

UDK 37

ISSN 2545 – 4439

ISSN 1857 - 923X

INTERNATIONAL JOURNAL

Institute of Knowledge Management

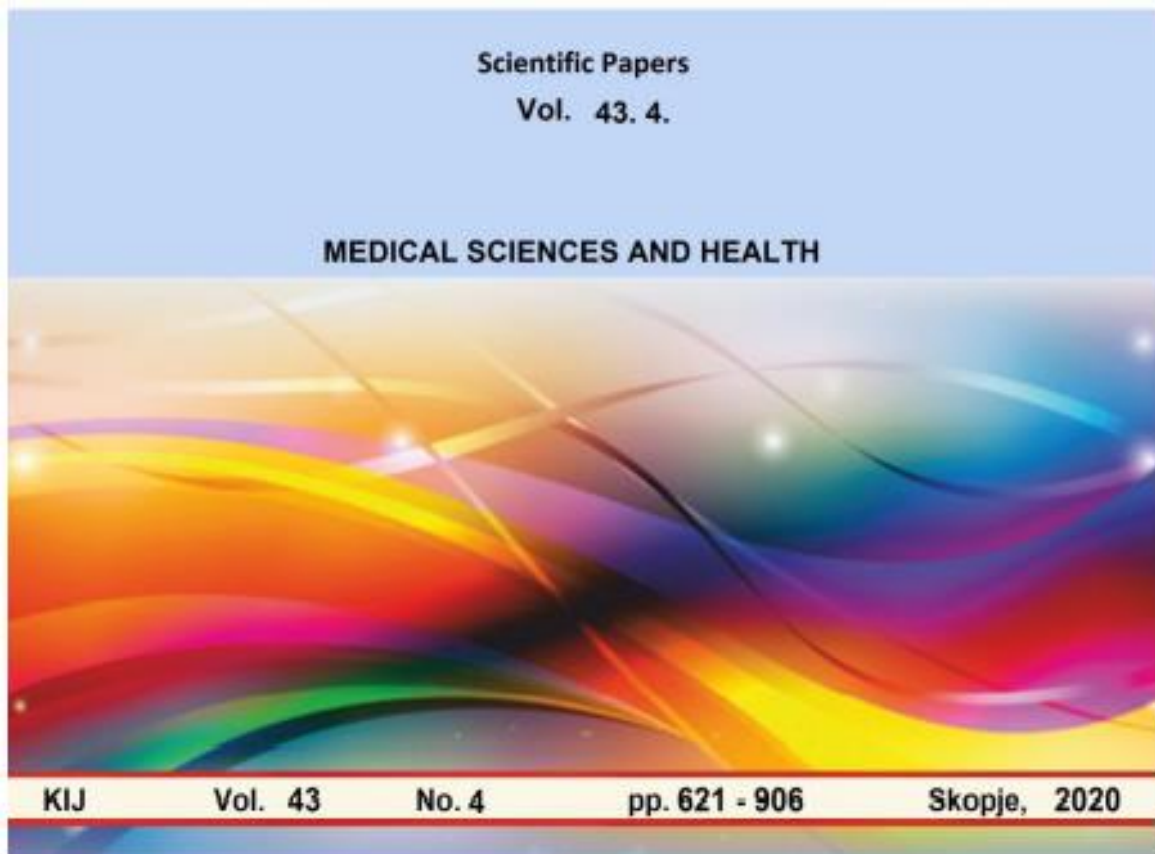
KNOWLEDGE



Scientific Papers

Vol. 43. 4.

