

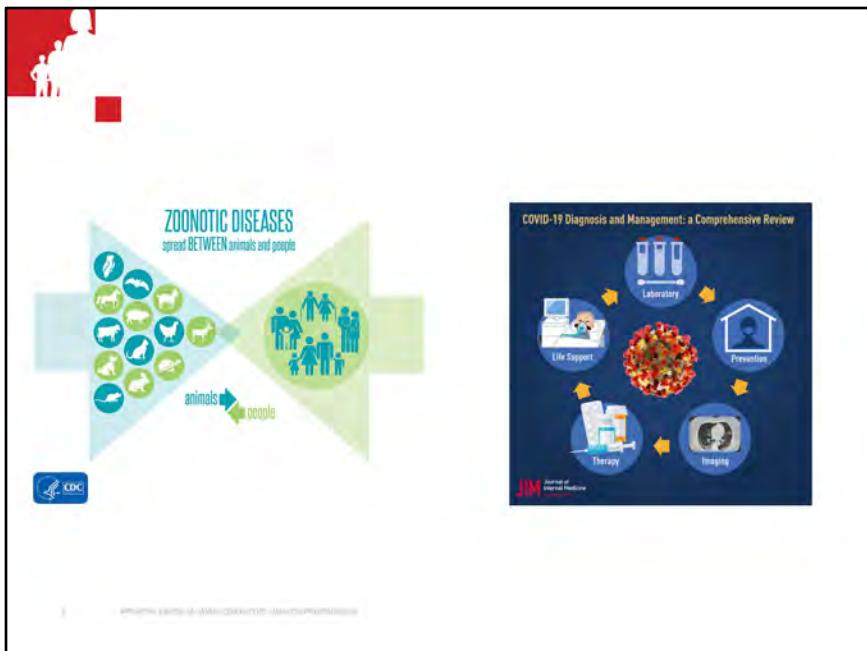


# **SARS-CoV-2 i COVID-19: Što danas znamo?**

Irena Tabain

HRVATSKI ZAVOD ZA JAVNO ZDRAVSTVO  
RC MZ za virološku dijagnostiku infekcije dišnog sustava

Štampano u sklopu izložbe o epidemiji COVID-19 u Domu kulture Čakovec, 16. listopada 2020.



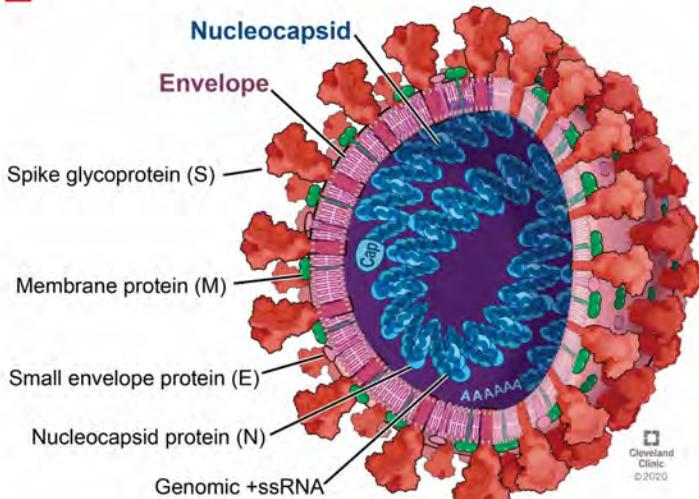
Kroz ovu prezentaciju ћу iznijeti што smo saznali o novom koronavirusu, koje mu je porijeklo, kako je graђen, kako se bolest klinički manifestira, s posebnim naglaskom na dijagnostičke opcije .

# Coronaviridae

Sub-family	Genus	Sub-genus	Species	Sub-species
Orthocoronaviridae	Alphacoronavirus	Divisicoronavirus	HCoV-OC43	
		Seicovirus	HCoV-NL63	
	Betacoronavirus	Embecovirus	HCoV-HKU1	
		Miecovirus	MERS-CoV	
		Serbecovirus	SARS-CoV	
	Deltacoronavirus		SARS-CoV-2	
		Gammacoronavirus		

Koronavirusi su velika porodica koja se dijeli u 2 potporodice, a za ljudje značajni koronavirusi pripadaju podporodici *Orthocoronaviridae* i rodovima *Alphacoronavirus* i *Betacoronavirus* (uključujući SARS-CoV-2)

## Struktura koronavirusa



Koronavirusi su ovjeni virusi (ovojnica je bitna u mjerama koje koristimo za suzbijanje njegovog širenja jer je osjetljiv na vanjske utjecaje, posebno preparate koji sadržavaju alkohol) čiji genom čini jednolančana pozitivna RNA.

