

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



COVID-19: PREVENTIVA, DIAGNOSTIKA IN TERAPIJA

strokovno izpopolnjevanje
s področja farmacije

Ljubljana, 22., 23. in 29. september 2020

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



Strokovno izpopolnjevanje s področja farmacije

COVID-19: PREVENTIVA, DIAGNOSTIKA IN TERAPIJA

Urednika

Tihomir Tomašič, Jasna Omersel

COVID-19: PREVENTIVA, DIAGNOSTIKA IN TERAPIJA

Urednika: izr. prof. dr. Tihomir Tomašič, asist. dr. Jasna Omersel

Recenzenti: izr. prof. Žiga Jakopin, doc. dr. Martina Gobec, asist. dr. Nanča Čebren Lipovec

Avtorji: prof. dr. Janez Tomažič, prof. dr. Borut Štrukelj, izr. prof. dr. Tihomir Tomašič, doc. dr. Lea Knez, Tanja Tomšič, asist. Tina Morgan, izr. prof. dr. Igor Locatelli, izr. prof. dr. Tomaž Bratkovič, doc. dr. Alenka Šmid, asist. dr. Jasna Omersel, doc. dr. Katja Lakota, asist. dr. Polona Žigon, doc. dr. Dan Podjed

Oblikovanje: izr. prof. dr. Tihomir Tomašič

Grafično oblikovanje naslovnice: Nina Gašperlin, Zaya Kreativni Studio, www.zaya.si

Založila: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Elektronska izdaja

Kraj in leto izida: Ljubljana, 2020

URL: <http://www.ffa.uni-lj.si/knjiznica/e-knjige>

Glavni namen knjige je podati aktualna znanstvena spoznanja o preventivi, diagnostiki in terapiji bolezni covid-19. Kljub skrbnemu delu je lahko v knjigi ostala posamezna tiskarska napaka. Avtorji, recenzenti, urednika in založnik ne prevzemajo odgovornosti za škodo, ki bi nastala z uporabo te knjige.

Kataložni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani

COBISS.SI-ID=29166339

ISBN 978-961-6378-87-1 (pdf)

UVODNE BESEDE

Na Kitajskem se je konec leta 2019 pojavilo več primerov atipične pljučnice, pri katerih so izključili običajne povzročitelje respiratornih okužb in pljučnic. Potrdili so, da okužbe povzroča novi koronavirus, ki so ga poimenovali virus hudega akutnega respiratornega sindroma 2 (SARS-CoV-2), bolezen, ki jo povzroča, pa koronavirusna bolezen 2019 ali covid-19. Virus se je v relativno kratkem času razširil po vsem svetu, zaradi česar je Svetovna zdravstvena organizacija 11. marca 2020 razglasila pandemijo. V začetku septembra 2020 je bilo potrjenih že več kot 26 milijonov okužb s SARS-CoV-2 in več kot 867.000 smrtnih primerov v več kot 200 državah po svetu. Bolezen covid-19 je prizadela tudi Slovenijo, tako neposredno zaradi obolelih, kot tudi posredno zaradi številnih ukrepov (samo)izolacije in karantene, ki so imeli velik vpliv na vseh nivojih našega življenja. V začetku septembra 2020 je bilo v Sloveniji potrjenih več kot 3000 primerov okužb s SARS-CoV-2 in več kot 130 smrtnih primerov zaradi bolezni covid-19.

Razvoj cepiv, zdravilnih učinkovin in diagnostike na področju covid-19 potekla izredno hitro. Kljub temu, da o virusu SARS-CoV-2 in bolezni covid-19 vemo vedno več, pa še vedno ostaja veliko neznank. Le-te bomo lahko rešili le s kontinuiranim sodelovanjem strokovne in znanstvene stroke ter industrije. Zato bomo na letošnjem strokovnem izpopolnjevanju na Fakulteti za farmacijo podali najnovejši pregled spoznanj o novem koronavirusu in bolezni covid-19. V uvodnem prispevku bomo predstavili znanstvena spoznanja o virusu, poteku bolezni in možnih zapletih preko različnih kliničnih primerov, ki so jim bili priča naši zdravniki. Sledil bo niz prispevkov, na katerih bomo podali novosti na področju razvoja cepiv, protivirusnih zdravilnih učinkovin in učinkovin za blaženje citokinske nevihte s poudarkom na kritičnem vrednotenju rezultatov kliničnih študij. Pojasnili bomo tudi pomen rezultatov diagnostičnih metod za dokazovanje prisotnosti virusa in imunskega odziva ter predstavili prihajajoče novosti na področju laboratorijske diagnostike okužbe SARS-CoV-2. V nadaljevanju bomo opisali vpliv okužbe s SARS-CoV-2 na nastanek in potek avtoimunskih in drugih bolezni. V zadnjem prispevku zbornika pa predstavili pristope iskanja učinkovitih rešitev za boljše obvladovanje pandemije covid-19.

V okviru izobraževanja in s prispevki v zborniku se bomo potrudili predstaviti najnovejša spoznanja o SARS-CoV-2 in covid-19, s katerimi želimo informirati strokovno javnost o trenutnem stanju boja proti covid-19 s farmakološkimi in nefarmakološkimi pristopi. Verjamemo, da vam bo pridobljeno znanje v pomoč pri razumevanju problematike covid-19 in oblikovanju kritičnega mnenja o številnih informacijah iz medijev, ter dobra opora tudi pri vsakdanjem delu tako znotraj farmacevtsko-medicinske stroke, kakor tudi pri ozaveščanju širše javnosti.

izr. prof. dr. Tihomir Tomašič, mag. farm.

asist. dr. Jasna Omersel, mag. farm.

KAZALO

Covid-19 – klinična slika	7
<i>Prof. dr. Janez Tomažič, dr. med.</i>	
Novosti na področju razvoja cepiv proti SARS-CoV-2	18
<i>Prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.</i>	
Razvoj protivirusnih učinkovin proti SARS-CoV-2	26
<i>Izr. prof. dr. Tihomir Tomašič, mag. farm.</i>	
Z dokazi podprto zdravljenje covid-19 z zdravili	37
<i>Doc. dr. Lea Knez, mag. farm.</i>	
<i>Tanja Tomšič, mag. farm.</i>	
<i>Asist. Tina Morgan, mag. farm.</i>	
<i>Izr. prof. dr. Igor Locatelli, mag. farm.</i>	
Učinkovine za blaženje sindroma sproščanja citokinov	59
<i>Izr. prof. dr. Tomaž Bratkovič, mag. farm.</i>	
Izzivi in prihodnost diagnostike okužbe s SARS-CoV-2	72
<i>Doc. dr. Alenka Šmid, mag. farm.</i>	
<i>Asist. dr. Jasna Omersel, mag. farm.</i>	
Okužbe s SARS-CoV-2 in avtoimunske bolezni	84
<i>Doc. dr. Katja Lakota, mag. farm.</i>	
<i>Asist. dr. Polona Žigon, univ. dipl. mikrobiol.</i>	
Povezovanje kvalitativnih in kvantitativnih pristopov za iskanje novih rešitev na področju obvladovanja pandemije covid-19	99
<i>Doc. dr. Dan Podjed, univ. dipl. etnol. in kult. antrop.</i>	

COVID-19: KLINIČNA SLIKA

Prof. dr. Janez Tomažič, dr. med.

Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 7, 1000 Ljubljana; Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Japljeva 2, 1525 Ljubljana; janez.tomazic@kclj.si

POVZETEK

V letu 2019 so zaznali hude akutne okužbe dihal, ki jih je povzročil novi koronavirus. Poimenovali so ga SARS-CoV-2 (*angl. severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*), ki povzroča novo infekcijsko bolezen covid-19 (*angl. coronavirus disease 19*, koronavirusna bolezen 19). Svetovna zdravstvena organizacija je zaradi globalnega širjenja potencialno smrtno infekcijske bolezni prepoznala novi koronavirus kot resno grožnjo javnemu zdravju in razglasila pandemijo. V prispevku je prikazan prenos okužbe, klinične manifestacije bolezni, vključno z inkubacijsko dobo, pogostimi in redkimi simptomi in znaki, brezsimptomno okužbo, dejavniki tveganja za hujši potek bolezni, klasifikacija bolezni, diagnostika ter laboratorijske in slikovne značilnosti covid-19.

VSEBINA

1 PRENOS OKUŽBE Z NOVIM KORONAVIRUSOM

2 KLINIČNA SLIKA BOLEZNI

2.1 Naravni potek bolezni in smrtnost

2.2 »Tiha hipoksemija«

2.3 Dejavniki tveganja za hujši potek bolezni

2.4 Klinična klasifikacija

2.5 Brezsimptomna okužba

2.6 Laboratorijski izvidi

2.7 Slikovne preiskave

2.8 Potek bolezni pri otrocih

2.9 Diagnostika

2.10 Covid-19 in negativen izvid prvega brisa nosno-žrelnega prostora

2.11 Hitri testi

2.12 Serološki testi

3 REAKTIVACIJA, REINFEKCIJA

4 ČESA NE SMEMO SPREGLEDATI?

5 VAROVANJE PACIENTOVIH OSEBNIH PODATKOV

6 SKLEP

7 LITERATURA

1 PRENOS OKUŽBE Z NOVIM KORONAVIRUSOM

Covid-19 je kužna bolezen, ki se med ljudmi prenaša kapljično in kontaktno. Bazično reprodukcijsko število (R_0) je med 2 in 4. R_0 je število pričakovanih novih okužb, ki jih povzroči bolnik ali brezsimptomno okuženi v povsem sprejemljivi populaciji. Glavni razlog hitrega širjenja okužbe je, da se virus prenese na naslednjo osebo, preden se pojavijo simptomi in znaki bolezni pri prvi osebi. Skoraj polovica vseh sekundarnih okužb je posledica prenosov od brezsimptomnih oseb (1-3). V zgornjih dihalnih poteh se virus intenzivno razmnožuje, in sicer že dva do tri dni pred začetkom bolezni in prvi teden bolezni (vrh je četrti dan bolezni). Brezsimptomni prenosni so »Ahilova peta« covid-19. Novi koronavirus se prenaša predvsem kapljično (kapljice premera 5-10 μm) (4). V zaprtih slabše prezračenih prostorih, kot so nočni klubi, restavracije, določena delovna okolja itd., kjer je veliko ljudi, predvsem kadar govorijo glasno, vpijejo ali pojejo, in so dlje časa skupaj, verjetno prihaja tudi do aerosolnega prenosa okužbe. Gre za prenos mikrokapljic, ki imajo premer $< 5 \mu\text{m}$, in jih imenujemo kapljična jedra ali aerosol. V zraku lahko ostane nekaj ur in ga osebe vdihavajo globoko v pljuča (5). Dokazano je, da virus bolj učinkovito prenašajo osebe, ki jih imenujemo »superprenašalci«. To so osebe, ki so zelo kužne in lahko prenesejo virus na nekaj 10 ali stotine ljudi med govorjenjem, vpitjem, kašljanjem in kihanjem. Iz do sedaj neznanih vzrokov izločajo veliko količino kužnih delcev. Poleg reprodukcijskega števila R_0 je pomemben tudi disperzijski faktor (k), ki pove kako določena infekcijska bolezen »grozdi«. Manjši kot je faktor k , več prenosov je od manjšega števila oseb. Kaže, da okrog 80% sekundarnih prenosov povzroči manjši delež primarno okuženih oseb (okrog 10%). Predvsem so nevarni omenjeni zaprti prostori in večja kot je gneča, večja je verjetnost, da bo vmes tudi superprenašalec novega koronavirusa in v takih okoliščinah pride do eksplozivnega širjenja okužbe (6).

2 KLINIČNA SLIKABOLEZNI

Inkubacija traja od 2 do 14 dni, v povprečju od 4 do 6 dni. Testiranje v obdobju inkubacije, še posebej prve dni po izpostavitvi, lahko poda lažno negativni izvid. Žal ni nobenih specifičnih bolezenskih simptomov in znakov, po katerih bi covid-19 lahko razlikovali od ostalih virusnih okužb dihal, kot sta npr. gripa in prehlad. Bolezen večinoma poteka subakutno. Klinična slika sega od povsem brezsimptomnih do fulminantnih oblik bolezni. Čeprav so najpogostejše prizadeta pljuča, gre za kompleksno bolezen, ki prizadene tudi druge organe. Rezultati meta-analize objavljenih raziskav kažejo, da so bile najpogostejše manifestacije vročina (88,5%–88,7%), kašelj (57,6%–68,6%) in dispneja (21,9%–45,6%) (7). V objavljeni raziskavi do sedaj največje populacije preiskovancev so deleži posameznih bolezenskih simptomov in znakov prikazani v *Preglednici 1* (8, 9). Oboleli lahko zaznajo tudi spremenjen voh (85,6%) in okus (88%). Motnje voaha, ki so sicer pogostejše pri ženskah, so v 11,8% na splošno prvi simptom covid-19 (10).