MEDICAL SCIENCES AND HEALTH



KIJ

Vol. 43

No. 4

pp. 621 - 906

Skopje, 2020

KNOWLEDGE

INTERNATIONAL JOURNAL



SCIENTIFIC PAPERS VOL. 43.4

December, 2020



KNOWLEDGE

International Journal Scientific Papers Vol. 43.4

ADVISORY BOARD

Vlado Kambovski PhD, Robert Dimitrovski PhD, Siniša Zarić PhD, Maria Kavdanska PhD, Venelin Terziev PhD, Mirjana Borota – Popovska PhD, Cezar Birzea PhD, Veselin Videv PhD, Ivo Zupanovic, PhD, Savo Ashtalkoski PhD, Zivota Radosavljević PhD, Laste Spasovski PhD, Mensad Majevec PhD, Milka Zdravkovska PhD, Drago Cvijanovic PhD, Predrag Trajković PhD, Lazar Stosic PhD, Krasimira Staneva PhD, Nebojsa Pavlović PhD, Daniela Todosova PhD, Baki Koleci PhD, Lisen Bashkurti PhD, Zoran Szecenić PhD, Sinisa Opic PhD, Marija Kostic PhD

Print: GRAFOPROM – Bitola

Editor: IKM – Skopje

Editor in chief
Robert Dimitrovski, PhD

KNOWLEDGE – International Journal Scientific Papers Vol. 43.4

ISSN 1857-923X (for e-version)
ISSN 2545 – 4439 (for printed version)

CONTENTS

ANATOMICAL JAW RESTORATION OF A CHILD WITH PLEUMORPHIC ADENOMA IN THE MAXILLA	637
Ivan Gerdzhikov	637
CAD/CAM POST-AND-CORE: DIFFERENT MATERIALS FOR ESTHETIC AND FRACTURE STRENGTH.....	641
Arian Daci	641
Aneta Mijoska.....	641
Gordana Kovacevska.....	641
PATHOLOGICAL CHANGES OF DENTAL CEMENTUM DURING PERIODONTAL DISEASE	645
Mihajlo Petrovski	645
Kiro Papakoca.....	645
CEPHALOMETRIC GRAPHICAL EVALUATION OF THE EXACT LOCATION OF TRANSVERSE MAXILLOFACIAL DISCREPANCIES	649
Silviya Krasteva.....	649
Tatyana Boeva.....	649
Keti Yovcheva.....	649
ZIRCONIA AS A BIOMATERIAL IN DENTAL PROSTHETICS	657
Natasha Stavreva	657
ACCURACY OF TRY-IN PASTE IN PREDICTING THE FINAL COLOR OF MONOLITHIC CERAMIC RESTORATIONS	663
Julija Zarkova Atanasova	663
Ivona Kovacevska.....	663
IN-VITRO EVALUATION OF DEPTH READING AND QUALITY OF POST SPACE IN THE ROOT CANAL USING INTRAORAL (IOS) COMPARED TO A LABORATORY SCANNER FOR CAD/CAM POST AND CORE.....	669
Arian Daci	669
Gordana Kovacevska.....	669
Cena Dimova	669
Marjan Petkov.....	669
STAGES AND PATHOPHYSIOLOGICAL MECHANISMS OF ACTION OF MRONJ	677
RosenTsolov	677
Georgi Yordanov	677
FLOW OF STIMULATED SALIVA AND BUFFER CAPACITY IN CHILDREN WITH PRIMARY DENTITION	681
Sanja Naskova	681
THERAPEUTIC APPROACH TO CARIES PROFUNDA	687
Natasa Longurova.....	687
Katerina Zlatanovska.....	687
Sanja Nashkova	687
REVIEW OF CERTAIN DIAGNOSTIC TESTING FOR NOVEL HUMAN CORONAVIRUS (SARS-CoV-2).....	693
Vaso Taleski	693
Elena Sark Apostoloski	693
Angela Naumova	693
Magdalena Ilieva	693
COVID 19 AND EMERGENCY MEDICAL SUPPORT	699
Kiril Atliev.....	699
Rostislav Kostadinov.....	699

REVIEW OF CERTAIN DIAGNOSTIC TESTING FOR NOVEL HUMAN CORONAVIRUS (*SARS-CoV-2*)