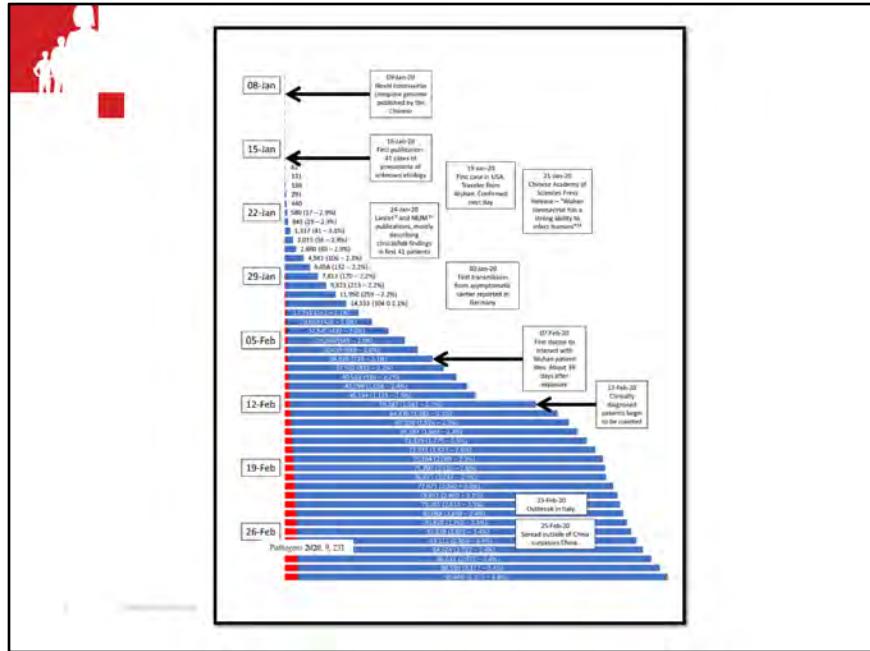


## COVID-19

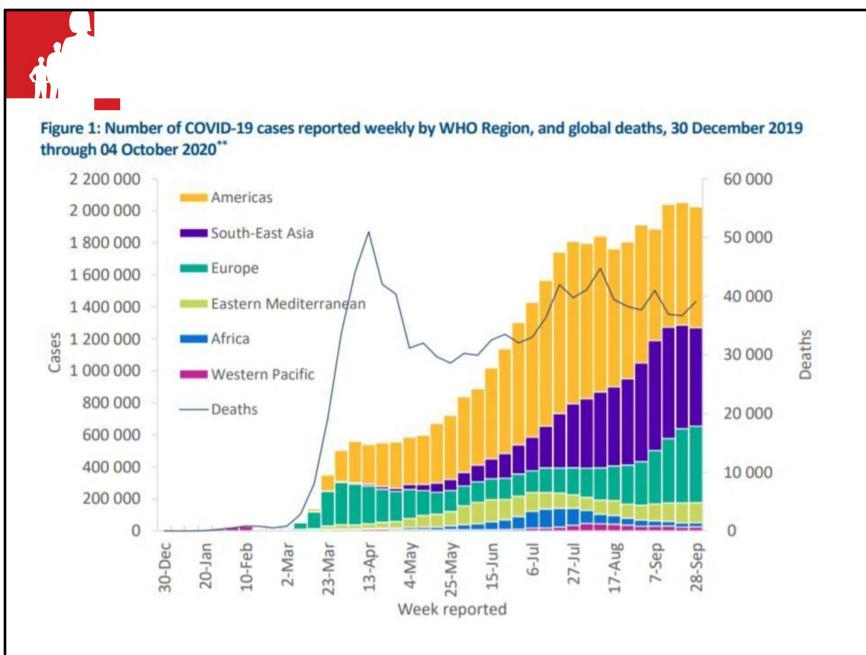
- prvi slučaj u svijetu: 12. prosinca 2019., Wuhan, Kina
- prvi potvrđeni sučaj u RH: 25/2/2020
- Svjetska zdravstvena organizacija (SZO/WHO) proglašila je COVID-19 globalnom pandemijom 11. 3. 2020.