Preglednica 1. Delež bolezenskih simptomov in znakov ter slikovnih in laboratorijski nenormalnosti v največji do sedaj objavljeni klinični raziskavi (8). Stopnja bolezní je bila opredeljena glede na priporočila Ameriškega torakalnega združenja (9).

Klinični simptomi	Vse oblike bolezni	Kritična oblika bolezni	Blaga oblika bolezni
Vročina, %	88,7	91,9	88,1
Kašelj, %	67,8	70,5	67,3
Utrujenost, %	38,1	39,9	37,8
Produktivni kašelj, %	33,7	35,3	33,4
Zadihanost, %	18,7	37,6	15,1
Mialgije ali artralgije, %	14,9	17,3	14,5
Boleče žrelo, %	13,9	13,3	14,0
Glavobol, %	13,6	15,0	13,4
Mrzlice, %	11,5	15,0	10,8
Slabost ali bruhanje, %	5,0	6,9	4,6
Zamašen nos, %	4,8	3,5	5,1
Driska, %	3,8	5,8	3,5
Radiološki izvidi			
Nepravilnostinarentgenskislíki, %	59,1	76,7	54,2
Nepravilnosti na CT sliki, %	86,2	94,6	84,4
Laboratorijski izvidi			
Levkociti < 4.000 / mm ³ , %	33,7	61,1	28,1
Limfociti < 1.500 / mm ³ , %	83,2	96,1	80,4
Trombociti < 150.000 / mm ³ , %	36,2	57,7	31,6
C-reaktivni protein μ 10 mg/L, %	60,7	81,5	56,4
Laktatna dehidrogenaza >4,2 μ kat/L, %	41,0	58,1	37,1
AST > 0.67 μ kat/L, %	22,2	39,4	18,2
D-dimer > 500 μ g/L, %	46,6	59,6	43,2
AST = aspartat aminotransferaza			

2.1 Naravni potek bolezni in smrtnost

Pri 80% zbolelih bolezen poteka blago do zmerno, pri 15% je potek hud in pri 5% kritičen. Skoraj pri polovici kritično bolnih se bolezen konča s smrtnim izidom. Pri od 10% do 15% oseb z blago in zmerno prizadetostjo bolezen lahko napreduje v hujšo obliko, od 15% do 20% hudo bolnih pa lahko postane kritično bolnih. Pri tistih z blagim in zmernim potekom bolezni simptomi in znaki izzvenijo v obdobju do dveh tednov, pri hudo bolnih v obdobju dveh do štirih tednov in pri preživelih kritično bolnih v obdobju treh do šestih tednov. Stopnja smrtnosti pri obolelih (*angl. case fatality rate*) je največja v starosti nad 80 let. Gre nedvomno za infekcijsko bolezen, katere potek in prognoza sta povezani s starostjo pacienta (*angl. age-related disease*), zato ne preseneča podatek, da je več kot 90% umrlih starejših od 60 let (podatki dostopni v tedenskih poročilih Regionalnega urada SZO za Evropo: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/health-emergencies/coronavirus-covid-19/weekly-surveillance-report>). Vendar pa lahko bolezen poteka v hudi in kritični obliki tudi pri mlajših osebah (11). Ker ne vemo, koliko je brezsimptomnih in koliko blago bolnih, so ocene glede smrtnosti zelo različne, pogosto pretirane. Trenutne ocene so med 1% in 1,5% (12).

2.2 »Tiha hipoksemija«

Pri nekaterih pacientih s covid-19 pljučnico opazamo hitro poglobljajočo se hipoksemijo, ki jo imenujemo »tiha hipoksemija«. Kljub izraziti hipoksemiji in obsežnim spremembam na slikovnih preiskavah pljuč, nimajo občutka dispneje in pacienti ne dajejo videza povečanega dihalnega napora, čeprav bi to iz izkušenj pri zdravljenju drugih pljučnic pričakovali. Delež takšnih primerov še ni znan, kot tudi ni razjasnjena patofiziologija takšnega stanja. Pri »tihi hipoksemiji« je pacientovo zdravstveno stanje nekaj časa nespremenjeno, nato pa se lahko hitro poslabša. Do poslabšanja pride zaradi napredovanja same covid-19 pljučnice ali pa zaradi intenzivnega dihanja in posledičnega ustvarjanja negativnega inspiratornega intratorakalnega tlaka pride do nastanka intersticijskega edema. Podajnost pljuč nenadoma upade, nastane klasična slika ARDS (*angl. acute respiratory distress syndrome*), potreben je sprejem v bolnišnico, pogosto intubacija in mehansko predihavanje. Tovrstno poslabšanje se lahko zgodi zelo hitro. »Tiha hipoksemija« lahko predstavlja usoden problem pri bolnikih v domači oskrbi, ko bolnikovi življenjski znaki niso nadzorovani. Pomembno je, da stanje poznamo, aktivno iščemo, pravočasno prepoznamo in ustrezno ukrepamo (13).

2.3 Dejavniki tveganja za hujši potek bolezni

Najpomembnejši dejavnik tveganja je starost. Starejše osebe so bolj dovzetne za okužbo, poleg tega pa pri njih bolezen poteka v hujši obliki. V starosti nad 70 let, sploh pa v obdobju nad 80 let, je smrtnost največja. Glede na podatke italijanskega nacionalnega inštituta za javno zdravje je analiza prvih 2003 smrtnih primerov pokazala, da je bila poprečna starost umrlih 80,5 let (IQR 74,3 – 85,9). 'Samo' 17 (0,8 %) umrlih je bilo starih manj kot 49 let, 87,7% pa jih je bilo starejših od 70 let. Poleg starosti so kot dejavnik tveganja pomembne predvsem komorbidnosti, še posebej visok krvni tlak in sladkorna bolezen. Kot kažejo podatki iz ZDA je dejavnik tveganja tudi debelost, ki je povezana z večjo verjetnostjo za mehansko predihavanje. V Preglednici

2 so v deležih prikazani tovrstni rezultati do sedaj največje klinične raziskave, žal še brez natančnejše statistične analize (11).

Preglednica 2. Komorbidnosti kot dejavniki tveganja za hujši potek bolezni (11).

	Vse oblike bolezni	Kritična oblika bolezni	Blaga oblika bolezni
KOPB, %	1,1	3,5	0,6
Sladkorna bolezen, %	7,4	16,2	5,7
Povišan krvni tlak, %	15,0	23,7	13,4
Koronarna srčna bolezen, %	2,5	5,8	1,8
Cerebrovaskularna bolezen, %	1,4	2,3	1,2
Hepatitis B, %	2,1	0,6	2,4
Rakava bolezen, %	0,9	1,7	0,8
Kronična ledvična bolezen, %	0,7	1,7	0,5
Imunska pomanjkljivost, %	0,2	0	0,2

KOPB = kronična obstruktivna pljučna bolezen

2.4 Klinična klasifikacija

Do danes mednarodno sprejete klinične razvrstitve glede na stopnjo bolezni covid-19 še ni na voljo. V *Preglednici 3* je prikazana klasifikacija, prirejena po Wangu in sodelavcih (4).

Preglednica 3. Klinična klasifikacija covid-19, prirejena po Wangu in sodelavcih (14).

Klasifikacija	Klinična slika	Komentar
Brezsimptomna	Brez.	
Blaga	Blagisimptomi in znaki bolezni brez pljučnice.	Sprejem v bolnišnico ni potreben.
Zmerna	Covid pljučnica brez hipoksemije.	Lahko ambulantno ali bolnišnično (sprejem na navadni oddelek)
Huda	Covid pljučnica s hipoksemijo: saturacija $\leq 92\%$, plinska analiza: $pO_2 < 8$ kPa in/ali $pCO_2 > 6,7$ kPa	Sprejem na navadni oddelek. Potreben je poostren nadzor ev. poglobljanja hipoksemije (NEWS > 2)
Kritična	Eden od: Dihalna odpoved in potreba po umetnem predihavanju. Šok z več-organsko odpovedjo.	Sprejem v EIZ

NEWS = angl. National Early Warning Score; EIZ = enota intenzivnega zdravljenja

2.5 Brezsíptomna okužba

Glede na rezultate maloštevilnih raziskav zaenkrat ocenjujemo, da ima okrog od 20 do 40% oseb brezsimptomno okužbo (glej še v poglavju »Serološki testi«). Brezsíptomne okužene osebe lahko prenašajo novi koronavirus. (15).

2.6 Laboratorijski izvidi

Deleži laboratorijskih kazalcev pri pacientih s covidom-19 so prikazani v *Preglednici 1*. Navadno je prisoten zmerno povečan C-reaktivni protein (CRP), prokalcitonin (PCT) pa je v normalnem območju (po 10 dneh se lahko poveča tudi brez bakterijske superinfekcije), pogosto je prisotna limfopenija, nekoliko manj pogosto levkopenija in trombocitopenija, relativno pogosto sta povečana laktatna dehidrogeanza (LDH) in D-dimer, redkeje pa so povečane ravni aminotransferaz. Napovedni dejavniki hujšega poteka bolezni so visok CRP (> 100 mg/L), izrazita limfopenija ($< 800/\text{mm}^3$) ter visoke vrednosti: D-dimera (> 1000 $\mu\text{g/L}$; poveča se okrog desetega dne bolezni), LDH ($> 4,2$ $\mu\text{kat/L}$), kreatin fosfokinaze (dvakrat nad normalno vrednostjo) in feritina (> 500 $\mu\text{g/L}$) (11, 15).

2.7 Slikovne preiskave

Deleži prisotnosti nenormalnih sprememb na slikovnih preiskavah so prikazani v *Preglednici 1*. Pri bolnikih s covidom-19 so na rentgenskem posnetku pljuč prisotne spremembe, ki so značilne za atipično pljučnico. Posebnost pri covidu-19 je, da so infiltrati razporejeni sprva periferno, eno- ali obojestransko. Z napredovanjem bolezni postanejo infiltrati bolj centralno in difuzno razporejeni ter iz intersticijskega vzorca prehajajo v alveolarnega. Na CT pljuč so vidni značilni obojestranski infiltrati mlečnega stekla z ali brez konsolidacij, ki se večinoma pojavljajo bolj v bazalnih delih pljuč in bolj periferno ob plevri (16).

2.8 Potek bolezni pri otrocih

Otroci prav tako kot odrasli zbole vajo s covidom-19, vendar redkeje in v bolj blagi obliki. Podatki iz različnih držav kažejo, da je izmed vseh dokazanih okužb s SARS-CoV-2, med 1% do 5% otrok starih od 0 do 18 let. Prava incidenca okužb pri otrocih sicer ni znana, saj otroci pogosto niso testirani, ker prebolevajo okužbo v blažji obliki.

Glede na rezultate raziskav okužba pri 15% do 28% otrok poteka popolnoma brez simptomov, največkrat pri otrocih do starosti 5 let. Simptomatski otroci bolezen prebolevajo večinoma v blagi obliki. Največkrat imajo vročino (32-82%) in kašljajo (20-54%), lahko imajo bolečine v žrelu, prehladne znake, glavobol, bolečine v mišicah in trebuhu. Pogostejše kot odrasli imajo prebavne težave (6-13%). Nekaj odstotkov otrok ima hudo in kritično sliko bolezni, vendar zaradi različno zasnovanih raziskav, podatka o pravi incidenci nimamo. Zaradi majhnega števila bolnikov med otroki s kroničnimi boleznimi in hudo bolnih otrok s covidom-19, dejavniki tveganja za hujši potek bolezni še niso dobro poznani. Otroci z osnovnimi kroničnimi boleznimi, kot so kronične pljučne bolezni, kronična vnetna črevesna bolezen, rakave bolezni in imunsko oslabljeni otroci, so večinoma prebolevali blago do zmerno obliko bolezni. Vendar pa so zdravljenje v intenzivni enoti največkrat potrebovali otroci s

pridruženimi boleznimi in novorojenčki. Pri otrocih so opisani le posamezni primeri smrti zaradi covida-19 (17-19).

2.9 Diagnostika

V klinični praksi je predvsem pomembna hitra diagnostika, ki temelji na klinični sliki, laboratorijskih izvidih, slikovnih preiskavah in mikrobioloških izvidih. Mikrobiološka diagnostika temelji na molekularnih metodah, serologiji in kultivaciji virusa. Zlati standard za diagnozo je dokaz virusne nukleinske kisline (RNA) na sluznicah dihalnih poti z metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času (RT PCR). Najpogosteje odvzamemo bris nosno-žrelnega prostora. Kužnine iz spodnjih dihal imajo večjo občutljivost. Najbolj priporočamo krtačaste (*angl. flocked swab*) brise, ki jih v laboratorij dostavimo v transportnem gojišču.

Serološki testi (dokazovanje protivirusnih protiteles) zaradi zakasnjene nastanka protiteles po okužbi niso uporabni za dokazovanje okužbe, zelo uporabni pa so lahko za epidemiološko obvladovanje covida-19. Za virusno kulturo je potrebno več časa in zahteven laboratorijski pogon, zato je metoda predvsem pomembna za raziskovalno testiranje infektivnosti, imunosti ter oceno učinkovitosti zdravil in cepiv (7, 20).