Vaso Taleski

Faculty of Medical Sciences, University „Goce Delchev“ - Štip, Republic N. Macedonia,
“Biotek Laboratory” – Skopje, Republic N. Macedonia, vaso.taleski@ugd.edu.mk

Elena Sark Apostoloski

“Biotek Laboratory” – Skopje, Republic N. Macedonia, sark_elena@yahoo.com

Angela Naumova

“Biotek Laboratory” – Skopje, Republic N. Macedonia

Magdalena Ilieva

“Biotek Laboratory” – Skopje, Republic N. Macedonia

Abstract: *SARS-CoV-2*, novel coronavirus, cause of the ongoing global pandemic of the human respiratory disease COVID-19, a member of the family *Coronaviridae*, sub-family *Coronavirinae*, genus *Betacoronavirus*. *SARS-CoV-2* is enveloped, sense-positive, single-stranded RNA virus with large genome (30 kb).

Diagnostic testing includes detection the virus (viral RNA segments or viral antigens) or detection the human immune response to infection (IgM and IgG antibodies or other biomarkers).

There are still many outstanding questions that need proper answers. Sharing experiences and scientific expertise is of great importance to find out best answers.

In this paper, presented data of last two months (October and November 2020), performed by most advanced methods we are using in our laboratory: RT-PCR, Rapid Antigen Testing and Antibody testing (VIDAS – ELFA). Comparative analysis of results on representative number of samples performed by RT-PCR and VIDAS are presented as well.

Keywords: *SARS-CoV-2*, RT-PCR, antigens, genes, antibodies, IgG, IgM, VIDAS-ELFA

ПРЕГЛЕД НА ОДРЕДЕНИ ДИЈАГНОСТИЧКИ ТЕСТОВИ ЗА НОВИОТ ХУМАН КОРОНА ВИРУС (*SARS-CoV-2*)

Васо Талески

Факултет за медицински науки, Универзитет „Гоце Делчев“ Штип, Република С. Македонија
vaso.taleski@ugd.edu.mk

Елена Сарк Апостолоски

„Биотек Лабораторија“ – Скопје, Република С. Македонија, sark_elena@yahoo.com

Ангела Наумова

„Биотек Лабораторија“ – Скопје, Република С. Македонија

Магдалена Илиева

„Биотек Лабораторија“ – Скопје, Република С. Македонија

Резиме: *SARS-CoV-2*, е нов корона вирус, причинител на тековната светска пандемија на хуманата респираторна болест КОВИД-19, член на фамилијата *Coronaviridae*, под-фамилија *Coronavirinae*, род *Betacoronavirus*. *SARS-CoV-2* е сенс-позитивен вирус со обвивка, со едноверижна РНК и со голем геном (30 kb).

Дијагностичките тестирање опфаќаат детекција на вирусот (сегменти на вирусна РНК или вирусни антигени) или детекција на хуманиот имун одговор кон инфекцијата (IgM и IgG антители или други био-маркери).

Во трудот се презентирани податоци за последните два месеци (октомври и ноември 2020), добиени со најсовремени методи кои ги користиме во нашата лабораторија: RT-PCR, Брзи антигенски тестови и Тестови за антители (VIDAS – ELFA). Прикажана е и компаративна анализа на податоци на репрезентативен број на примероци, добиени со RT-PCR и VIDAS.