Na dan 13/10/2020:

- Broj potvrđenih slučajeva u Hrvatskoj: 21741
- Broj umrlih u Hrvatskoj: 334

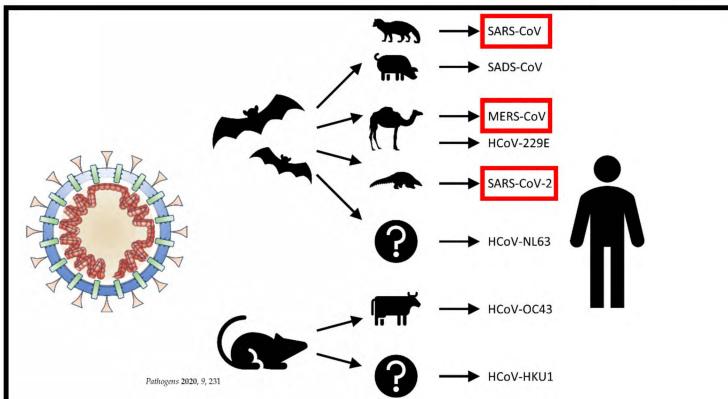


Prvi slučaj u nas je potvrđen odmah nakon izbijanja epidemije u Italiji.



Iz službenih izvješća SZO vidi se broj dokazanih slučajeva po tjednima te smrtnih ishoda od COVID19 u raznim dijelovima svijeta. Iz grafa je vidljiv kontinuirani rast broja novozaraženih. Od 31. 12. 2019. zabilježeno je preko 39 milijuna slučajeva i preko milijun smrtnih ishoda.

# Porijeklo virusa

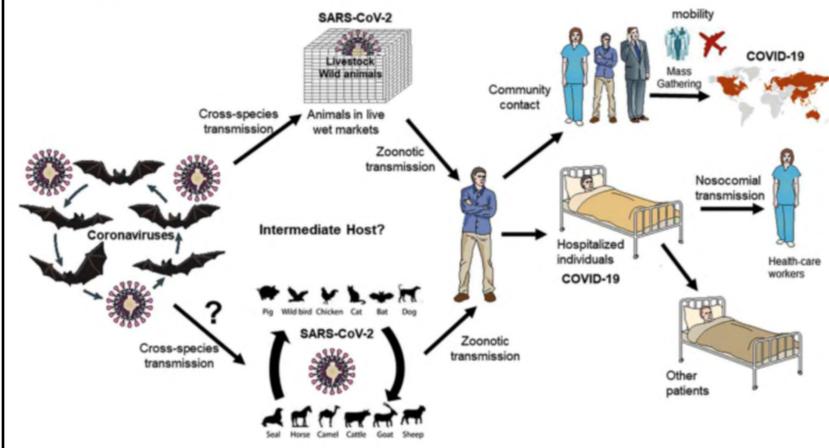


8

HRVATSKO ZAVOD ZA JAVNO ZDRAVSTVO / NASLOV PREZENTACIJE

Odakle potječu koronavirusi, a posebno, SARS-CoV-2? Vidljivo je da su svi koronavirusi zoonoze. Koronavirusi su značajni uzročnici zaraznih bolesti u veterinarskoj medicini, dok su u humanoj poznati kao uzročnici prehlada i, rjeđe, infekcija probavnog sustava. Značajno je da su životinje, posebno šišmiši veliki rezervoar ovih virus te da svi pripadnici Betacoronavirusa primarno inficiraju sisavce. Najčešće, prije prelaska s vrste na vrsu, a posebno s neke životinske vrste na čovjeka, virus koristi intermedijarnog domaćina za prilagodbu na novog domaćina.