Od prvič objavljene informacije o sestavi virusnega genoma so bili izdelani številni testi PCR, ki temeljijo na dokazovanju različnih delov virusnega genoma. Zelo kakovosten in v EU najbolj uporabljen test PCR so razvili v univerzitetni bolnišnici Charité v Berlinu; test detektira gen E, značilen za vse beta-koronaviruse, in gen RdRp, specifičen za SARS-CoV-2. Test je prevzela tudi SZO.

2.10 Covid-19 in negativen izvid prvega brisa nosno-žrelnega prostora

Količina virusa v sluzi nosno-žrelnega prostora je največja na začetku kliničnih simptomov in znakov, nato ves čas pada in od desetega dneva je virus praviloma še mogoče dokazati (nukleinsko kislino), ni pa z brisom več mogoče okužiti celične kulture (izguba infektivnosti). Nato sčasoma, do 14 dni po začetku bolezni, izgine tudi zaznavna RNA – test PCR postane negativen. Pri nekaterih preboleznikih je izvid PCR pozitiven še dlje časa, ker zaznava ostanke nukleinske kisline v sluznicah dihal, vendar ti ljudje praviloma niso več kužni.

Izvid brisa nosno-žrelnega prostora je včasih pri pacientu s covidom-19 lahko tudi negativen. To ni pogosto, zgodi pa se predvsem takrat, ko pride pacient v bolnišnico relativno pozno v poteku bolezni, običajno z napredovalo okužbo spodnjih dihal (covid-19 pljučnica). Vzrok je lahko nepravilno odvzet bris ali pa premajhna količina virusa v kužnini, saj se v kasnejšem obdobju bolezni, zlasti po pojavu protiteles, količina virusa v nosno-žrelni sluznici naglo manjša, pač pa se začne količina virusa v primeru napredovanja bolezni močno povečevati v pljučnem tkivu, kar je tudi neposreden vzrok težkim pljučnim in sistemskim zapletom covida-19 (21). Pri tovrstnih pacientih, še posebno pri jasnem epidemiološkem podatku, sumljivi klinični sliki, slikovnih preiskavah in laboratorijskih izvidih (glej še *Preglednico 1*), je treba ponoviti oz. včasih tudi ponavljati bris nosno-žrelnega prostora. »Sumljivi« laboratorijski izvidi so: normalen PCT, povečan CRP (od 50 do 300 mg/L) in

limfopenija (najpogostejši odkloni od normalnih izvidov), lahko pa je prisotna tudi trombocitopenija, povečan LDH, D-dimer, feritin itd. (22). Če bolnik produktivno kašlja, pošljemo na molekularni test izmeček, lahko pa tudi, ob ustrezni zaščiti, aspirat sapnice.

2.11 Hitri testi

Hitri testi so kvalitativni ali semikvantitativni testi, namenjeni dokazovanju virusnih antigenov ali protiteles. Izvajajo se posamično ali v majhnih serijah, izvedeni so v 10 do 30 minutah. Hitri testi v državah EU še niso validirani do mere, da bi jih bilo mogoče vključiti v strategije za kontrolo epidemije covid-19 – na primer za redno kontrolo zdravstvenih delavcev ali ogroženih skupin (hitri antigenski testi) ali za epidemiološke namene (hitri protitelesni testi). Med hitrimi testi za dokazovanje nukleinskih kislin že vrsta testov PCR omogoča dokaz v manj kot 1 uri. Veliko pozornosti je bil deležen Abbottov test ID NOW, ki ga je odobrila FDA in uporablja postopek izotermičnega pomnoževanja nukleinskih kislin. Ker test ne potrebuje temperaturnih ciklov, je postopek končan v manj kot 15 minutah (21).

2.12 Serološki testi

Komercialnih testov še ni na voljo, vendar jih kmalu pričakujemo. Zelo pomembni bodo za obvladovanje epidemije. Z njimi bomo lahko:

- opredelili seroprevalenco,
- ugotovili kolikšen delež prebivalstva je bil izpostavljen virusu brezsimptomno oz. z neobičajno klinično sliko,
- opredelili osebe z veliko koncentracijo protiteles, ki bodo potencialni darovalci rekonvalescentnega seruma za zdravljenje,
- ugotovili, kakšna je resnična smrtnost v določeni definirani populaciji.

Eden od problemov seroloških testov je križna reaktivnost z drugimi koronavirusi. V epidemioloških razmerah nizke prekuženosti mora imeti serološki test izjemno veliko občutljivost in specifičnost (oboje blizu 100%), sicer njegova uporaba ni smiselna. Že majhno odstopanje specifičnosti pri nizki prekuženosti pomeni, da je večina izmerjenih pozitivnih rezultatov v resnici lažno pozitivnih – s tem je ocena prevalence izrazito lažno povečana (7, 21).

3 REAKTIVACIJA, REINFEKCIJA

Obstaja več poročil o pacientih, ki so imeli ponovno pozitiven bris nosno-žrelnega prostora, ko je bil že enkrat ali dvakrat negativen. Take izkušnje imamo tudi pri nas. Ta poročila so vzbudila veliko pozornosti, ker bi to lahko pomenilo reaktivacijo ali reinfekcijo (22, 23). Po natančnejšem pregledu teh objav za sedaj ni tovrstnih dokazov. Drugi vzroki so bolj verjetni. Vedno je potrebno upoštevati metodološke probleme samega PCR, možna je nezadostna količina zbrane kužnine oz. premajhna količina virusa v kužnini, problemi shranjevanja materiala itd. (24). Tudi, če je vse narejeno pravilno, lahko pričakujemo, da bo PCR nihaj med pozitivnimi in negativnimi vrednostmi, ko je virusno breme majhno. Rezultati so odvisni tudi od uporabljenega testa PCR, ker je meja zaznavanja med nekaj sto do nekaj tisoč kopij virusa/mililiter kužnine (25, 26).

4 ČESA NE SMEMO SPREGLEDATI?

Medicina je postala na videz enostavna. Zanima nas samo še koronavirus, kar je zelo nevarno. Ne smemo pozabiti tudi na druge infekcijske in ostale bolezni, ki se jih v obdobju covid-19 epidemije lahko zgreši (pljučna embolija, sepsa, apendicitis, miokardni infarkt, atipične pljučnice, kot je npr. Legionarska bolezen, revmatske bolezni s prizadetostjo pljučnega intersticija itd.). Če je test na novi koronavirus negativen, je treba razmišljati o drugih vzrokih bolnikovih težav, včasih pa gre tudi lahko za kombinacijo covid-19 in dodatne bolezni, še posebno pri starejših osebah. Vrniti se moramo k temeljnemu poslanstvu našega poklica: z bolnikom se je treba natančno pogovoriti, ga pregledati – bolje bomo to naredili, manj problemov bo s koronavirusom in tudi z drugimi boleznimi. Kot vemo vsi, je »zdravljenje po telefonu« lahko zelo nevarno!

5 VAROVANJE PACIENTOVIH OSEBNIH PODATKOV

Nalezljive bolezni, ki »udarijo« tako, kot je covid-19, vzbudijo izjemno pozornost javnosti, vključno z njeno temno platjo – odtekanjem informacij o bolnikih. Informacijska neodgovornost je pojav, ki mu v našem okolju ne moremo stopiti na prste in se zelo žalostno pokaže zlasti tedaj, ko gre za »razvpite« bolezni, kot je zdaj covid-19. Žal tudi sedaj opažamo, da je težko obvladati (ne)kulturo govoric, ki zlasti v primeru bolnih kolegic in kolegov iz zdravstvenih vrst završijo po bolnišnicah in tudi zunaj njih. Za vse podatke, ki jih zdravstveni delavci in drugi sodelavci pridobimo ali izvemo pri obravnavi naših pacientov, smo zavezani k poklicni molčečnosti! Temu sledi tudi »Etični kodeks«, h kateremu smo vsi zavezani.

6 SKLEP

Svetovne zdravstvene in ekonomske posledice pandemije SARS-CoV-2 so hude. V naslednjih mesecih bomo imeli s pomočjo seroloških testov bolj jasno sliko glede resničnega števila brezsimptomnih oseb in tistih z neobičajnimi kliničnimi manifestacijami. Vse več vemo o dejavnikih tveganja za hujši potek bolezni, kar nam omogoča prilagoditev preventivnih strategij. Do danes še ne vemo natančno, katere osebe so resnično ogrožene in katere ne.

7 LITERATURA

1. European Center for Disease Control. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) in the EU/EEA and the UK. Stockholm: ECDC; 2020. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/covid-19-rapid-risk-assessment-coronavirus-disease-2019.pdf>.
2. Riccardo F, Ajelli M, Andrianou X, Bella A, Del Manso M, Fabiani M, et al. Epidemiological characteristics of COVID-19 cases in Italy and estimates of the reproductive numbers one month into the epidemic. medRxiv. [cited 2020 May 18]. Available from: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.04.08.20056861v1.full.pdf>.
3. Zou L, Ruan F, Huang M, Liang L, Huang H, Hong Z, et al. SARS-CoV-2 viral load in upper respiratory specimens of infected patients. N Engl J Med. 2020; 382(12): 1177–9.
4. Cheng H, Jian SW, Liu DP, Ng T, Huang WT, Lin HH. Contact tracing assessment of COVID-19 transmission dynamics in Taiwan and risk at different exposure periods before and after symptom onset. JAMA Intern Med 2020; doi:10.1001/jamainternmed.2020.2020.
5. Prather KA, Wang CC, Schooley RT. Reducing transmission of SARS-CoV-2. Science 2020; 368; 1422–4.

6. Anderson EL, Turnham P, Griffin JR, Clarke CC. Consideration of aerosol transmission for COVID-19 and Public Health. *Risk Anal* 2020; 40(5): 902–7.
7. Rodriguez-Morales AJ, Cardona-Ospina JA, Gutierrez-Ocampo E, Villamizar-Peña R, Holguin-Rivera Y, Escalera-Antezana JP, et al. Clinical, laboratory and imaging features of COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Travel Med Infect Dis*. 2020;13:101623.
8. Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, Liang WH, Ou CQ, He JX et, al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N Engl J Med*. 2020;382(18):1708–20.
9. Metlay JP, Waterer GW, Long AC, Anzueto A, Brozek J, Crothers K, et al. Diagnosis and treatment of adults with community-acquired pneumonia. An official practice guideline of the American Thoracic Society and Infectious Diseases Society of America. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019;200:e45–e67.
10. Lechien JR, Chiesa-Estomba CM, De Siati DR, Horoi M, Le Bon SD, Rodriguez A, et al. Olfactory and gustatory dysfunctions as a clinical presentation of mild-to-moderate forms of the coronavirus disease (COVID-19): a multicenter European study. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. In press 2020. [cited 2020 May 18]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7134551/pdf/405_2020_Article_5965.pdf.
11. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2020;395(10229):1054–62.
12. Niforatos JD, Melnick ER, Faust JS. COVID-19 fatality is likely overestimated. *BMJ* 2020; 368; <https://doi.org/10.1136/bmj.m1113>.
13. Gattinoni L, Coppola S, Cressoni M, Busana M, Chiumello D. Covid-19 Does Not Lead to a “Typical” Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020 Mar 30;doi:10.1164/rccm.202003-0817LE.
14. Wang Y, Lui Y, Liu L, Wang X, Luo N, Li L. Clinical outcome of 55 asymptomatic cases at the time of hospital admission infected with SARS-Coronavirus-2 in Shenzhen, China. *J Infect Dis*. 2020;221(11):1770–4.
15. Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72314 cases from the Chinese center for disease control and prevention. *JAMA*. 2020;323(13):1239–42.
16. Revel MP, Parkar AP, Prosch H, Silva M, Sverzellati N, Gleeson F, et al. COVID-19 patients and the radiology department-advice from the European Society of Radiology (ESR) and the European Society of Thoracic Imaging (ESTI). *Eur Radiol*. In press 2020. [cited 2020 May 18]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7170031/pdf/330_2020_Article_6865.pdf
17. Ludvigsson JF. Systematic review of COVID-19 in children show milder cases and a better prognosis than adults. *Acta Paediatr*. 2020;10(6):1088–95.
18. ECDC. Paediatric inflammatory multisystem syndrome and SARS-CoV-2 infection in children. [cited 2020 May 21]. Available from: https://destination.kclj.si/roundcube/?_task=mail&_action=get&_mbox=covid-19.PMIS&_uid=4&_part=8&_frame=1&_extwin=1
19. Bialek S, Gierke R, Hughes M, McNamara LA, Pilishvili T, Skoff T. Coronavirus Disease 2019 in Children – United States, February 12 – April 2, 2020. *MMRW Morb Mortal Wkly Rep*. 2020;69(14):422–6.
20. Patel R, Babady E, Theel ES, Storch GA, Pinsky BA, St. George K, et al. Report from the American Society for Microbiology COVID-19 International Summit 2020: Value of diagnostic testing for SARS-CoV-2/COVID-19. *mBio*. 2020;11(2):pii: e00722–20.
21. Hao W, Li M. Clinical features of atypical 2019 novel coronavirus pneumonia with and initially negative RT-PCR assay. *J Infect*. 2020;80(6):671–93.
22. Lan L, Xu D, Ye G, Xia C, Wang S, Li Y, et al. Positive RT-PCR test results in patients recovered from COVID-19. *JAMA*. 2020;323(15):1502–3.
23. Yuan J, Kou S, Liang Y, Zeng J, Pan Y, Liu L, et al. PCR assays turned positive in 25 discharged COVID-19 patients. *Clin Infect Dis*. 2020;pii:ciaa398.
24. Li Y, Yao L, Li J, Chen L, Song Y, Cai Z, et al. Stability issues of RT-PCR testing of SARS-CoV-2 for hospitalized patients clinically diagnosed with COVID-19. *J Med Virol*. 2020;1–6. [cited 2020 May 18]. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/jmv.25786>.
25. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Müller MA, et al. Virological assessment

- of hospitalized patients with COVID-19. Nature. In press 2020. [cited 2020 May 18]. Available from: https://www.nature.com/articles/s41586-020-2196-x_reference.pdf.
26. Kamps BS, Hoffmann C. COVID Reference. www.CovidReference.com, Steinhauser Verlag, Fourth Edition; 13 July 2020.

