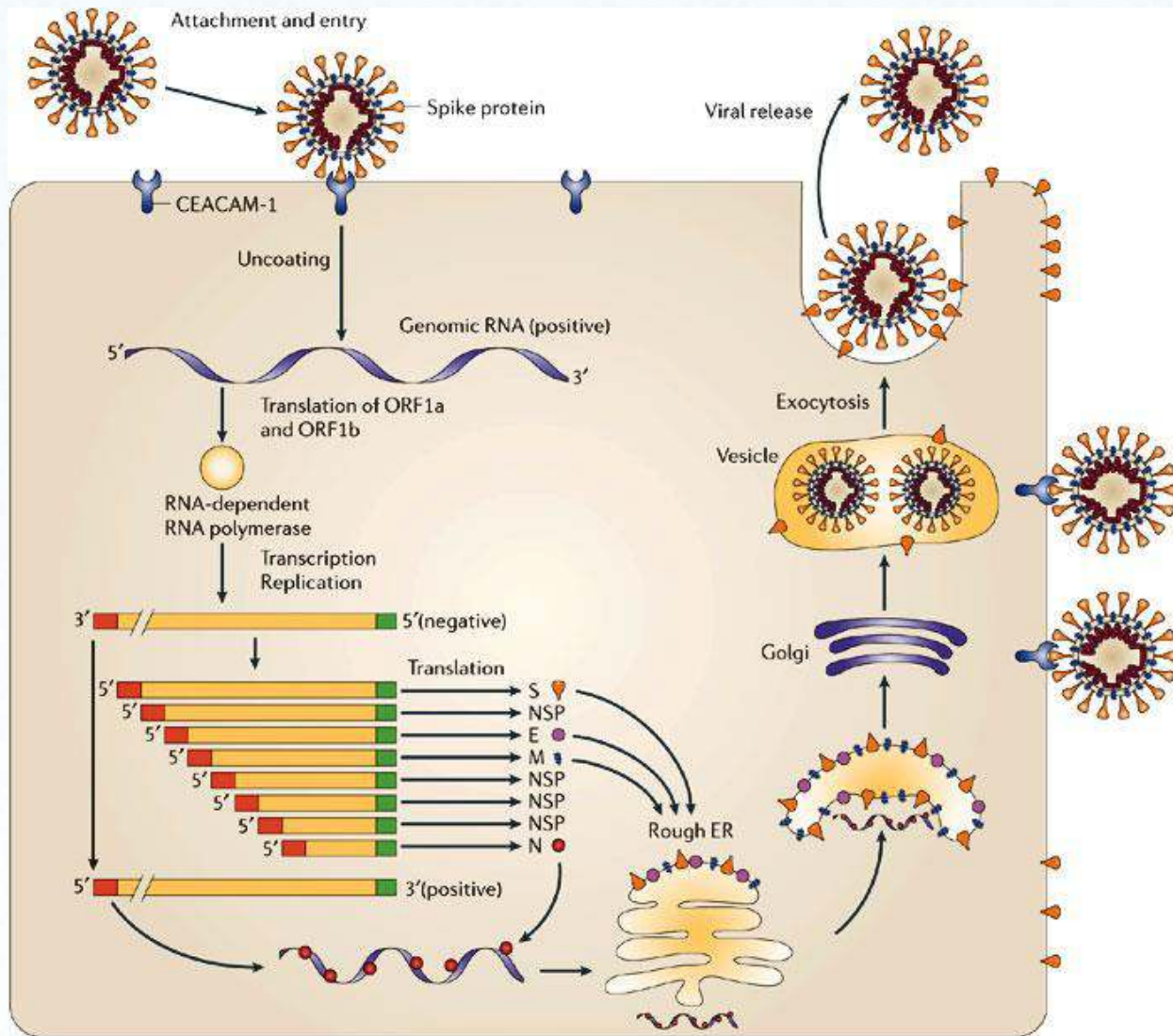
Mechanism of Coronaviruses replication and transcription



A



Replication Cycle



Cellular receptors used by HCoV

Virus	Receptor name	Abbreviation
HCoV-229E	Aminopeptidase N	APN
HCoV-OC43	9-O-acetylated sialic acid, CEACAM1	
HCoV-NL63	Angiotensin-converting enzyme 2	ACE2
HCoV-HKU1	Unknown	---
SARS-CoV	Angiotensin-converting enzyme 2	ACE2
MERS-CoV	Dipeptidyl peptidase 4	DPP4= CD26