# Princip “Jedno zdravlje”

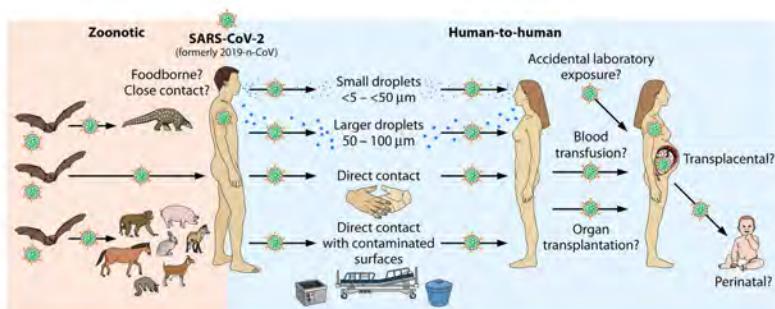


9

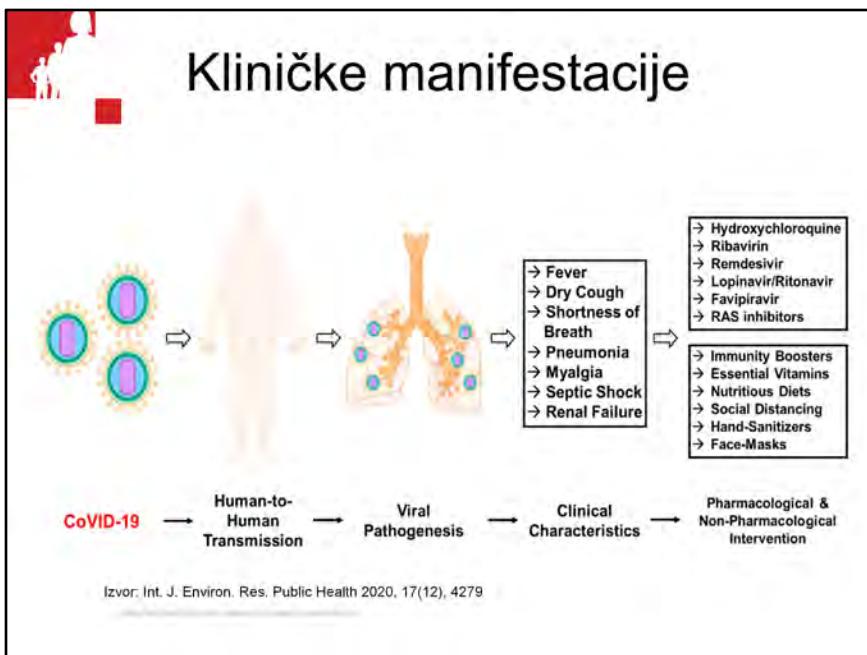
HRVATSKI ZAVOD ZA JAVNO ZDRAVSTVO / NASLOV PREZENTACIJE

S obzirom da se povećava broj stanovnika zemlje pa čovjek zalazi u neke krajeve gdje inače obitavaju neke druge vrste, normalno je da dolazi i u kontakt s novim mikroorganizmima. Osim toga, puno i brzo putujemo ta time doprinosimo širenju zaraznih bolesti.

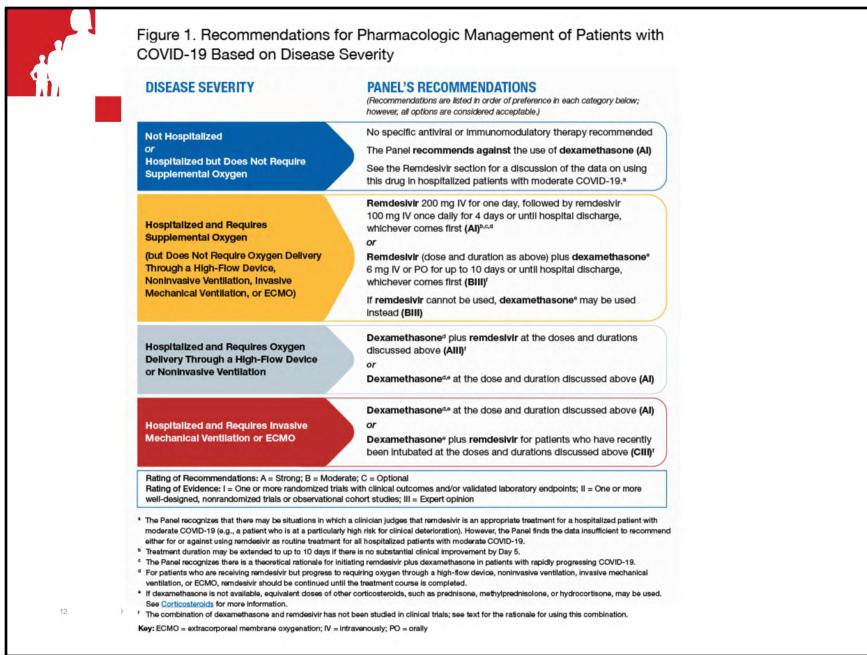
# Putevi prijenosa virusa



Točan mehanizam prelaska na čovjeka nije poznat, ali znamo da se virus s čovjeka na čovjeka može širiti izravnim, bliskim kontaktom, kapljično, ali preko predmeta.