NOVOSTI NA PODROČJU RAZVOJA CEPIV PROTI SARS-CoV-2

Prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.

*Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana;
borut.strukelj@ffa.uni-lj.si*

POVZETEK

Pandemija novega koronavirusa SARS-CoV-2 predstavlja nov izziv za raziskovalne oddelke farmacevtskih, biotehnoloških družb, institutov in univerz po celem svetu v borbi za razvoj novih učinkovitih in varnih cepiv. Resnost pandemije, etična in socialna segregacija in gospodarska škoda je prisilila države, sklade in združenja, da smo povezali znanost, izkušnje in ekonomsko osnovo, zato smo priča izjemno hitremu razvoju cepiv proti okužbi z novim koronavirusom, predvsem na osnovi vnosa DNA ali RNA, ki po izražanju v človeških celicah in prenosu virusnega antigena izven celice izzove nastanek specifičnih protiteles in aktivacijo celičnega T-limfocitnega imunskega odziva. Trenutno je v kliničnih fazah razvoja- 47 preskušanj, od tega 9 v zadnji, tretji fazi razvoja, tri cepiva pa so na lokalnem nivoju pridobila predhodno dovoljenje za zelo omejeno uporabo. Cepiva proti SARS-CoV-2, pridobljena z inovativnimi tehnologijami, predstavljajo veliko prednosti in velik potencial za bodoči razvoj cepiv, a izkazovati morajo visoko stopnjo učinkovitosti in varnosti, preden bo omogočena njihova široka uporaba.

VSEBINA

1 UVOD

2 RAZVOJNA POT CEPIV

2.1 Vrste cepiv

3 NOVE TEHNOLOGIJE RAZVOJA CEPIV PROTI SARS-CoV-2

3.1 Virusna cepiva DNA

3.2. Cepiva na osnovi RNA z nanodelci

4 SKLEP

5 LITERATURA

1 UVOD

Dokaz, da vnos antigena, ki je strukturno največkrat površinski protein, glikoprotein ali lipopolisaharid, sproži nastanek specifičnih nevtralizacijskih protiteles, je leta 1796 prvi potrdil Edward Jenner, ko je vzel gnojni eksudat iz pustul (kožnih mehurčkov) delavcev z mlečnih farm, ki so bili pogosto v stiku z virusom govejih koz ter vnetno tekočino vbrizgal pod kožo osemletnega dečka. Ta je sicer zbolel, a je bil potek bolezni blag. Ko je eksperiment ponovil z vnetno tekočino iz pustule človeških črnih koz na drugih prostovoljcih, se je izkazalo, da so zaščiteni pred virusno boleznijo črnih koz. To so bili sicer elementarni začetki uporabe cepiv, ki pa so predvsem v dvajsetem in enaindvajsetem stoletju pripomogli k zaščiti svetovnega prebivalstva (1).

Celotna znanstvena javnost, vključno s farmacevtskimi in biotehološkimi naprednimi družbami, je enotna v prizadevanjih za napredek pri razvoju novih cepiv ali zdravil proti okužbi z novim koronavirusom. Ker je pandemija močno prizadela zdravstvo, socialne stike, gospodarstvo in splošni razvoj na svetovnem nivoju, si raziskovalci prizadevajo za pospešen razvoj cepiv, ki bi lahko predstavljala prvo obrambno vrsto proti širjenju virusa, obenem pa omogočila zaščito vseh starostnih, ranljivih in izpostavljenih skupin prebivalstva. Virus, ki so ga poimenovali virus hudega akutnega respiratornega sindroma 2 (SARS-CoV-2), ima kot ostali koronavirusi genetski material v obliki enovijačne kodirajoče verige RNA, ki jo ovija fosfolipidna ovojnica. Genom nosi zapis za strukturne in nestrukturne proteine, ki omogočajo virusu pripetje na prijemališče človeške celice (ACE2), okužbo, razmnoževanje in širjenje virusa na ostale neokužene celice (2). Najpomembnejši strukturni protein ovojnice, ki se razprostira v mikrookolje virusa, je protein S (*angl. spike protein*), ki predstavlja tudi pglavitni antigen za razvoj novih cepiv proti koronavirusu, zato je prav protein S oziroma genski zapis, ki kodira za ta površinski virusni antigen, največkrat uporabljen v prizadevanjih za razvoj novega cepiva proti bolezni covid-19. Kljub temu, da so se tehnologije razvoja cepiv z napredovanjem molekulskega kloniranja in uporabe metod rekombinantne DNA uveljavile že pri nekaterih cepivih v zadnjih desetih letih, kjer je osnovni antigen za nastanek protiteles v organizmu rekombinantni protein, pa smo pri razvoju anti covid-19 cepiv prvič priča poskusu uporabe cepiv na osnovi DNA ali RNA (3).

2 RAZVOJNA POT CEPIV

Ne glede na vrsto cepiva, je postopek razvoja natančno reguliran s smernicami Svetovne zdravstvene organizacije (WHO) in ostalih regulatornih organizacij, kot je Mednarodni koncil za harmonizacijo (ICH), Ameriška agencija za hrano in zdravila (FDA) in Evropska agencija za zdravila (EMA), poleg tega pa razvoj budno spremljajo tudi nacionalne agencije za zdravila po vsem svetu (4). Razvoj cepiv sestavljajo naslednje faze:

- izbira vrste cepiva in optimizacija laboratorijske faze,
- predklinična testiranja, ki zajemajo določanje imunogenosti in toksičnosti,
- klinična testiranja varnosti in učinkovitosti (faze I-III),
- registracijski postopek,

- izdelava, kontrola kakovosti in spremljanje vseh učinkov skozi daljše obdobje.

Prav pri razvoju novih cepiv proti virusu SARS-CoV-2 pa so WHO, EMA in FDA z namenom pospešiti razvoj, pripravile posodobljene smernice (5), ki dovoljujejo skrajšano fazo predkliničnih raziskav, a še vedno z vključitvijo vsaj dveh vrst preskusnih živali (miši, podgane, hrčki) in po možnosti tudi primati (opice Rhesus). Problem testiranja na poskusnih živalskih modelih je namreč v tem, da miši ne izražajo transmembranskega receptorja ACE2, zato so za predklinična testiranja primerne transgene miši z vstavljenim genom za ACE2, hrčki pa sicer izpolnjujejo to osnovno zahtevo, saj imajo izražen receptor-prijemališče, na katerega se pripne novi koronavirus, a naj bi po splošno veljavnihih pravilih v predkliničnih testiranjih vključili vsaj dve vrsti živalskih modelov, od katerih naj bi bili za nove tehnologije vključeni primati. Iz tehničnega in stroškovnega vidika je to seveda zahtevnejše, a predstavlja dodatni varnostni pogoj. Prav zaradi izjemne hitrosti razvoja novih cepiv proti bolezni covid-19, regulatorne organizacije dovoljujejo združevanje kliničnih faz (I/II, II/III), a ne na račun varnosti. Običajna pot razvoja novega cepiva traja nekaj let, v sedanjem primeru razvoja cepiva proti SARS-CoV-2 pa smo priča izjemno hitremu in množičnemu pristopu, saj je v prvi fazi kliničnega testiranja (na dan 02.09.2020) prijavljenih na spletni strani ClinicalTrials.gov 231 raziskovalnih enot, ki raziskujejo cepiva v predklinični fazi, 24 jih je v prvi fazi razvoja, 14 v drugi fazi in 9 v tretji fazi razvoja. Zelo omejeno predhodno uporabo pa so pridobila tri cepiva: cepivo družbe CanSino Biologics (dovoljenje izdano s strani Kitajske agencije za zdravila in cepiva), cepivo Sputnik V instituta Gamaleya (dovoljenje izdano s strani Ruske agencije za zdravila) in cepivo družbe Sinovac Biotech (dovoljenje izdano s strani Kitajske agencije za zdravila in cepiva). Trenutno pa ne EMA, prav tako niti FDA in posledično WHO niso odobrile še nobenega cepiva proti virusu SARS-CoV-2 (6, 7).

2.1 Vrste cepiv

Glede na izvor antigena in način izdelave, ločimo pet osnovnih vrst virusnih cepiv (8):

- atenuirana živa virusna cepiva,
- inaktivirana virusna cepiva,
- rekombinantna virusna proteinska cepiva,
- virusna cepiva na osnovi DNA,
- virusna cepiva na osnovi RNA.

Veliko standardnih cepiv, kot so cepiva proti rdečkam, ošpicam ali mumpsu, vsebujejo oslavljen (atenuiran) živ virus, ki ga s toplotnimi ali pasajznimi postopki tako oslabijo, da vnesen v človeško telo sicer izzove nastanek protiteles, ne povzroči pa razširitve bolezenskih znakov. Običajno izzove zelo močan in dolgotrajen imunski odziv organizma. Tudi proti virusu SARS-CoV-2 razvijajo cepiva na ta preizkušen način, a sta razvoj in proizvodnja v tem primeru dolgotrajna, saj je potrebno za doseg dovolj velikega števila odmerkov virus gojiti v primernih celičnih gostiteljih, ga izolirati in oslabiti. Prav tako se izkazujejo lahko neželeni stranski učinki v obliki lokalnih ali sistemskih alergijskih reakcij na prisotnost živega virusa.

Virusna cepiva z inaktiviranim mrtvim virusom so običajno pripravljena s kemijskim ali toplotnim postopkom denaturacije virusnih vitalnih sistemov, kar lahko nekoliko zmanjša imunogenost viriona (celotnega virusnega delca). Tehnologija je standardizirana in relativno varna. Tudi proti virusu SARS-CoV-2 razvijajo testna inaktivirana virusna cepiva (*Preglednica 1, Slika 1*), ki izkazujejo dobro imunogenost, a je število odmerkov še vedno zelo majhno, saj je za proizvodnjo potrebno pripraviti ogromno količino osnovnega živega virusnega materiala. Testi, ki so prešli v klinične faze, se izvajajo predvsem na Kitajskem, pred mesecem dni pa so vključili v fazo II tudi 230 prostovoljcev v Indiji.

Rekombinantna virusna proteinska cepiva predstavljajo napreden sistem priprave proteinskih antigenov. Genski zapis, ki kodira za površinski virusni proteinski antigen, vnesemo v gostiteljsko celico. Največkrat v ta namen uporabimo kvasne ali sesalske celice, manj pogosto pa bakulovirusne ekspresijske sisteme. Velika prednost takega načina izražanja antigena je v tem, da lahko pridobimo gensko informacijo iz genskih bank podatkov, naredimo optimalni genski kod in po izražanju lahko zelo dobro očistimo proteinski antigen. Slabost pa je draga proizvodnja in nekoliko slabša imunogenost, zato farmacevtske družbe razvijajo nove adjuvanse, ki ojačajo imunogenost virusnega cepiva. Večina novih rekombinantnih cepiv proti covidu-19 temelji na pripravi antigena proteina S, ki je potencialno najprimernejši virusni strukturni protein za aktivacijo človeškega imunskega sistema. Rekombinantna cepiva proti covidu-19 razvijajo podjetja Clover Biopharmaceuticals, pa tudi podjetje Novavax, kjer rekombinantni protein S vežejo na nanodelce (9) (*Preglednica 1*).

Preglednica 1: Nekatera najperspektivnejša cepiva proti SARS-CoV-2 v kliničnih preskušanjih (na dan 28.07.2020).