Laboratory Testing for SARS-CoV-2



Sampling of suspected nCoV-2019

Samples for diagnosis – symptomatic patients

- ✿ Lower respiratory tract: sputum, aspirate, lavage
- ✿ Upper respiratory tract: nasopharyngeal, oropharyngeal swabs, nasopharyngeal wash and/or aspirate
- ✿ Serum for virus detection the history of viral infection



Sampling of suspected SARS-CoV-2

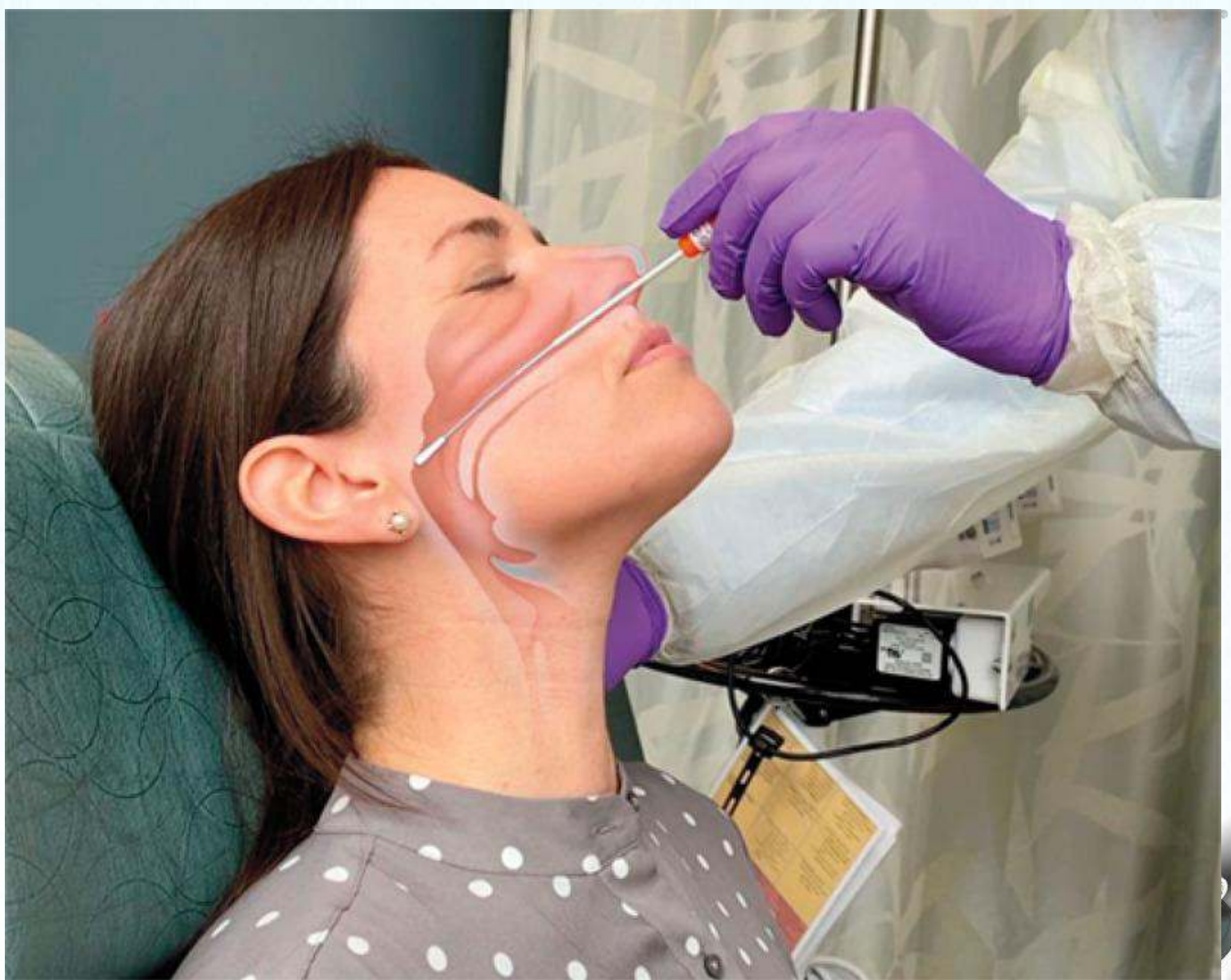
At least oropharyngeal and nasopharyngeal swab should be taken and putted in VTM media

If swab is used they must have synthetic tips (such as polyester or Dacron®) and aluminum or plastic shaft, cotton swab is not acceptable