Velik broj infekcija prolazi bez simptoma, zatim, značajan broj se prezentira kao blaže infekcije gornjeg dijela dišnog sustava, ali ima potencijal uzrokovati i teške infekcije donjeg dijela dišnog sustava koje mogu dovesti i do zatajenja organa te smrti.



Terapijske mogućnosti su ograničene. Puno se nade polaže u cjepivo. Primarno je terapija simptomatska. Od antivirusnih lijekova trenutno je prvi izbor remdesevir, uz simptomatsko liječenje primjenom deksametazona, kisika, odnosno potpomognutom ventilacijom, ovisno o kliničkoj slici.

# Terapijske mogućnosti

## The convalescent plasma option for COVID-19 treatment



Lail Alzahrani, PhD: The Hashemite University (created with biorender.com)

S obzirom na vrlo ograničene terapijske mogućnosti, jedna od terapijskih opcija koja se pokazala uspješnom je svakako i plazma bolesnika koji su preboljeli COVID19.

## Što detektiraju dijagnostički testovi?

virus (antigen ili genom) te protutijela

The virus:

- Viral RNA detected by NAAT/RT-PCR (molecular testing)
- COVID-19 viral antigen

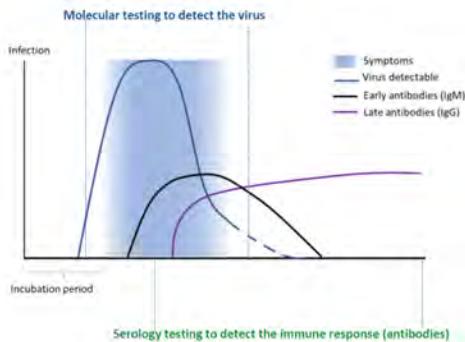
The immune response:

- Antibodies against COVID-19 antigen (IgM, IgG, IgA) (serology testing)

Monto, Cowling and Pereis. Coronaviruses. R.A. Kaslow et al. (eds.), Viral infections in humans.  
[https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-1-4899-7448-3\\_10.pdf](https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-1-4899-7448-3_10.pdf)

Primarno se dijagnostika bazira na molekularnoj dijagnostici, odnosno detekciji specifičnih genskih sekvenci sukladno preporučenim protokolima. Dodatno, uz ograničenu osjetljivost, mogu se koristiti i testovi koji detektiraju antigen te za dokaz preboljele infekcije, seroloških testovi, odnosno testovi kojima dokazujemo prisutnost specifičnih protutijela.

## Vrijeme uzorkovanja je bitno:



U akutnoj fazi bolesti, odnosno u početnoj fazi infekcije, najčešće se koristi obrisak nazofarinkska koji se uzima kroz nos i u laboratorij dostavlja u odgovarajućem transportnom mediju zbog osjetljivosti virusa na vanjske utjecaje i u što kraćem vremenu.

Dok se za serološko testiranje uzima krv iz vene iz koje se odvaja serum u kojem se može dokazivati prisutnost specifičnih protutijela.



## Koji uzorci su prihvatljivi?

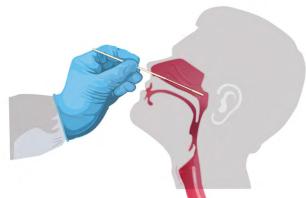
Uzorci iz gornjeg dijela dišnog sustava:

- obrisak nazofarinka
  - obrisak ždrijela, aspirat nazofarinka i slina
- Uzorci iz donjeg dijela dišnog sustava:
- kod težih oblika bolesti i u bolničkim uvjetima mogu se uzeti: sputum, bronhoalveolarni lavat ili aspirat
  - oprez zbog stvaranja aerosola!

# Kako uzeti obrisak nazofarinka?



- štapići koji nisu od prirodnih materijala
- transportni medij (UTM, Hanks, PBS, FO)
- obrada unutar 72 h



17

HRVATSKI ZAVOD ZA JAVNO ZDRAVSTVO / NASLOV PREZENTACIJE

Uglavnom se obrisci nazofarinka uzimaju vani, često po principu drive ina kako bi se smanjila mogućnost prijenosa infekcije uzrokovane potencijalnim stvaranjem aerosola prilikom samog postupka uzimanja obriska.