Vrsta cepiva	Razvojna osnova	Tarčni antigen	Proizvajalec	Klinična faza
Gen za virusni protein S v APS	Gensko spremenjene APS z lentivirusnim vektorjem	protein S, virusne proteaze	Shenzhen Geno-Immune Institute, Kitajska	Faza I/II
Gen za virusni protein S v APS in citotoksični limfociti T	Gensko spremenjene APS z lentivirusnim vektorjem, i.v. infuzija limfocitov T	protein S, poliproteinska proteaza	Shenzhen Geno-Immune Institute, Kitajska	Faza I/II
Rekombinantni adenovirus Ad5-nCov z genom za protein S	Adenovirusni Ad5 vektor, i.m.	protein S	CanSino Biologics, Kitajska	Faza II/III
Rekombinantni adenovirus AZD1222	(z delecijo za podvojevanje) hA-dOx1	protein S	Univerza Oxford / AstraZeneca	Faza III
Rekombinantni adenovirus Gam-COVID-Vac	Adenovirusni rekombinantni vektor 5 in 26, i.m.	protein S	Gamaleya Institute, Rusija	Faza I/II

Plazmid INO-4800	Gen za protein S, vnos z elektroporacijo	protein S	INOVIO Pharmaceuticals	Faza I
Plazmid in adjuvans AG0301	Gen za S-protein, i.m.	protein S	AnGes/Univerza Osaka	Faza I/II
Plazmid GX-19	DNA, i.m.	protein S	Genexin Inc, Južna Koreja	Faza I/II
Lipidni nanodelec z mRNA 1273	mRNA, i.m.	protein S	Moderna Therapeutics, ZDA	Faza III
Lipidni nanodelec z mRNA BNT162	mRNA, i.m.	4 virusni antigeni	BioNTech, Nemčija / Pfizer, ZDa	Faza II
Lipidni nanodelec z mRNA CVnCoV	mRNA, i.m.	protein S	CureVac, Nemčija	Faza II
Lipidni nanodelec z mRNA COVAC1	mRNA, i.m.	protein S	Imperial College London, Anglija	Faza I/II
Protein + adjuvans NVX-CoV 2372	Proteinsko cepivo, i.m.	protein S + matrix adjuvans	Novavax, ZDA	Faza II
Protein + adjuvans SCB-2019	Proteinsko trimerno cepivo	protein S, AS03, CpG, + Al adjuvans	Clover Biopharma/GSK, Avstralija	Faza I/II
SARS-CoV-2 virus PiCoVacc	Inaktiviran virus	Celoten virus + Al adjuvans	SinoVac, Kitajska	Faza II
SARS-CoV-2 virus	Inaktiviran virus	Celoten virus	Kitajska akademija medicinskih znanosti	Faza I/II
SARS-CoV-2 virus	Inaktiviran virus	Celoten virus	Sinopharm, Kitajska	Faza II

protein S: površinski aktivacijski protein SARS-CoV-2 (*angl. spike protein*); APS: antigen predstavitvene celice (9)

3 NOVE TEHNOLOGIJE RAZVOJA CEPIV PROTI SARS-CoV-2

Tehnologija rekombinantne DNA se je od začetkov leta 1980 do sedaj razvila v izjemno raznoliko vejo, ki izkazuje že mnoge rezultate, potencialno pa pomeni revolucijske premike na področju farmacije, medicine, biotehnologije in ostalih sorodnih ved. Prav izziv, ki ga predstavlja razvoj novega cepiva proti okužbi z virusom SARS-CoV-2, je povezal različne metode in tehnike, ki omogočajo uporabo genskega materiala v obliki DNA ali RNA za doseg aktivacije imunskega sistema. Bazični princip temelji na vnosu genskega konstrukta, ki največkrat kodira za virusni protein S ali vsaj najbolj izpostavljen del tega proteina v človeške celice (največkrat miocite), ki nato v kombinaciji z regulatornim in strukturnim delom gena proizvedejo virusni protein S, ga izločijo iz celice, kjer ga nato antigen predstavitvene celice (dendritične celice, makrofagi, tudi limfociti B) spoznajo kot tuj protein, predstavijo limfocitom B in T, nakar se začne proces aktivacije humoralnega in celičnega

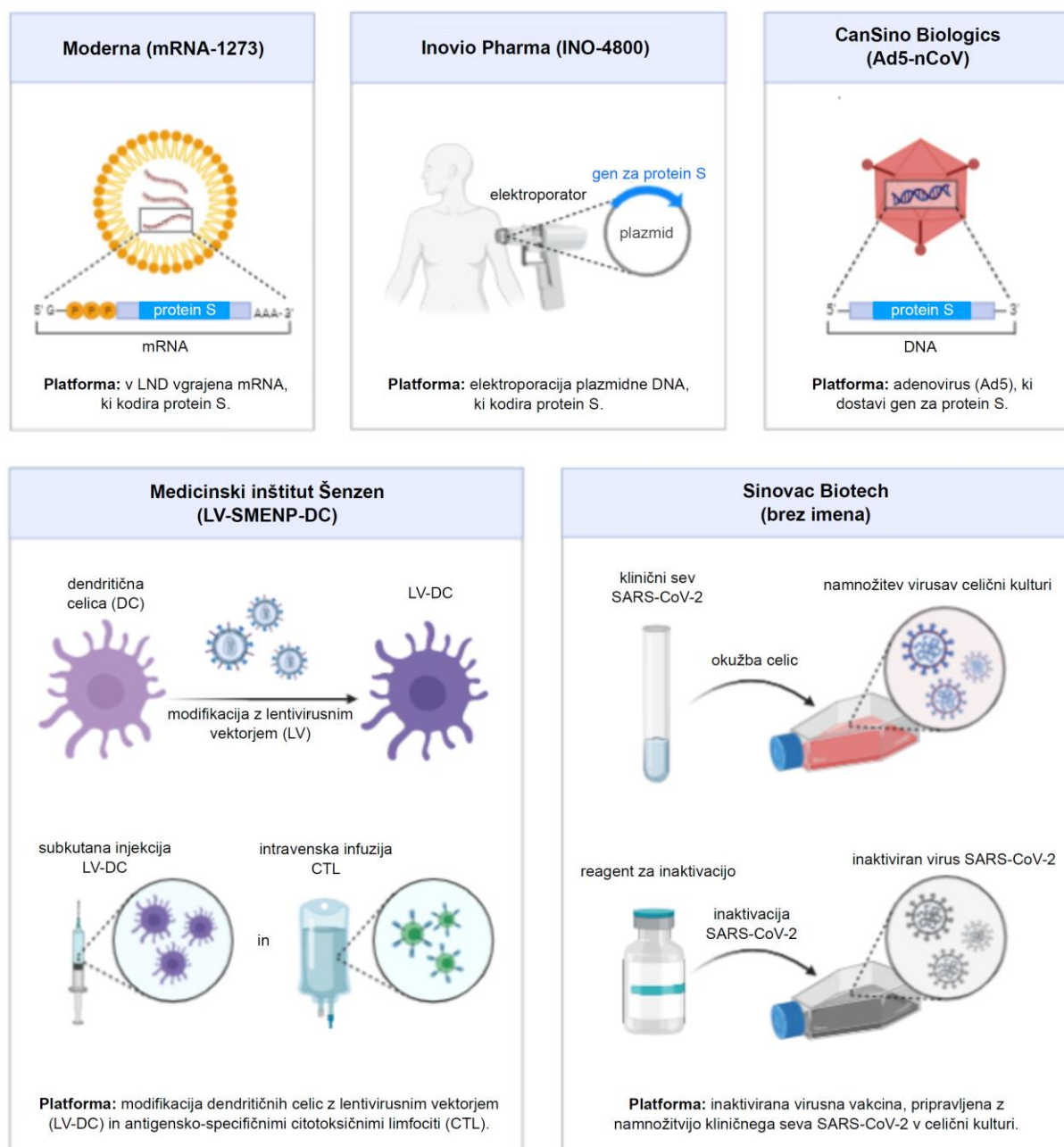
imunskega sistema. Vnos genskega materiala v celice je največkrat omogočen s pomočjo nanodelcev, z adenovirusnim ali lentivirusnim nosilcem ali s pomočjo elektroporacije (10).

3.1 Virusna cepiva DNA

Cepiva na osnovi DNA se vnašajo v celico s pomočjo plazmida z genskim konstruktom, ki kodira za antigen, največkrat s pomočjo elektroporacije (*Slika 1*), lahko pa pride tudi do prehoda plazmida v celico s pinocitozo, ki pa je manj učinkovita. Velika prednost vnosa cepiv na osnovi DNA je enostavnost in ekonomičnost proizvodnje, saj lahko v zelo kratkem času pripravimo veliko količino plazmidnega cepilnega materiala, prav tako sam plazmid s svojimi nemetiliranimi zaporedji aktivira imunski sistem, zato cepivom ni potrebno dodajati nikakršnih adjuvantov, slabost pa je, da je imunski odziv relativno šibek in je potrebno injicirati vsaj dva odmerka, prav tako pa še ne vemo, kako dolgo je zaščita z nevtralizacijskimi protitelesi, ki nastanejo, dovolj učinkovita. Cepivo na osnovi plazmidne DNA razvija podjetje Inovio Pharmaceuticals in GeneXin Inc. iz Južne Koreje, japonska družba AnGes, skupaj z univerzo Osaka pa plazmidu dodaja nespecifičen adjuvans, zopet na osnovi DNA (*Preglednica 1*). Veliko raziskovalnih oddelkov pa razvija cepivo DNA, ki ga v celico vnesejo s pomočjo adenovirusnih ali lentivirusnih vektorjev. Prednost takega vnosa je večja učinkovitost, hitro prehajanje cepiva v celice in močan odziv nastanka protiteles po izražanju in ekstracelularnemu antigenskem odzivu. Prvi zametki adenovirusnih vektorjev so nastali za vnos raznih tarčnih genov v sklopu genskega zdravljenja, kot cepivo pa so razvijali cepivo s pomočjo oslabiljenega virusnega nosilca proti okužbi z virusom ebola. Dolgoročnih izkušenj in potencialnih neželenih učinkov s tako pripravljenimi vektorskimi cepivi še nimamo, obstaja pa potencialna zmanjšana učinkovitost po večkratni aplikaciji istega sistema, in sicer zaradi imunogenosti samega vektorskega nosilca. Sicer pa je prav razvoj virusnega vektorskega DNA cepiva v primeru bolezni covid-19 dosegel najhitrejši razvoj in je kar 5 kandidatnih cepiv v kliničnih preskušanjih (AstraZeneca/Oxford, Gamaleya Institute, CanSino Biologicals, Johnson&Johnson in Shenzen GenoImmune, *Preglednica 1*) (11, 12).

3.2. Cepiva na osnovi RNA z nanodelci

Informacijska RNA (*angl. mRNA*) nosi zapis za izdelavo proteina (antigena) na ribosomu v citoplazmi celice, ki se po translaciji izloči iz celice v medcelični prostor, kjer ga imunski sistem prepozna kot tujega in aktivira nastanek nevtralizirajočih protiteles. Cepiva na osnovi mRNA vsebujejo običajno poleg genske informacije tudi fosfolipidno ovojnico ali lipidne nanodelce za lažje vstopanje v celico. Prednost cepiv na osnovi RNA je, da ni nikakršnega stika z genomom človeške celice in izdelava velike količine mRNA. Na osnovi rezultatov kliničnih faz cepiva družb CureVac in Moderna Therapeutics prav tako kaže, da pride do močne antigenske aktivacije in nastanka protiteles. Slabost cepiv na osnovi mRNA pa je velika občutljivost RNA, zato so potrebne strukturne modifikacije z namenom povečanja stabilnosti in roka trajanja cepiva (13, 14).



Slika 1: Shematski prikaz razvoja različnih tehnologij sodobnih cepiv proti SARS-CoV-2 (narejeno s programom BioRender).

4 SKLEP

Za vsako učinkovito in varno cepivo je potrebno strogo načrtovati, izvesti in upoštevati vse smernice in navodila regulatornih organizacij in strokovnih združenj, saj le tako lahko omogočimo, da bodo vsi, ki želijo prejeti cepivo, uspešno zaščiteni, ob tem pa cepivo ne bo izzvalo resnih neželenih učinkov. Seveda se raziskovalci zavedamo, da lahko na nekaj stotisoč cepljenj pride pri posamezniku do resnega neželenega učinka, a to velja za vsa zdravila in cepiva. Ker smo priče izjemno hitremu razvoju cepiv proti virusu SARS-CoV-2 s popolnoma novimi, inovativnimi tehnologijami, ki vključujejo vnos genskih konstruktov na osnovi RNA ali DNA, je poleg učinkovitosti zelo pomemben dejavnik varnost, ki jo mora potrditi za Evropsko

unijo, in s tem tudi za Slovenijo, Evropska agencija za zdravila (EMA). Verjamemo v prednosti novih tehnologij pri razvoju cepiva proti SARS-CoV-2 in izražamo zadovoljstvo, da se pripravlja toliko novih platform, ki bodo osnova tudi za ostala cepiva in rekombinantna zdravila, a kompetitivnost ne sme prevladati pred učinkovitostjo in varnostjo.