Клучни зборови: *SARS-CoV-2*, RT-PCR, антигени, гени, антители, IgG, IgM, VIDAS-ELFA

1. BOBED

До сега се познати седум видови на корона вируси кои предизвикуваат заболувања кај луѓето. Од нив, четири најчесто причинуваат лесни настинки кај особи со добар имун систем. Останатите три вида (*SARS-CoV*, *MERS-CoV* и *SARS-CoV-2*) се откриени во последните две децении, се пренесуваат како зоонози и може да предизвикаат тешки респираторни заболувања и смрт. *SARS-CoV* (Severe acute respiratory syndrome) предизвика епидемија на тежок акутен респираторен синдром во 2002 и 2003, во провинцијата Гуандонг во Кина. *MERS-CoV* (Middle East respiratory syndrome coronavirus) предизвика епидемијата на тешко респираторно заболување во 2012 година на Блискиот исток. Пандемијата која почна во 2019 година, активна во тек на целата 2020 година и не може со сигурност да се предвиди до кога ќе трае, е предизвикана од новиот хуман корона вирус *SARS-CoV-2*, а заболувањето се наречено COVID-19 (CDC, 2019).

Следењето на генетските секвенци на овој вирус и другите примероци на вируси покажало сличност со *SARS-CoV* (79,5%) и коронавирус на лилјаци (96%) (Peng et al, 2020).

Симптомите во раните стадиуми на болеста се неспецифични. Диференцијално дијагностички треба да се земат предвид можен широк спектар на инфективни и не инфективни заболувања (пр. васкулитис, дерматомиозитис), чести респираторни заболувања предизвикани од: аденовирус, инфлуенца (грип), хуман метапнеумовирус (HmPV), параинфлуенца, респираторен синцициелен вирус (RSV) и риновируси (настинка).

За ефикасно справување и контрола на пандемијата, како и за спроведување на соодветна и навремена терапија на болните, покрај останатите мерки, непоходни се брзи, евтини, лесно достапни, високо специфични и високо сензитивни валидирани и одобрени тестови.

Морфологијата и геномската структура на хуманите коронавируси се од големо значење за разбирање на дијагностичките методи.

Во вирусната обвивка се закотвени структурни протеини т.н. *Spike* гликопротеини (S) кои посредуваат во врзувањето и навлегувањето на вирусот за таргет клетките.

Пократки површински протеини, слични на боцки се димери на Хемаглутинин естераза (HE).

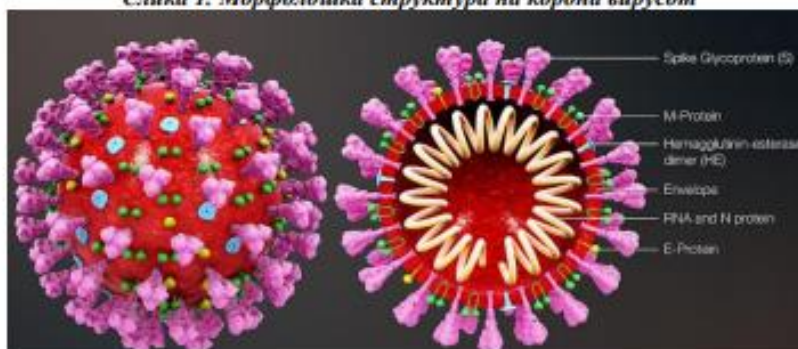
Вирусната обвивка е поддржана од Мембрански гликопротеин (M).

Мал транс-мембрански протеин познат како Протеин на обвивката (E - envelope) е присутен во мала количина.

Обвивката го обвиткува хеликално симетричниот нуклеокапсид, кој е формиран од мултипли копии на Нуклеокапсидни (N-nucleocapsid) протеини. Овие протеини ја обвиткуваат вирусната РНК.

(Fung, Liu, 2019; Kumar et al, 2020).

Слика 1. Морфолошка структура на корона вирусот



Липидниот двослој од обвивката (вирусот го добива од клетката домаќин), мембранските протеини и нуклеокапсидот го штитат вирусот од клетката на домаќинот.