## Dijagnostičke mogućnosti

- izravna dijagnostika akutne COVID19 infekcije
  - molekularne metode (NAAT: RT-PCR)
  - detekcija antiga (niska osjetljivost 34-80%)
- neizravna dijagnostika/serologija
  - detekcija protutijela
  - seroprevalencija
  - nedokazana, ali klinički jasna infekcija

## RT-PCR

- detekcija jedinstvene specifične sekvene virusne RNA koristeći NAAT
- lančana reakcija polimeraze uz reverznu transkripciju u stvarnom vremenu (rRT-PCR)
- po potrebi potvrda sekvenciranjem
- ne preporuča se inaktivacija uzorka zagrijavanjem prije ekstrakcije
- RNA ekstrakcija se izvodi u biozaštitnim kabinetima 2. kategorije (BSL-2)



NAAT: metode koje koriste amplifikaciju nukleinske kiseline, u ovom slučaju lančana reakcija polimeraze s reverznom transkripcijom.

## Protokoli za RT-PCR

Table 9.2 Currently available protocol

Country	Institute	Gene targets
China	China CDC	ORF 1ab and N
Germany	Charité	RdRp, E, N
Hong Kong SAR	HKU	ORF 1b-nsp14, N
Japan	National Institute of Infectious Diseases, Department of Virology	Pancorona and multiple targets, spike protein
Thailand	National Institute of Health	N
USA	US CDC	Three targets in N gene
France	Pasteur Institute, Paris	Two targets in RdRp gene

Adapted from WHO (2020e)



Fig. 9.5 Relative positions of amplicon targets on SARS-CoV-2 genome. *ORF* open reading frame, *RdRp* RNA-dependent RNA polymerase, *E* envelop protein gene, *N* nucleocapsid protein gene, *M* membrane protein gene, *S* spike protein gene

Preporučeni protokoli koji se koriste za detekciju SARS-CoV-2 i koji su odobreni za primjenu od SZO.



## ***In-house* testovi ili *in vitro* dijagnostički (IVD) medicinski proizvodi**

- *In-house* testovi su ne-komercijalni testovi
- protokoli slijede protokole objavljene u stručnoj literaturi
- rade se prema pravilima dobre laboratorijske prakse
- važan je odabir odgovarajućih ciljnih sekvenci SARS-CoV-2 virusnog genoma (RNA)
- PCR s reverznom transkripcijom testovi se izvode na PCR platformama namijenjenim za laboratorijsku dijagnostiku



## ***In-house testovi ili *in vitro* dijagnostički (IVD) medicinski proizvodi***

- IVD testovi su komercijani kitovi ili sistemi koje proizvođači stavlju na tržiste sukladno pravilnicima o registraciji takvih proizvoda
- koriste se prema uputama proizvođača
- obično su validirani za rada na PCR platformama koje su najprodavanije
- potrebno ih je provjeriti u kako se ponašaju na opremi u laboratoriju, odosno u uvjetima u kojima će se primjenjivati
- FIND. SARS-COV-2 MOLECULAR ASSAY EVALUATION: RESULTS 2020. (<https://www.finddx.org/covid-19/sarscov2-eval-molecular/molecular-eval-results/>)



## Serološka dijagnostika

- može biti dopuna molekularnim metodama u dijagnostici akutne infekcije
- ako je PCR negativan, a postoji opravdana sumnja na COVID19 preporuča se uzeti parne serume
- najznačajnija primjena seroloških testova je za procjenu proširenosti infekcije u populaciji
- Point of Care (PoC) testovi, EIA, test neutralizacije virusa (*VNT- virus neutralisation test*)

## Neutralizacijski test (VNT)

- na HZZ je postavljen u suradnji s Veterinarskim fakultetom, Zagreb
- BS-3 Odjela za dijagnostiku tuberkuloze, HZZ
- uzgoj virusa iz pozitivnog uzorka na COVID19
- Vero E6 stанице
- dokazuju se neutralizacijska protutijela
- njihova prisutnost inhibira pojavu citopatskog učinka (CPU) virusa na stanicama



Za razliku od PCR dijagnostike koja se radi u BS-2 laboratoriju, uzgoj virusa u staničnoj kulturi mora se izvoditi u BS-3 laboratoriju.