5 LITERATURA

1. Riedel S. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. *Proc. Bay Univ Med Cent* 2005; 18:21-25.
2. Speiser DE, Bachman MF. VOVID-19_ mechanism of Vaccination and Immunity. *Vaccines* 2020; 8: 404-423.
3. Tomašič T. Koronavirus SARS CoV-2 in bolezen covid-19. *Farm Vestn* 2020; 2: 107-111.
4. World Health Organization. WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines. Annex 1. WHO Technical Report Series. 2005; 927:31-63. Available at http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/nonclinical_evaluation/en/
5. Guidance on routine immunization services during COVID-19 pandemic in the WHO European Region, 20 March 2020 (produced by the WHO European Region)
6. Tripathi D, Yi G, Vankayalapati R. COVID-19: An update on vaccine development. *J Rheumatol* 2020; 15: 69-72.
7. Bratkovič T, Lunder M, Lovšin N. Razvoj cepiv proti virusu SARS-CoV-2. *Farm vestn* 2020; 163-173.
8. Editorial. Race for a COVID-19 vaccine. *EBioMedicine* 2020; 55: 102817
9. Thanh LT, Andreadakis Z, Kumar A, Gomez RR, Tollefsen S. et al. The COVID-19 vaccine development landscape. *Nat Rev Drug Discov* 2020; 19:305-309.
10. Amanat T, Krammer F. SARS-CoV-2 vaccines: status report. *Immunity* 2020; 52: 583-589.
11. Yang ZY, Kong WP, Huang Y, Roberts A, Murphy BR et al. A DNA vaccine induces SARS coronavirus neutralization and protective immunity in mice. *Nature* 2004; 428: 561-564.
12. Tay MZ, Poh CM, Renia L, MacAry PA, Nag LPF. The trinity of Covid-19: Immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev immunol* 2020; 20: 363-374.
13. Lundstrom K. latest development of RNA-based drugs and vaccines. *Future Sci OA* 2018; 4: FSO300.
14. Jackson LA, Anderson EJ, Rouphael NG, Roberts PC, Makhene M, Coler RN et al. An mRNA vaccine against SARS-CoV-2-preliminary report. *NEJM* 2020, August 25, DOI: 10.1056/NEJMoa2022483.

RAZVOJ PROTIVIRUSNIH UČINKOVIN PROTI SARS-CoV-2

Izr. prof. dr. Tihomir Tomašič, mag. farm.

*Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana;
tihomir.tomasic@ffa.uni-lj.si*

POVZETEK

Novi koronavirus SARS-CoV-2 se je konec leta 2019 pojavil na Kitajskem in se hitro razširil po svetu, zato je Svetovna zdravstvena organizacija 11. marca 2020 razglasila pandemijo. Virus SARS-CoV-2 povzroča bolezen covid-19, ki je lahko tudi smrtna pri relativno velikem deležu obolelih v rizičnih skupinah. Poleg preventivnih ukrepov in razvoja cepiv so zato nove protivirusne učinkovine proti SARS-CoV-2 ključne za uspešno zdravljenje covida-19 v prihodnosti. V prispevku bomo predstavili učinkovine in kandidate za učinkovine, ki delujejo protivirusno in kažejo obetavne učinke v terapiji covid-19.

VSEBINA

- 1 UVOD
- 2 ŽIVLJENJSKI CIKEL SARS-CoV-2
- 3 PROTIVIRUSNE UČINKOVINE PROTI SARS-CoV-2
 - 3.1 Učinkovine, ki preprečujejo vstop SARS-CoV-2 v gostiteljsko celico
 - 3.1.1. Kamostat
 - 3.1.2. Umifenovir
 - 3.1.3. Klorokin in hidroksiklorokin
 - 3.2. Zaviralci od RNA odvisne RNA-polimeraze (RdRp) SARS-CoV-2
 - 3.2.1. Favipiravir
 - 3.2.2. Remdesivir
 - 3.2.3. EIDD-2801
 - 3.3. Zaviralci virusne proteaze 3CL^{pro}
 - 3.3.1. Lopinavir/ritonavir
 - 3.4. Interferoni
 - 3.5. Kombinirana terapija
- 4 SKLEP
- 5 LITERATURA

1 UVOD

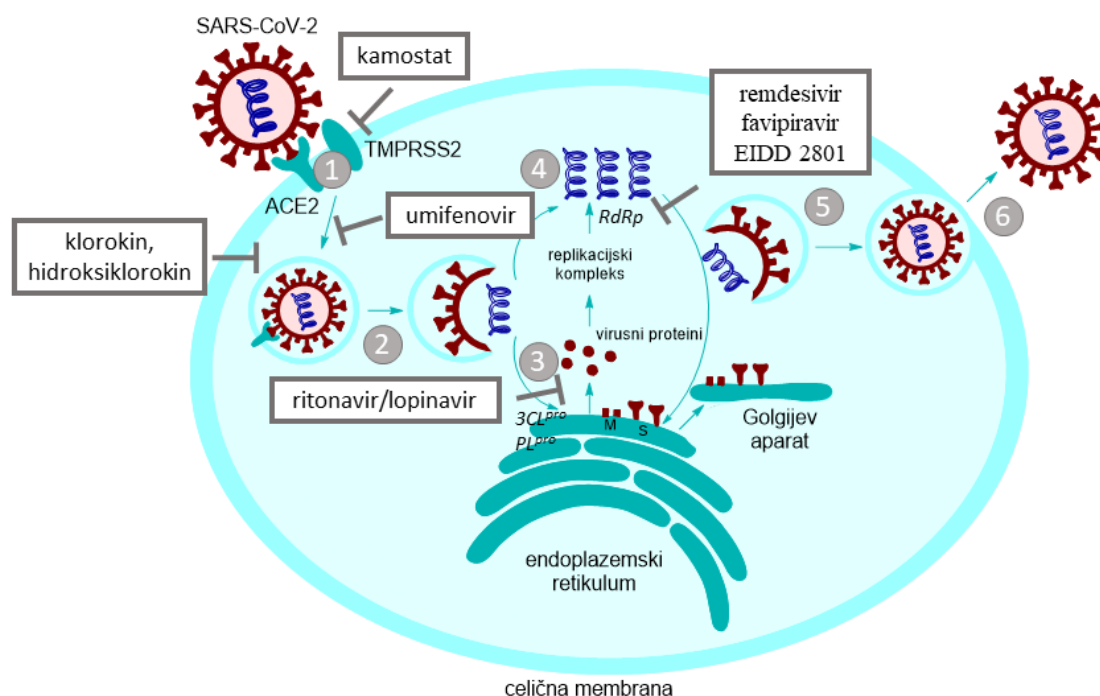
Človeka lahko okuži sedem znanih koronavirusov. Koronavirusi HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43 in HCoV-HKU1 pri človeku povzročajo predvsem prehladna obolenja. Virus, ki povzroča hudi akutni respiratorni sindrom (SARS-CoV), virus bližnjevzhodnega respiratornega sindroma (MERS-CoV) in virus SARS-CoV-2, ki je povzročitelj bolezni covid-19 (1), pa povzročajo okužbe spodnjih dihal, ki v večini primerov vodijo do virusne pljučnice, lahko pa prizadenejo tudi prebavila, srce, ledvica, jetra in centralni živčni sistem, kar lahko vodi do hkratne odpovedi več organov ter smrti (2–5).

Novi koronavirus SARS-CoV-2, ki je konec leta 2019 izbruhnil v mestu Vuhan na Kitajskem, se je v relativno kratkem času razširil po vsem svetu, zato je 11. marca 2020 Svetovna zdravstvena organizacija razglasila pandemijo. Konec avgusta 2020 je bilo po svetu potrjenih več kot 21 milijonov okužb s SARS-CoV-2, ki so imele za posledico tudi več kot 770.000 smrti (6). Bolezen covid-19 je prizadela tudi Slovenijo, saj se je pri nas okužilo več kot 2.400 ljudi, umrlo pa jih je več kot 120 (7). Virus SARS-CoV-2 je virus RNA, ki vsebuje enojno verigo RNA, obdano z nukleokapsido in ovito s fosfolipidno membransko ovojnico. Ker virus membrano pridobi z brstenjem iz človeških celic, je po svoji strukturi zelo podobna membrani gostiteljskih celic (1). V membrano so vgnezdene glikoproteini S (*angl. Spike protein*), ki se vežejo na encim angiotenzin-konvertazo tipa 2 (ACE2), ki je prisoten na površini membrane pljučnih epitelijskih celic gostitelja (8). Receptor ACE2 se nahaja tudi na površini celic arterij, srca, ledvic in črevesja. Poleg tega pomembnega strukturnega proteina SARS-CoV-2 vsebuje še druge strukturne proteine, kot so proteini N (nukleokapsida ali *angl. Nucleocapsid*), E (ovojnica ali *angl. Envelope*) in M (membrana ali *angl. Membrane*). Virus SARS-CoV-2 poleg naštetih strukturnih proteinov vsebuje tudi šestnajst nestrukturnih proteinov. Nekateri med njimi, kot so glavna cisteinska proteaza 3CL^{pro}, papainu podobna proteaza PL^{pro} in od RNA odvisna RNA-polimeraza (RdRp), imajo encimsko funkcijo (8, 9). Vse te makromolekulske tarče so odlično izhodišče za načrtovanje zdravilnih učinkovin z delovanjem proti virusu SARS-CoV-2, vendar razvoj najintenzivnejše poteka na področju zaviralcev proteaze 3CL^{pro} in RNA-polimeraze RdRp (10).

Relativno hiter razvoj potencialnih protivirusnih učinkovin proti SARS-CoV-2 omogoča velika podobnost novega koronavirusa s sorodnima, že predhodno poznanima virusoma SARS-CoV in MERS-CoV (11), zato lahko v kratkem času testiramo veliko število znanih spojin z dokazanim delovanjem proti tema dvema virusoma (12). Na ta način so že identificirali potencialne protivirusne učinkovine, ki so v predkliničnih in kliničnih fazah razvoja (13). Za odkrivanje protivirusnih učinkovin in cepiv je ključnega pomena tudi interakcija med proteinom S in receptorjem ACE2, saj ta začetni stik omogoči vstop virusa v gostiteljsko celico (1), vendar so potencialne učinkovine s tem mehanizmom delovanja trenutno še v zgodnjih fazah razvoja. V nadaljevanju bomo predstavili življenjski cikel virusa in ključne spojine, ki so jih identificirali relativno hitro po pojavu SARS-CoV-2 in jih vrednotili v različnih predkliničnih in kliničnih fazah kot potencialne kandidate za zdravljenje bolezni covid-19.

2 ŽIVLJENJSKI CIKEL SARS-CoV-2

Virus SARS-CoV-2 v gostiteljsko celico vstopa na podoben način kot sorodni virus SARS-CoV (Slika 1). Prva stopnja je vezava na membrano gostiteljske celice preko interakcije med proteinom S in receptorjem ACE2 (8). Tej sledi proteolitska cepitev in aktivacija proteina S s transmembransko serinsko proteazo TMPRSS2 ter vstop virusa v gostiteljsko celico z endocitozo in sprostitvev virusnega genoma v obliki ssRNA(+). V okuženi celici nato v delu endoplazemskega retikuluma nastanejo številni vezikli z dvojno membrano (14), ki so popolno mesto za zaščito virusnega genoma in omogočajo učinkovito podvajanje s pomočjo replikacijsko-transkripcijskega kompleksa virusa (15). Nato se virusna RNA prevede v virusni poliprotein, pri čemer sodelujejo mehanizmi gostiteljske celice. Virusni poliprotein je nefunkcionalen, dokler ga virusni proteazi 3CL^{pro} in PL^{pro} ne cepita do funkcionalnih virusnih proteinov, odgovornih za podvajanje in sestavljanje virionov, kar poteka v endoplazemskem retikulumu in Golgijevem aparatu (16). Nastali virioni se prenesejo do celične membrane in sprostijo iz celice z brstenjem, kar vodi do okužbe novih gostiteljskih celic.



Slika 1. Vstop virusa SARS-CoV-2 v gostiteljsko celico, podvajanje in sproščanje iz celice (koraki 1-6) ter prijemališča obravnavanih potencialnih učinkovin z delovanjem proti SARS-CoV-2. Protein S SARS-CoV-2 se veže na receptor ACE2 na membrani gostiteljske celice (korak 1). Encim TMPRSS2 cepi in aktivira protein S, kar omogoči zlitje virusne in celične membrane in vstop virusa v gostiteljsko celico z endocitozo (korak 2). Virus sprosti svojo RNA (korak 3). S prevajanjem dela RNA se najprej tvori virusni poliprotein, ki ga proteazi 3CL^{pro} in PL^{pro} cepita v funkcionalne virusne proteine. Nastane replikacijski kompleks, v katerem nastane veliko kopij virusne RNA in virusnih proteinov (korak 4). Iz nastalih strukturnih proteinov in RNA v endoplazemskem retikulumu in Golgijevem aparatu nastajajo novi virioni (korak 5), ki zapustijo gostiteljsko celico z brstenjem (korak 6).