† Transport of samples

- ✿ < 24-48 hours, store and transport at 4°C
- ✿ > 48 hours, store at -70 °C and transport on dry ice (or liquid nitrogen)







Algorithm for detecting nCoV-2019 by PCR

Berlin, Jan 17th, 2020

Diagnostic detection of 2019-nCoV by real-time RT-PCR

-Protocol and preliminary evaluation as of Jan 17, 2020-

Victor Corman, Tobias Bleicker, Sebastian Brünink, Christian Drosten
Charité Virology, Berlin, Germany

Olfert Landt, Tib-Molbiol, Berlin, Germany

Marion Koopmans
Erasmus MC, Rotterdam, The Netherlands

Maria Zambon
Public Health England, London

Additional advice by Malik Peiris, University of Hong Kong

Users looking for a workflow protocol consult the last three pages of this document

Contact: christian.drosten@charite.de
<https://virologie-ccm.charite.de/en/>

Positive control material is available from Charité, Berlin, via EVAg
(<https://www.european-virus-archive.com/>).

This is document Version 2.

↑ R
vi

n of



Background

We used known SARS- and SARS-related coronaviruses (bat viruses from our own studies as well as literature sources) to generate a non-redundant alignment (excerpts shown in Annex). We designed candidate diagnostic RT-PCR assays before release of the first sequence of 2019-nCoV. Upon sequence release, the following assays were selected based on their matching to 2019-nCoV as per inspection of the sequence alignment and initial evaluation (Figures 1 and 2).

All assays can use SARS-CoV genomic RNA as positive control. Synthetic control RNA for 2019-nCoV E gene assay is available via EVAg. Synthetic control for 2019-nCoV RdRp is expected to be available via EVAg from Jan 21st onward.

First line screening assay: E gene assay
 Confirmatory assay: RdRp gene assay

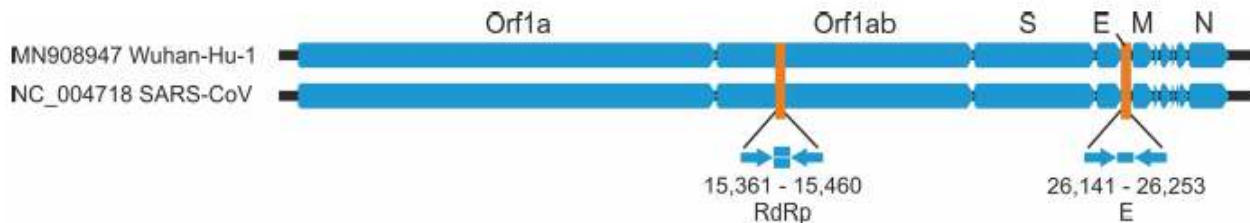
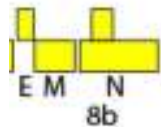
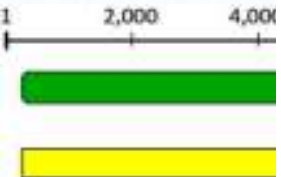


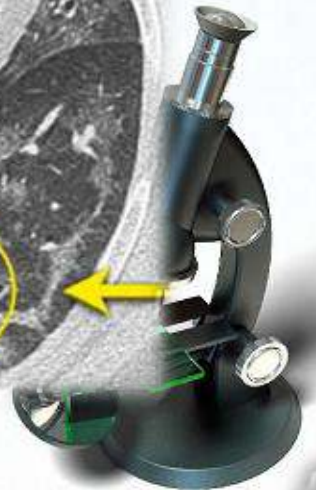
Figure 1 relative positions of amplicon targets on SARS-CoV and 2019-nCoV genome. ORF: open reading frame; RdRp: RNA-dependent RNA polymerase. Numbers below amplicon are genome positions according to SARS-CoV, NC_004718.