# Seroprevalencija u zdravstvenih djelatnika

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical  
Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine  
Vol. 53(e2020458) - 2020  
<http://doi.org/10.1590/0037-8502-e458-2020>



## Letter

### Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 seroprevalence among personnel in the healthcare facilities of Croatia, 2020

Tatjana Vilibic-Cavlek<sup>[1][2]</sup>, Vladimir Stevanovic<sup>[3]</sup>, Irena Tabain<sup>[1]</sup>, Ljiljana Betica-Radic<sup>[4]</sup>, Dario Sobad<sup>[5][6]</sup>, Ljiljana Peric<sup>[3][4]</sup>, Maja Bogdanic<sup>[1]</sup>, Maja Vilibic<sup>[7]</sup>, Branko Kolaric<sup>[8][9]</sup>, Boris Kudumija<sup>[10]</sup>, Goranka Petrovic<sup>[11]</sup>, Anna Mrzljak<sup>[2][12]</sup>, Svetlana Karabuva<sup>[13]</sup>, Irena Hrustic<sup>[14]</sup>, Krinoslav Capak<sup>[15]</sup>, Jasmina Kucinac<sup>[16]</sup>, Vladimir Savic<sup>[17]</sup>, Ljubo Barbic<sup>[3]</sup>

U studiji određivanja seroprevalencije u zdravstvenih djelatnika, utvrđena je niska seroprevalencija, slična kao u općoj populaciji što znači da su se djelatnici pridržavali mjera osobne zaštite.



TABLE 1   Epidemiological data and laboratory analysis of health workers	
Characteristic	N (%) tested
Age:	142 (25.7%)
<30	440 (78.9%)
30-39	12 (2.2%)
40-49	11 (1.9%)
50-59	11 (1.9%)
≥60	109 (18.2%)
Female:	140 (25.0%)
Health workers by profession: COVID-19 diagnosis:	142 (25.7%)
Confirmed with a confirmed COVID-19 patient:	440 (78.9%)
Health workers in large community events:	12 (2.2%)
Community events:	109 (18.2%)
Intensive isolate - care staff:	31 (5.5%)
Intensive care unit staff:	12 (2.2%)
Non-intensive ward staff:	12 (2.2%)
Caregiver - non staff:	23 (3.9%)
Gynaecology - non staff:	81 (14.2%)
Emergency room staff:	28 (5.0%)
Health visitors:	49 (1.7%)
Pharmaceutical staff:	22 (3.9%)
Physiotherapy - non staff:	22 (3.9%)
Podiatry - non staff:	11 (1.9%)
Reception - non staff:	34 (6.1%)
Respiratory - non staff:	29 (4.9%)
Microbiologist - COVID-19 diagnosis staff:	37 (6.5%)
Emergency medical health staff:	10 (1.8%)
Patients transportation:	33 (5.9%)
Other medical staff:	13 (2.3%)
Health visitors staff:	12 (2.2%)
Medical practice staff:	48 (8.4%)
Medical practice - non health staff:	22 (3.9%)
Other medical services (pharmacy, laboratory, etc.):	46 (8.2%)
Community communication COVID-19:	140 (25.0%)
First visit to S:	66 (11.9%)
Other:	32 (5.7%)
Language:	142 (25.7%)
Croatian (native speakers):	142 (25.7%)
Non-Croatian:	142 (25.7%)
Other:	144 (25.2%)
Total:	142 (25.7%)
Degree of education:	142 (25.7%)
Secondary school:	43 (10.8%)
Higher education in COVID-19:	108 (24.0%)
Higher education in COVID-19:	153 (22.8%)

COVID-19: coronavirus disease; RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction; SARS-CoV-2: severe acute respiratory syndrome coronavirus 2.

- SZO: svi zaposlenici koji pružaju zdravstvenu skrb te svi koji dolaze u kontakt s bolesnikom ili njegovom okolinom
- 592 uzorka seruma
- 6 županija
- IgG EIA probir (2,7%)
- VNT potvrđni test (1,5%)

Zdravstveni djelatnici s odjela na kojima su se liječili COVID19 bolesnici su najvećem broju razvili protutijela na COVID19. Infekcija je u većine bila asimptomatska. Ovo je samo pilot istraživanje i potrebno bi bilo provesti opsežnije da se potvrde ovi preliminarni podaci.