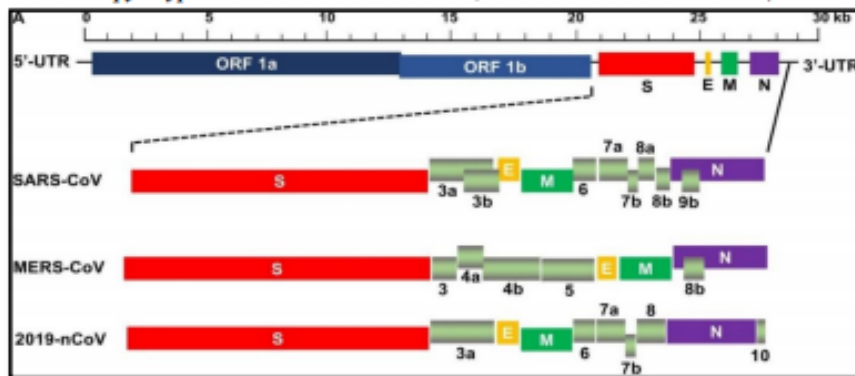
Постојат одредени разлики во структурата на геномот на *SARS CoV-2* и другите корона вируси (сл. 2).

Големиот на геномот е од 26 до 32 kb и се состои од 6-11 отворени рамки за читање (open reading frames – ORFs) кои кодираат 9680 аминокиселински поли-протеини.

Првиот ORF (ORF 1a & ORF 1b) зазема од 67% од геномот и кодира 16 не-структурни протеини (nsps: 1-16), додека останатите ORFs кодираат дополнителни и структурни протеини (Ralph R. et al, 2020).

Геномот има гени за четирите главни структурни протеини: S-spike површински гликопротеин (S), мембрански протеин (M), нуклеокапсиден протеин (N), протеин на обвивката (E) како и гени за дополнителни протеини.

Слика 2. Структура на геномот на SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2 (2019-nCoV)



2. ЦЕЛ НА ТРУДОТ

Прикажување на најсовремени методи за лабораториска дијагностика на SARS CoV-2 инфекциите и набројување на дополнителни тестови кои се користат за комплетирање на дијагнозата и следење на текот на болеста.

Во трудот ќе се прикаже и компаративна анализа да одреден број на резултати од нашата лабораторија во која се применуваат најсовремените методи на дијагностика (RT-PCR и детекција на антитела со Автоматизиран систем VIDAS кој користи најсовремена ELFA технологија како и резултати од Брза детекција на антигени).

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

Испитувањата се вршени во ПЗУ „Биотек Лабораторија“, во Скопје, С. Македонија.

Прикажани се резултати од двомесечен период за тестирања со RT-PCR за SARS CoV-2 инфекции, за прегледани вкупно 11.634 пациенти и 496 Брзи антигенски тестови.

Тестовите за SARS CoV-2 се поделени во три групи:

1. **Молекуларни тестови** – откриваат активна инфекција
2. **Антигенски тестови** – откриваат активна инфекција
3. **Серолошки тестови** – откриваат претходна инфекција

1. Молекуларни тестови за детекција на делови од вирусниот геном со RT-PCR

Испитуваните примероци во нашиот труд се назофарингеални и орофарингеални брисеви. Постојат тестови и за плунка.

Голем број на лаборатории и компании произведуваат тест-реагенси и протоколи (одобрени од WHO) за RT-PCR амплификација и детекција на специфичните гени на вирусот:

- Open Reading Frame 1a/b (ORF1ab)
- нуклеокапсиден протеин (N) и
- протеин на обвивката (E)
- RdRP (ензим РНА зависна РНА полимераза, е.г. РНА репликаза)

Комбинираната детекција на овие гени од повеќе типови примероци може да ја подобри дијагностиката.

Во неколку студии е утврдено дека пациенти со позитивни наоди во назофарингеални и орофарингеални брисеви, имале позитивни наоди во крв во 30-40% случаи, околу 50-60% во фекасот, додека во урина во многу мал процент. Овие тестови се позитивни пред појава на знаци и симптоми на болеста и можат да бидат позитивни долго време откако лицето веќе не е инфективно (и по 28 дена после инфекцијата).