3 PROTIVIRUSNE UČINKOVINE PROTI SARS-CoV-2

Zaradi pandemičnih razsežnosti okužb z virusom SARS-CoV-2 raziskave v smeri razvoja protivirusnih učinkovin za zdravljenje covid-19 potekajo izredno intenzivno. Običajno razvoj zdravilne učinkovine traja zelo dolgo, tudi več kot deset let. Zato je v trenutnem položaju ključno, da identificiramo in v kliničnih testiranjih najprej vrednotimo predvsem zdravilne učinkovine ali kandidate, za katere poznamo vsaj nekatere podatke o varnosti in njihov profil neželenih učinkov iz predhodnih kliničnih testiranj. Na ta način lahko v dokaj kratkem času pričnemo z vrednotenjem varnosti in učinkovitosti takšnih spojin pri zdravljenju bolnikov s covidom-19. Ta postopek odkrivanja zdravilnih učinkovin imenujemo tudi prenamemba oziroma v angleščini »*drug repurposing*« ali »*drug repositioning*« (17), ki pomeni, da znani učinkovini v novih kliničnih testiranjih dokažemo varnost in učinkovitost za drugo indikacijo kot je ta, za katero je bila predhodno registrirana. Seveda obstaja bojazen, da za nobeno od znanih učinkovin ne bomo uspeli dokazati varnosti in učinkovitosti za zdravljenje covid-19, zato je ključno tudi odkrivanje in razvoj novih spojin, od katerih bomo v prispevku izpostavili predvsem spojino EIDD-2801. Prijemališča spojin s protivirusnim delovanjem proti SARS-CoV-2 so prikazana na *Sliki 1*. Iz slike je razvidno, da se lahko z majhnimi molekulami vpletamo v različne faze življenjskega cikla virusa SARS-CoV-2 in na ta način dosežemo protivirusno delovanje.

3.1 Učinkovine, ki preprečujejo vstop SARS-CoV-2 v gostiteljsko celico

Pri preprečevanju vstopa virusa v celico lahko delujemo tako na virusne proteine (npr. protein S) kot tudi na proteine gostiteljske celice (npr. TMPRSS2), ali pa s spremembo pH v endosomih vplivamo na endocitozo (*Slika 1*).

3.1.1 Kamostat

Kamostat (*Slika 2*) je zaviralec serinskih proteaz in je od leta 2006 na Japonskem registriran za zdravljenje kroničnega pankreatitisa. Deluje tudi kot zaviralec transmembranske serinske proteaze TMPRSS2 na membrani gostiteljske celice, ki ima ključno vlogo pri vstopu SARS-CoV-2 v celico zaradi interakcije s proteinom S. Proteaza TMPRSS2 je namreč odgovorna za cepitev in aktivacijo proteina S SARS-CoV-2. Na celični liniji Calu-3 so tako pokazali, da lahko z zaviranjem TMPRSS2 s kamostatom preprečimo vstop različnim koronavirusom, kot so SARS-CoV, MERS-CoV in SARS-CoV-2, in dosežemo tudi zmanjšanje okužbe celic s SARS-CoV-2 (8). Na osnovi te študije so predlagali kamostat kot potencialno učinkovino za zdravljenje covid-19, vendar rezultati kliničnih študij še niso znani. Med zaviralce TMPRSS2, ki izkazujejo delovanje proti SARS-CoV-2, uvrščamo še nafamostat (18) in bromheksin, ki imata prav tako obetavne rezultate preliminarnih študij (19).

3.1.2 Umifenovir

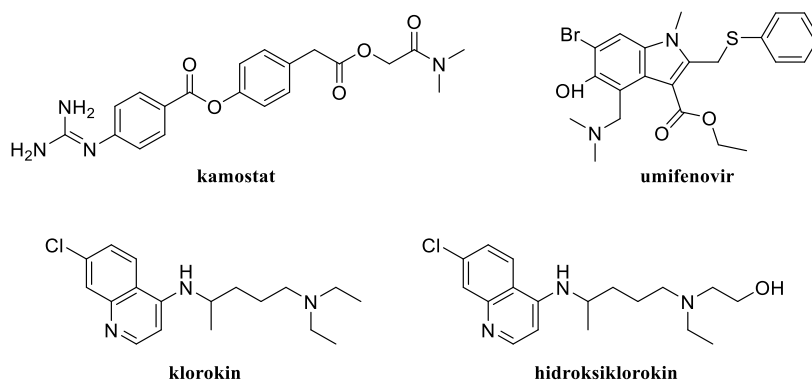
Umifenovir ali arbidol (*Slika 2*) je širokospektralna protivirusna spojina, ki se v Rusiji in na Kitajskem uporablja za zdravljenje gripe. Umifenovir je po svojih fizikalno-kemijskih lastnostih hidrofobna in šibko bazična učinkovina, ki se zaradi svoje planarne strukture vgrajuje v membrane. Neposredno protivirusno delovanje tako povezujejo z interakcijo z aromatskimi aminokislinskimi ostanki strukturnih virusnih

glikoproteinov in/ali z virusno lipidno ovojnico (20). Na Kitajskem so na začetku epidemije v zgodnjih fazah poteka bolezni covid-19 uporabljali tudi nekatere učinkovine za zdravljenje gripe, zato so vrednotili *in vitro* protivirusno delovanje umifenovirja, laninamivirja, baloksavirja, peramivirja, oseltamivirja in zanamivirja proti SARS-CoV-2. Med temi učinkovinami je najmočnejše delovanje izkazoval umifenovir. Ugotovili so, da preprečuje vezavo SARS-CoV-2 na gostiteljsko celico in vpliva tudi na sproščanje virusa iz znotrajceličnih veziklov, ki nastanejo po vstopu virusa v celico (21). Rezultati manjše klinične študije, ki je vključevala 86 bolnikov z blažjo do zmerno obliko covid-19, od katerih jih je 35 prejelo umifenovir, so pokazali, da monoterapija z umifenovirjem nima pomembnega učinka na potek bolezni (22). Kljub temu pa so potrebne nadaljnje klinične študije na večjem vzorcu bolnikov s covidom-19, ki nam bodo dale odgovor o dejanski varnosti in učinkovitosti umifenovirja pri tej bolezni.

3.1.3 Klorokin in hidroksiklorokin

Klorokin in hidroksiklorokin (*Slika 2*) sta peroralno uporabni zdravilni učinkovini, ki ju že vrsto let uporabljamo v profilaksi in za zdravljenje malarije. Hidroksiklorokin je pridobil tudi dovoljenje za promet za zdravljenje revmatoidnega artritisa, porfirije in generaliziranega lupusa eritematozusa, saj deluje imunomodulatorno.

Poleg omenjenega imata obe učinkovini tudi delovanje proti nekaterim virusom RNA, tudi SARS-CoV-2, proti kateremu ima močnejši učinek hidroksiklorokin (23). Mehanizem delovanja klorokina in hidroksiklorokina poteka na več nivojih. Znano je, da zaradi bazičnih lastnosti zvišata pH v znotrajceličnih organelih, kot so endosomi in lizosomi, s čimer preprečita vstop SARS-CoV-2 v gostiteljsko celico, saj je kisel pH v endosomih predpogoj za zlitje virusne membrane z membrano lizosoma. Klorokin lahko dodatno prepreči vstop virusa v celico tudi preko vpliva na posttranslacijsko glikozilacijo receptorja ACE2 in proteina S SARS-CoV-2. Deluje tudi kot ionofor za cinkove ione, ki pri višji znotrajcelični koncentraciji zmanjšajo biosintezo virusne RdRp. Hidroksiklorokin dodatno deluje tudi protivnetno, in sicer preko zmanjšanja izražanja TNF α , interlevkina-1 β , interlevkina-6 in zmanjšanja aktivacije signalne poti z mitogeni aktiviranih proteinskih kinaz, kar bi lahko imelo ugoden vpliv na potek bolezni covid-19 v drugi fazi, preden pride do pojava citokinske nevihte (24). Številne klinične študije kažejo na potencial klorokina in hidroksiklorokina pri zdravljenju covid-19, vendar pojav neželenih učinkov, kot so gastrointestinalne motnje, nakazuje na morebitne ovire pri uporabi teh dveh učinkovin v terapiji (25).



Slika 2. Učinkovine, ki preprečujejo vstop virusa SARS-CoV-2 v gostiteljsko celico.

3.2 Zaviralci od RNA odvisne RNA-polimeraze (RdRp) SARS-CoV-2

RdRp ima ključno vlogo pri replikaciji virusa SARS-CoV-2 (*Slika 1*), zato je pomembna tarča za razvoj protivirusnih učinkovin za zdravljenje covid-19. RdRp SARS-CoV-2 in SARS-CoV imata več kot 95% podobnost aminokislinskega zaporedja, kar je omogočilo hitro testiranje velikega nabora spojin, ki so predhodno že izkazovale delovanje proti SARS-CoV in ostalim virusom RNA (4,26).

3.2.1 Favipiravir

Favipiravir ali T-705 (*Slika 3*) je protivirusna učinkovina, ki so jo odkrili z rešetanjem kemijskih knjižnic. Deluje tako, da selektivno zavira RdRp. Spojina je predzdravilo, saj se šele znotraj celice s celičnimi encimi fosforibozilira do aktivne oblike, favipiravir ribofuranozil-5'-trifosfata. Slednjega nato kot lažni substrat prepozna RdRp, kar vodi v zaviranje RNA-polimerazne aktivnosti (27, 28), poleg tega pa vključitev lažnih nukleotidov v virusno RNA povzroči visoko stopnjo mutacij RNA, ki ustvarjajo neživi virusni fenotip (29). Favipiravir ima širok spekter protivirusnega delovanja, saj je katalitična domena RdRp ohranjena med številnimi tipi virusov RNA (27). Učinkovit je ne le proti številnim tipom in podtipom virusa gripe, temveč tudi proti ostalim virusom RNA, kot so arenavirusi, hantavirusi, bunjavirusi, norovirusi in filovirusi (27, 29, 30). Zaradi edinstvenega mehanizma delovanja favipiravir predstavlja tudi obetavno zdravilno učinkovino v boju proti SARS-CoV-2.

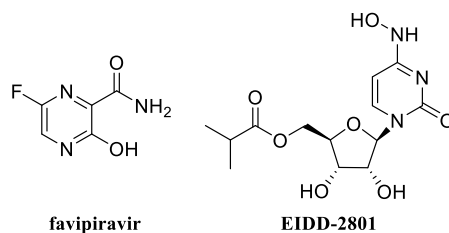
Favipiravir je od leta 2014 registriran na Japonskem za zdravljenje gripe, vendar le za posamezne podtype virusa in v posebnih okoliščinah bolezni. Protivirusno delovanje favipiravirja so proučevali tudi za zdravljenje ebole (30). Slabost favipiravirja je teratogenost, ki zahteva dodatno previdnost pri zdravljenju, sicer pa ima v dosedanjih kliničnih raziskavah ugoden profil neželenih učinkov. Povzroča lahko blage gastrointestinalne težave in asimptomatske dvige sečne kisline. Dodatne prednosti te učinkovine so še možnost peroralnega zdravljenja in relativno majhno tveganje za interakcije z zdravili (31). Trenutno poteka več kliničnih raziskav, ki proučujejo učinkovitost favipiravirja kot samostojno ali kombinirano zdravljenje covida-19.

3.2.2 Remdesivir

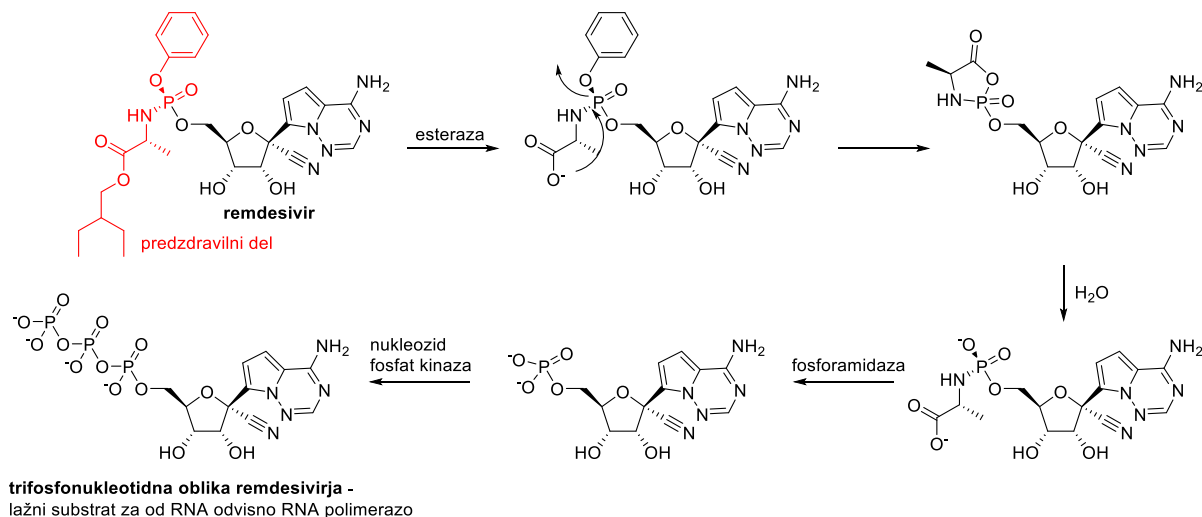
Remdesivir ali GS-5734 (*Slika 4*) je bil razvit za zdravljenje okužb z virusom ebola, vendar še nima dovoljenja za promet (32, 33). Učinkovina je fosforamidatno predzdravilo adenzin C-nukleozida, ki se v jetrih z esterazami pretvori do ustreznega fosforamidata. Slednji se s tkivnimi fosforamidazami spremeni do 5'-monofosfata, nato v celicah sledi pretvorba do aktivne oblike trifosfata (*Slika 4*), ki zavira delovanje virusne RdRp – upočasnjuje sintezo virusne RNA, kot nadomestni substrat tekmuje z adenzin trifosfatom za vgradnjo v RNA in ovira kontrolno branje (vnaša mutacije v virusni genom) (34, 35). Zaradi takšnega mehanizma delovanja remdesivir deluje proti širokemu spektru virusov z RNA kot dednim materialom. V raziskavah na človeških celicah *in vitro* je remdesivir izkazal učinkovitost tudi proti različnim koronavirusom, vključno s SARS-CoV, MERS-CoV in SARS-CoV-2. Remdesivir je glede na dosedanje rezultate kliničnih raziskav ena od najbolj obetavnih spojin za zdravljenje covid-19 in je na voljo za sočutno uporabo pri bolnikih, ki nimajo možnosti vključitve v klinična preskušanja. O neželenih učinkih, kot so diareja, izpuščaji in hipotenzija, so poročali pri bolnikih s covidom-19, ki so bili na mehanski ventilaciji (25). Na osnovi dosedanjih podatkov o varnosti in učinkovitosti pri zdravljenju covid-19 je na Japonskem že pridobil dovoljenje za promet.