**ECCVID**  
ESCMID Conference on  
Coronavirus Disease  
*Emerging threats, emerging solutions*  
23 – 25 September 2020

#00328 Prevalence of SARS-CoV-2 in Zagreb, Croatia, 2020 in the 'One Health' context

b. Epidemiology - local, regional, global

T. Vilibić-Cavlek<sup>1</sup>, V. Stevanović<sup>2</sup>, I. Tabain<sup>1</sup>, D. Brlek-Gorski<sup>1</sup>, N. Janev-Holcer<sup>1</sup>, L. Barbić<sup>2</sup>, D. Mayer<sup>1</sup>, Z. Hruškar<sup>1</sup>, J. Lenicek Krleza<sup>3</sup>, D. Grubec<sup>4</sup>, D. Rogic<sup>1</sup>, P. Jeličić<sup>1</sup>, V. Šavić<sup>5</sup>, K. Capak<sup>1</sup>, B. Kać<sup>1</sup>

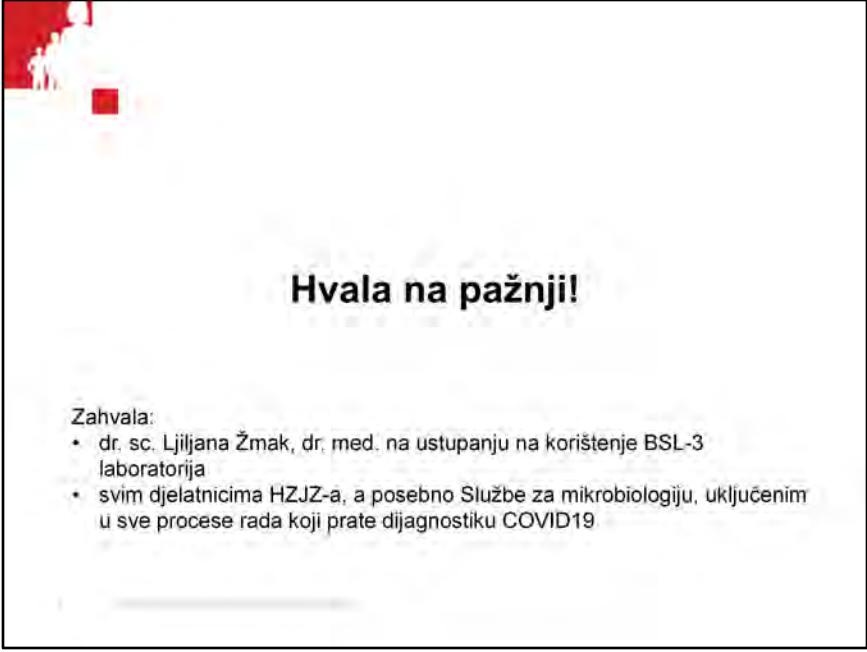
Ispitanici	N tested	ELISA N positive	VNT N positive
Odrasle osobe	315 (57,7%)	8 (2,5%)*	
Djeca	241 (42,3%)	7 (2,9%)*	
<b>Ukupno</b>	<b>546 (100%)</b>	<b>15 (2,7%)</b>	<b>1 (0,2%)</b>

\*  $\chi^2=0.069$ ,  $p=0.792$

Zanimljivo je bilo i vidjeti situaciju u kontekstu jednog zdravlja. Pa samo napravili malu studiju na 556 osoba s ili bez simptoma te 167 seruma kućnih ljubimaca iz Zagreba i uz to analizirali površine koje su bile u okolini COVID19 bolesnika. Zaključak je da su u 2,7% osoba dokazana protutijela na COVID19 te 7,2% pasa. Dodatno je pomoću RT-PCR u 3 okolišna uzorka nađen genetski materijal virusa i to uglavnom na površinama koje se često dodiruju poput mobitela i upravljača za igricu.



S obirom na povijest javljanja epidemija uzrokovanih koronavirusima ovo, nažalost, nije bilo neočekivano. Međutim, nitko nije bio spreman za ovu situaciju. Više je razloga za to, a jedan od najvažnijih je svakako nedostatak opsežnijih ispitivanja o prehodnim koronavirusima (SARS i MERS). Kako se pripremiti za dalje teško je reći. Sasavim sigurnao bi jedan od važnih koraka bio pažljivo praćenje, probir i identifikacija koronavirusa prisutnih u divljim životnjama u Kini, posebno u šišmiša tako da u slučaju sličnog scenarija budemo spremniji. No, za sada se još moramo naučiti živjeti s ovim virusom, što bolje ga istražiti, a posebno terapijske opcije i mogućnosti prevencije, poput cjepiva.



## **Hvala na pažnji!**

Zahvala:

- dr. sc. Ljiljana Žmak, dr. med. na ustupanju na korištenje BS-3 laboratorija
- svim djelatnicima HZJZ-a, a posebno Službe za mikrobiologiju, uključenim u sve procese rada koji prate dijagnostiku COVID19