Во нашата лабораторија се користи Real time multiplex RT-PCR на DNA Technology со таргети за докажување на E и N гените на SARS CoV-2.

2. Детекција на антигени

Испитуваните примероци се назални или назофарингеални брисеви. Овие тестови се позитивни кога лицето е најинфективно. За разлика од RT-PCR, брзите тестови за детекција на антигени детектираат присуство на вирусните антигени од назофарингеален брис без потреба од амплификација заради што и

сензитивноста им е помала, но имаат висока специфичност. WHO и ECDC прифаќаат минимум сензитивност $\geq 80\%$ и специфичност $\geq 97\%$. Овие тестови се сензитивни за случаи со голем број на вируси: пре-симптоматски и рано симптоматски особи (до пет дена од почеток на симптомите). Кога се знае времето на експозиција (контакт) овој тест треба веднаш да се направи но ако се направи подоцна од 7 дена тогаш позитивните наоди се сметаат за позитивни а негативните мора да се потврдат со RT-PCR (WHO, 2020).

Брзите антигенски тестови се изведуваат блиску до пациентите, не е потребна дополнителна скапа опрема, и може да се користат за скрининг на големи групи на луѓе и за следење на контакти.

ECDC го препорачува тестот за употреба во земјите на EU.

Во нашата лабораторија се користи Брзиот антигенски тест V-CHEK™ SARS CoV-2 Rapid Ag test. Тестот се изведува за околу 15 минути. Овие тестови се во употреба од пред помалку од еден месец.

3. Серолошки тестови за детекција на специфични антитела (IgM и IgG)

Специфичните антитела не можат да се докажат во раната фаза на инфекцијата.

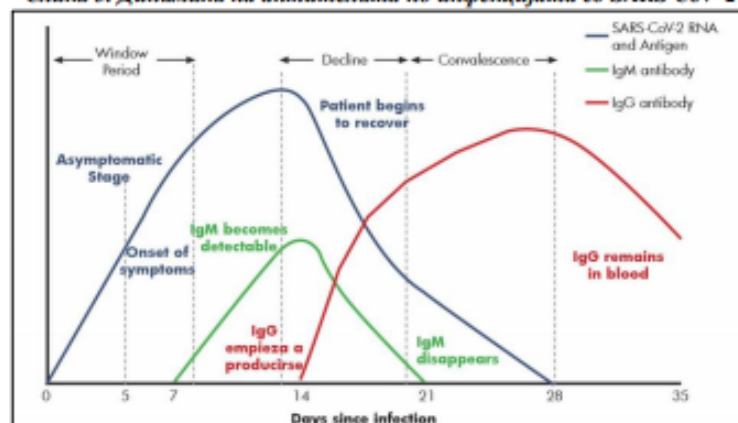
IgM може да се детектира после 10 дена од почетокот на инфекцијата. Максимално ниво имаат околу 14-от ден потоа опаѓаат до недектибилно ниво до 21-от ден.

IgG антителата се појавуваат околу 14-от ден од инфекцијата, со максимално ниво околу 26-28-от ден, остануваат долго, најмалку уште шест месеци.

Лица со висок титар на IgG антитела се потенцијални донори на ковалесцентна плазма за лекување на болни од COVID 19. Негативен тест за IgG антитела значи дека лицето не било заболено во минатото од COVID 19.

Бројот на вируси (viral load) постепено се намалува со порастот на нивоата на IgG антитела во серумот.

Слика 3. Динамика на антителата по инфекцијата со SARS CoV-2



За детекција на специфични IgM и IgG антитела е користен апаратот VIDAS кој користи супериорна, автоматизирана ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) технологија. Принцип на оваа метода е комбинирање на методата на сендвич ензимски имунотест со флуоресцентна детекција на специфичните антитела. Резултатите се анализираат автоматски од вграден компјутер во апаратот. Специфичноста на овие тестови е 99,4 % за IgM и 99,9% за IgG антитела, а сензитивноста за IgM+IgG по PCR позитивен тест во првите 8-15 дена е 96,4%, а од 16-от ден 100%. Резултатите се добиваат за околу 30 минути.