↑ Sci

↑ Co

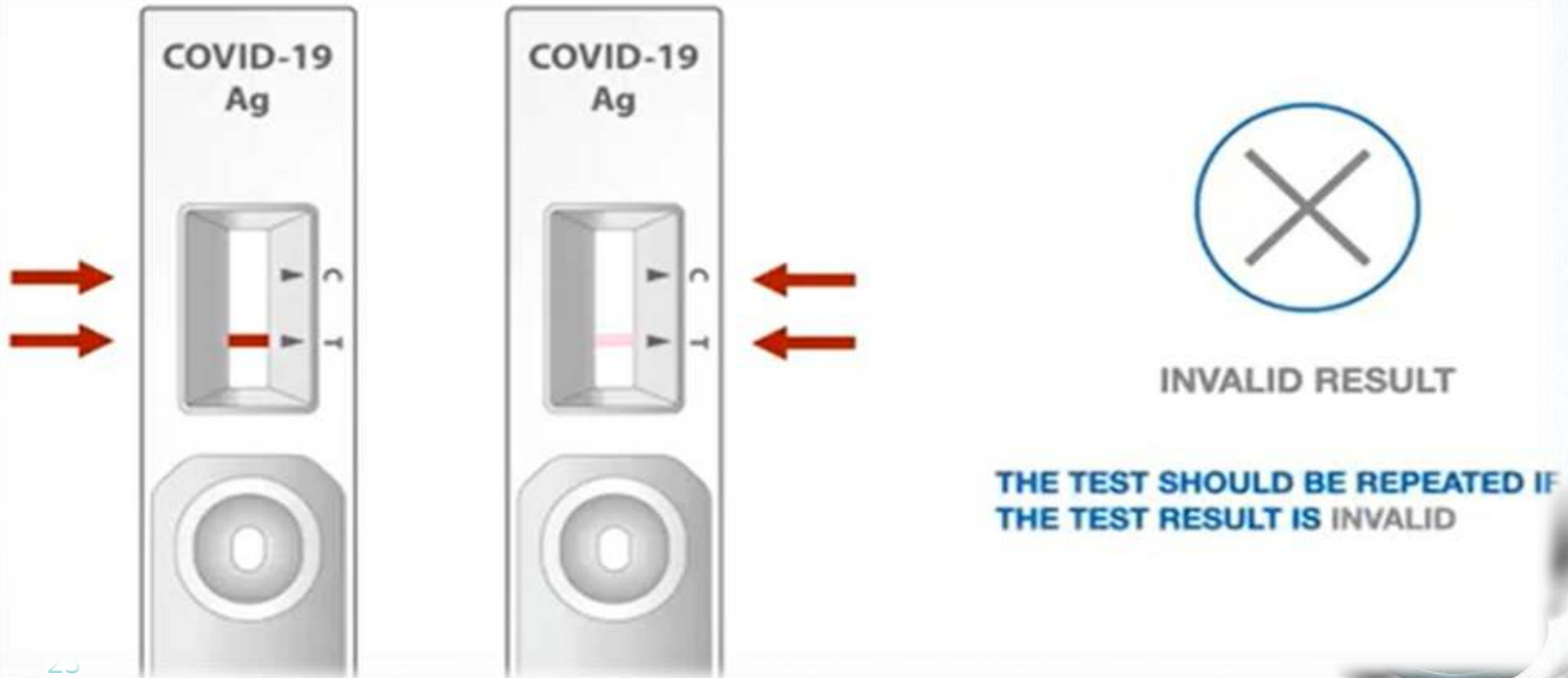
↑ Co

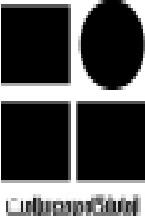






COVID - 19 Ag Rapid Diagnostic Test (RDT)





آزمایش شناسایی آنتی ژن SARS CoV-2 کجا کاربرد دارد:

- تشخیص فاز حاد بیماری در بیماران علامت دار
- تشخیص بیماران بی علامت یا دارای علائم خفیف (در جوامعی که شیوع بیماری بالاست)
- شناسایی مبتلا در افرادی که سابقه تماس با بیمار مبتلا به کووید-۱۹ را داشته اند (Contact Tracing)

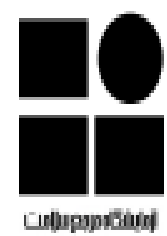
آزمایش شناسایی آنتی ژن SARS CoV-2 کجا کاربرد ندارد:

- شناسایی مبتلایان در شرایط خاص: قبل از عمل جراحی، زایمان، ترخیص از بیمارستان، سفر، بازگشت به کار،...
- شناسایی مبتلایان در اجتماعات کوچک مثل خانه سالمندان، پادگان، مدرسه، ...
- بررسی سلامت مسافران، ورزشکاران و غیره

نقاط قوت آزمایش شناسایی آنتی ژن SARS CoV-2

در مقایسه با روش تشخیص مولکولی (تست PCR)

❖ افزایش دامنه و تعداد انجام آزمایش	✓ ارزان تر
❖ تسریع و تسهیل در شناسایی مبتلایان به کووید ۱۹	✓ آسان تر
❖ کاهش ریسک گسترش بیماری	✓ سریع تر
❖ کاهش ناتوانی و مرگ و میر ناشی از بیماری	✓ در دسترس تر



نقطه ضعف آزمایش شناسایی آنتی ژن SARS CoV-2

در مقایسه با روش تشخیص مولکولی (تست PCR)

- حساسیت پائینتر
- محدود بودن بازه زمانی شناسایی افراد
- امکان سو استفاده

نقاط ضعف آزمایش شناسایی آنتی ژن SARS CoV-2

در مقایسه با روش تشخیص مولکولی (تست PCR)

نتایج منفی کاذب (به دست آمدن نتیجه منفی، در حالی که فرد مبتلا است) :

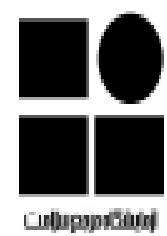
احتمال نتایج منفی کاذب در این آزمایش وجود دارد. بنابراین نتیجه آزمایش منفی احتمال عفونت را رد نمی کند. برای تایید نتیجه منفی لازم است آزمایش تشخیص مولکولی انجام شود. (در مطالعات سازمان بهداشت جهانی حساسیت نسبی روش های سریع شناسایی آنتی ژن در مقایسه با روش تشخیص مولکولی، به طور متوسط حدود ۸۰٪ بوده است). هر چه بار ویروسی بیشتر باشد، احتمال نتیجه منفی کاذب کمتر است. بیماران با بار ویروسی بالا (معمولا بین روزهای ۵ تا ۷ شروع علائم) به خوبی شناسایی می شوند.

- هر چه شیوع بیماری در جامعه بیشتر باشد احتمال نتیجه منفی کاذب کمتر است

نتایج مثبت کاذب (بدست آمدن نتیجه مثبت، در حالی که فرد سالم است) :

احتمال نتایج مثبت کاذب کم است. نتیجه مثبت کاذب ممکن است ناشی از عفونت قبلی یا فعلی با کروناویروس های غیر SARS-CoV-2 باشد.

(در مطالعات سازمان بهداشت جهانی: اختصاصیت (ویژگی) نسبی روش های سریع شناسایی آنتی ژن در مقایسه با روش تشخیص مولکولی، به طور متوسط بالای ۹۷٪ بوده است)



استفاده از آزمایش آنتی ژن SARS CoV-2 در کشور:

مکان انجام آزمایش: در محل هایی که ارزیابی سریع احتمال ابتلا به ویروس لازم باشد، مثل:

- مراکز ۱۶ و ۲۴ ساعته،
- اورژانس بیمارستان ها،
- آزمایشگاه های مناطق دوردست که دسترسی به روش های تشخیص مولکولی وجود ندارد
- و غیره (به تشخیص وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی)

کاربرانی که تست را انجام می دهند: کارکنان آزمایشگاه، پرستاران، سایر کادر درمانی و مسئولین مراقبت از بیماران به تشخیص وزارت

بهداشت، درمان و آموزش پزشکی

نمونه مورد نیاز برای انجام آزمایش: ترشحات نازوفارنکس

Current challenges in the diagnosis of

- ↑ False negative results of the NATs
- ↑ False Positive results of the NATs
- ↑ False negative results using CT
- ↑ Nonspecific diagnosis using CT
- ↑ Overdiagnosis using clinical examination



high-resolution CT without contrast enhancement is the *imaging modality of choice* for patients with *suspected COVID-19 infection*.

Although chest CT has *high sensitivity 94%-98%*, it has *low specificity 37%-53%*.

This low specificity may stem from the fact that it is difficult to distinguish COVID-19 findings from findings of other disease on chest CT.



*Summary of Recommendations for Imaging
(<https://doi.org/10.1148/radiol.2020201365>)*

Main recommendations

- ✓ *Imaging is not routinely indicated as a screening test for COVID-19 in asymptomatic individuals*
- ✓ *Imaging is not indicated for patients with mild features of COVID-19 unless they are at risk for disease progression (scenario 1)*
- ✓ *Imaging is indicated for patients with moderate to severe features of COVID-19 regardless of COVID-19 test results (scenarios 2 and 3)*
- ✓ *Imaging is indicated for patients with COVID-19 and evidence of worsening respiratory status (scenarios 1, 2, and 3)*
- ✓ *In a resource-constrained environment where access to CT is limited, chest radiography may be preferred for patients with COVID-19 unless features of respiratory worsening warrant the use of CT (scenarios 2 and 3)*





Thank you



JMZ