Табела 1. Интерпретација на резултатите на VIDAS за IgM и IgG антитела

Index	Test Result	Interpretation
$i < 1.00$	Negative	IgM antibodies to SARS-CoV-2 not detected
$i \geq 1.00$	Positive	IgM antibodies to SARS-CoV-2 detected

Index	Test Result	Interpretation
$i < 1.00$	Negative	IgG antibodies to SARS-CoV-2 not detected
$i \geq 1.00$	Positive	IgG antibodies to SARS-CoV-2 detected

Останати методи кои се користат за дијагноза и процена на состојбата и одлука за терапијата на болните опфаќаат:

- **Детекција на индикатори на инфламаторен одговор:** *C-реактивен протеин (CRP), прокалцитонин, феритин, D-димери, вкупна субпопулација на лимфоцити, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , INF- γ* и други индикатори можат да допринесат за евалуација на клиничкиот напредок, да укажат на тенденција за тешки и критични случаи и да дадат основа за одредување на стратегии за терапија. Повеќето пациенти заразени со SARS-CoV-2 имаат нормално ниво на прокалцитонин со значајно зголемено ниво на C-реактивен протеин. Репидно и значително зголемено ниво на CRP укажува на можноста за секундарна инфекција. Нивото на D-димери значително се зголемува кај тешки случаи, и претставува потенцијален ризик фактор за лоша прогноза. Пациентите со низок вкупен број на лимфоцити на почетокот на болеста генерално имаат тешка прогноза. Нивото на IL-6 и IL-10 кај тешко заболени се зголемува значително.
- **Детекција на секундарни бактериски и габични инфекции:** се испитуваат искашлок, бронхоалвеоларен лаваж, трахеален аспират, хемокултура.
- **Радиолошки испитувања:** класично рентген снимање на белите дробови и КТ.

4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Анализирани се резултатите од испитувањата со RT-PCR за последните два месеци (октомври и ноември 2020), компаративна анализа на резултати RT-PCR и IgM IgG антитела кај 126 пациенти, и резултати од 496 Брзи антигенски тестови.

Табела 1. Резултати на RT-PCR во октомври и ноември 2020

Месец	RT-PCR (+)		RT-PCR (-)		Вкупно
Октомври 2020	1.019	20%	4.006	80%	5.025
Ноември 2020	2.358	35,6%	4.251	64,4%	6.609
Вкупно	3.377	29%	6.457	71%	11.634

Во тек на октомври и ноември 2020 година направени се вкупно 11.634 испитувања со RT-PCR, од кои позитивни беа 3.377 (29%) а негативни 6.457 (71%). Во октомври процентот на позитивни случаи е 20% со значително зголемување во ноември на бројот на испитани и бројот на позитивни на 29% што го потврдува интензивирањето на пандемијата (епидемијата) во Македонија.

Компаративна анализа на резултати на RT-PCR и IgM IgG антитела е прикажана на табела 2.

Табела 2. Компаративна приказ на резултати од RT-PCR и IgM / IgG антитела

RT-PCR		IgM - IgG -	IgM + IgG +	IgM - IgG +
(+)	22 (17,4%)	5 (23%)	10 (45%)	7 (32%)
(-)	104 (83,6%)	0	3 (3%)	14 (13%)
Вкупно	126	5 (4%)	13 (10%)	21 (17%)

Прикажаните резултати укажуваат на следното:

- Кај 22 позитивни лица со RT-PCR, IgM-/IgG- биле 5 лица што значи дека биле во почеток на инфекцијата кога антитела сèуште не почнале да се создаваат, овие анализи биле предвремено направени; IgM+/IgG+ биле 10 лица кои се наоѓале во акутна фаза на инфекцијата, и IgM-/IgG+ биле 7 лица кај кои биле излекувани но сè уште кај нив се детектираат остатоци од вирусната RNA, што може да се случува од 21 до 28 ден од инфекцијата.
- Кај 104 негативни лица со RT-PCR, IgM+/IgG+ било 3 лица, тие биле меѓу 14 и 20 ден од инфекцијата, а 14 лица имале IgM-/IgG+ што значи дека биле излекувани.
- Вредностите на IgG антителата беа во ранг од 1,23 до 30,56 (позитивни се над 1, табела 1). Десет лица имаа висок титар на IgG антитела повеќе од 17, што претставува веројатно солиден имунитет и исто така тие се потенцијални донори на ковалесцентна плазма за третман на тешко заболени пациенти со COVID 19.

Брзиот антигенски тест е воведен неодамна. Од 496 изработени тестови, позитивен наод има кај 72 (14,5%), а негативни 424 (85,5%). Позитивните лица во пре-симптоматски или рано симптоматски фаза на инфекцијата во период кога биле и најинфективни. На лица со негативен антигенски тест и присутни симптоми препорачан им е RT-PCR.

4. ЗАКЛУЧОК

Брзи, евтини, лесно достапни, високо специфични и високо сензитивни валидирани и одобрени тестови се неопходни за ефикасна, брза и трајна контрола на пандемијата COVID 19 и од огромна важност за почеток и следење на терапијата на болните.

За дијагностика на SARS CoV-2 инфекциите се користат најсовремени лабораторски методи со кои (треба) да работи соодветно високо едуциран и обучен кадар. Сите применувани методи даваат високо ниво на сензитивност и специфичност.

Молекуларните тестови (RT-PCR) се позитивни пред појава на знаци и симптоми на болеста и можат да бидат позитивни долго време откако лицето веќе не е инфективно (до 28 дена после инфекцијата).

Најдоброто време на испитувањата е од исклучително значење. Брзите антигенски тестови имаат висока сензитивност и специфичност ако се направат во првите седум дена од инфекцијата.

Серолошки тестови за одредување на специфични IgM антитела може да се прават пред 21 ден од инфекцијата а за IgG по 14 до 28 ден од инфекцијата, но се детектираат уште долго време по инфекцијата.

Компаративните анализи на резултатите на RT-PCR со IgM и IgG антителата овозможуваат точна процена на фазата на болеста но секогаш мора да се имаат во предвид и клиничката слика и здравствената состојба на пациентите и резултатите од дополнителните испитувања.

Лица со висок титар на IgG антитела се потенцијални донори на ковалесцентна плазма за лекување на болни од COVID 19. Негативен тест за IgG антитела значи дека лицето не било заболено во минатото од COVID 19.

КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

- Centers for Disease Control and Prevention (2020). Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/hcp/index.html>
- Fung T.S., & Lui D.X. (2019). Human Coronavirus: Host-Pathogen Interaction, Annual Review of Microbiology 2019.73:529-57
- Kumar S., Nyodu R., Maurya V.K., & Saxena, K.S. (2020). Morphology, Genome Organization, Replication, and Pathogenesis of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)*, 2020: 23–31. Published online 2020 Apr 30. doi: 10.1007/978-981-15-4814-7_3.
- Peng Z., Xing-Lou Y., Xian-Guang W., et al. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*: 1–4, 3 February 2020. doi:10.1038/s41586-020-2012-7. PMID 32015507.
- Ralph R., Lew J., Zeng T., Francis M. et al. (2020). 2019-nCoV (Wuhan virus), a novel Coronavirus: human to human transmission, travel-related cases, and vaccine readiness – The Journal of Infection in developing countries, 14(1):3-17.
- WHO. (2011). Antigen-detection in the diagnosis of SARS CoV-2 infection using rapid immunoassays, Interim guidance