3.2.3 EIDD-2801

EIDD-2801 ali MK-4482 (*Slika 3*) je peroralno uporabno predzdravilo z ugodnimi farmakokinetičnimi lastnostmi, ki je v predklinični fazi razvoja in ima širok spekter delovanja proti virusom z genomom RNA (36). Izopropilni ester EIDD-2801 se po zaužitju hidrolizira do β -D-N⁴-hidroksicitidina, ki se nato pretvori v ustrezni N-hidroksicitidintrifosfat, ki zavira RdRp koronavirusov, vključno s SARS-CoV-2. Pri replikaciji ga RdRp vgradi v nastajajočo verigo virusne RNA. Po vgradnji v RNA ne deluje kot prekinjevalec verige, ampak sproži nastanek zelo velikega števila mutacij virusne RNA, kar pri translaciji vodi do okvarjenih, nefunkcionalnih virusnih proteinov, s čimer je doseženo protivirusno delovanje. Potencial za razvoj rezistence proti EIDD-2801 je zelo nizek (37). Ena od pomembnih lastnosti EIDD-2801 je tudi, da v primeru MERS-CoV deluje na proti remdesivirju odporen MERS-CoV. Ker sta mutirani aminokislini (F480L in/ali V557L) ohranjeni v RdRp večine koronavirusov, predstavljata potencial za razvoj rezistence proti remdesivirju tudi pri SARS-CoV-2 (37). Delovanje EIDD-2801 je tako obetavno za nadaljnji razvoj in možnost kombinirane terapije z remdesivirjem v primeru klinično pomembnega razvoja rezistence SARS-CoV-2 proti remdesivirju. Obetavno protivirusno delovanje EIDD-2801 *in vitro* in *in vivo* nakazuje velik potencial te spojine za zdravljenje bolezni covid-19, vendar bo treba počakati na rezultate načrtovanih kliničnih študij, v katerih bo treba dokazati tako njeno varnost kot učinkovitost.



Slika 3. Zaviralci od RNA odvisne RNA-polimeraze z delovanjem proti SARS-CoV-2.

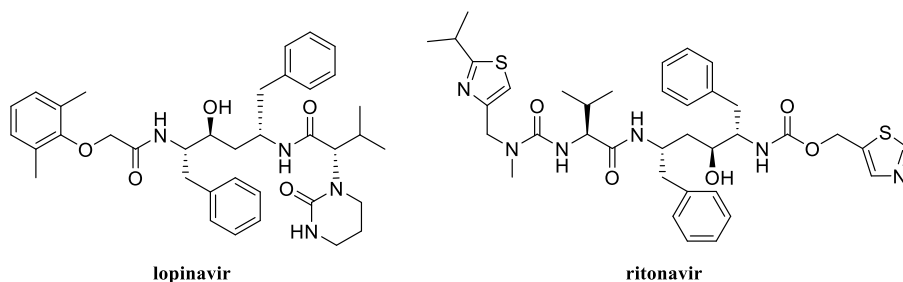


Slika 4. Shema bioaktivacije remdesivirja.

3.3 Zaviralci virusne proteaze 3CL^{pro}

3.3.1 Lopinavir/ritonavir

Učinkovini lopinavir in ritonavir (*Slika 5*) sta zaviralca aspartatne proteaze virusa HIV-1 in se uporabljata v terapiji okužb z virusom HIV. Lopinavir so razvili kot optimiziran analog ritonavirja z delovanjem na proti ritonavirju odpornemu HIV-1. Učinkovini uporabljamo v kombinaciji, saj ritonavir deluje kot zaviralec citokromov P450, s čimer dosežemo višjo plazemsko koncentracijo lopinavirja (38). Pri SARS-CoV-2 predpostavljajo, da učinkovini zavirata cisteinsko proteazo 3CL^{pro}, s čimer preprečita cepitev virusnega poliproteina na funkcionalne proteine in s tem dosežeta protivirusno delovanje, vendar rezultati zaključenih kliničnih testiranj nakazujejo, da lopinavir in ritonavir nista učinkovita pri zdravljenju covid-19 (22, 25).



Slika 5. Zaviralca cisteinske proteaze 3CL^{pro} virusa SARS-CoV-2.

3.4 Interferoni

Interferoni so skupina citokinov, ki jih izločajo številne vrste gostiteljskih celic kot odziv na vdor patogenov, tudi virusa SARS-CoV-2, in na ta način uravnava odziv imunskega sistema. Sproščeni interferoni ščitijo celice, iz katerih se sproščajo, kot tudi celice v njihovi neposredni bližini pred napadom virusov. Pri virusnih okužbah imajo pomembno vlogo predvsem interferoni α in β , ki jih uvrščamo med interferone tipa I. Delujejo tako, da inducirajo nastanek protein kinaze R, ki nespecifično zavira sintezo proteinov, in RNaze L, ki razgradi celično in virusno RNA. Posledica tega je zmanjševanje nastajanja novih kopij virusa. Interferoni spodbujajo tudi izražanje pglavitnega histokompatibilnostnega kompleksa tipa I, s čimer stimulirajo delovanje citotoksičnih limfocitov T CD8+, aktivirajo naravne celice ubijalke in izzovejo zorenje dendritičnih celic. Ker SARS-CoV-2 nosi genski zapis za proteine, ki posredno zavirajo nastajanje interferonov tipa I in tako delujejo imunosupresivno, interferoni tipa I predstavljajo obetavne kandidate za zdravljenje bolezni covid-19 (39, 40).

3.5. Kombinirana terapija

Ena od strategij za doseganje sinergističnega učinka in hkratno zmanjševanje pojava neželenih učinkov ter preprečevanje razvoja rezistence je kombinirana terapija, pri kateri zdravimo s kombinacijo učinkovin z različnimi mehanizmi delovanja. Do sedaj so v kliničnih testiranjih vrednotili kombinacijo azitromicina in hidroksiklorokina, kombinacijo ribavirina, lopinavirja/ritonavirja in interferona- α , kombinacijo favipiravirja in lopinavirja/ritonavirja in še nekaterih. Veliko študij s kombinacijami učinkovin še ni zaključenih, vendar rezultati nekaterih zaključenih manjših študij že nakazujejo na prednosti pri uporabi kombinirane terapije (25).

4 SKLEP

Razvoj potencialnih kandidatov za zdravljenje bolezni covid-19 poteka zelo intenzivno tako v predkliničnih kot tudi v kliničnih fazah s ciljanjem različnih stopenj življenjskega cikla SARS-CoV-2. Pravi potencial predstavljenih učinkovin za zdravljenje bolezni covid-19 bo znan šele po rezultatih randomiziranih kliničnih raziskav, ki trenutno potekajo na velikem številu bolnikov. Nenazadnje pa je zelo pomemben tudi predklinični razvoj novih strukturnih tipov spojin in spojin z novimi mehanizmi delovanja za uspešen boj s koronavirusi, ne samo SARS-CoV-2, tudi v prihodnosti.

5 LITERATURA

1. Yan R, Zhang Y, Li Y, Xia L, Guo Y, Zhou Q. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science* 2020; 367 (6485): 1444–1448.
2. Li W, Shi Z, Yu M, Ren W, Smith C, Epstein JH, et al. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science* 2005; 310 (5748): 676–679.
3. Osman EEA, Toogood PL, Neamati N. COVID-19: Living through Another Pandemic. *ACS Infect Dis* 2020, 6 (7): 1548–1552.
4. Chan JF-W, Kok K-H, Zhu Z, Chu H, To KK-W, Yuan S, et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg Microbes Infect* 2020; 9 (1): 221–36.
5. Tomašič T. Koronavirus SARS-CoV-2 in bolezni covid-19. *Farm vestn* 2020; 71 (2): 107–11.

6. Coronavirus [Internet]. [cited 2020 August 19]. Available from: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>.
7. Dnevno spremljanje okužb s SARS-CoV-2 (COVID-19) [Internet]. [cited 2020 Aug 17]. Available from: <https://www.nijz.si/sl/dnevno-spremljanje-okuzb-s-sars-cov-2-covid-19>.
8. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* 2020; 181 (2): 271–280.e8.
9. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen Y-M, Wang W, Song Z-G, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 2020; 579 (7798): 265–269.
10. Ghosh AK, Brindisi M, Shahabi D, Chapman ME, Mesecar AD. Drug Development and Medicinal Chemistry Efforts toward SARS-Coronavirus and Covid-19 Therapeutics. *ChemMedChem*. 2020; 15 (11): 907–932.
11. Morse JS, Lalonde T, Xu S, Liu WR. Learning from the Past: Possible Urgent Prevention and Treatment Options for Severe Acute Respiratory Infections Caused by 2019-nCoV. *Chembiochem Eur J Chem Biol* 2020; 21 (5): 730–738.
12. Tomašič T, Jakopin Ž, Anderluh M. Protivirusne učinkovine proti SARS-CoV-2 za zdravljenje bolezni covid-19. *Farm vestn* 2020; 71 (2): 133–140.
13. Zhang J, Xie B, Hashimoto K. Current status of potential therapeutic candidates for the COVID-19 crisis. *Brain Behav Immun* 2020; 87: 59–73.
14. Knoops K, Kikkert M, Worm SHE van den, Zevenhoven-Dobbe JC, van der Meer Y, Koster AJ, et al. SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. *PLoS Biol* 2008; 6 (9): e226.
15. Hagemeyer MC, Verheije MH, Ulasli M, Shaltiel IA, Vries LA de, Reggiori F, et al. Dynamics of Coronavirus Replication-Transcription Complexes. *J Virol* 2010; 84 (4): 2134–2149.
16. Liu C, Zhou Q, Li Y, Garner LV, Watkins SP, Carter LJ, et al. Research and Development on Therapeutic Agents and Vaccines for COVID-19 and Related Human Coronavirus Diseases. *ACS Cent Sci* 2020; 6 (3): 315–331.
17. Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, Escott KJ, Hopper S, Wells A, et al. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov* 2019; 18 (1): 41–58.
18. Hoffmann M, Schroeder S, Kleine-Weber H, Müller MA, Drosten C, Pöhlmann S. Nafamostat Mesylate Blocks Activation of SARS-CoV-2: New Treatment Option for COVID-19. *Antimicrob Agents Chemother* 2020; 64 (6): e00754-20.
19. Santos J, Brierley S, Gandhi MJ, Cohen MA, Moschella PC, Declan ABL. Repurposing Therapeutics for Potential Treatment of SARS-CoV-2: A Review. *Viruses* 2020; 12 (7): e705.
20. Blaising J, Polyak SJ, Pécheur E-I. Arbidol as a broad-spectrum antiviral: an update. *Antiviral Res*. 2014; 107: 84–94.
21. Wang X, Cao R, Zhang H, Liu J, Xu M, Hu H, et al. The anti-influenza virus drug, arbidol is an efficient inhibitor of SARS-CoV-2 in vitro. *Cell Discov* 2020; 6 (1): 1–5.
22. Li Y, Xie Z, Lin W, Cai W, Wen C, Guan Y, et al. Efficacy and safety of lopinavir/ritonavir or arbidol in adult patients with mild/moderate COVID-19: an exploratory randomized controlled trial. *Med*. 2020; S2666634020300015.
23. Liu J, Cao R, Xu M, Wang X, Zhang H, Hu H, et al. Hydroxychloroquine, a less toxic derivative of chloroquine, is effective in inhibiting SARS-CoV-2 infection in vitro. *Cell Discov* 2020; 6 (1): 16.
24. Zhou D, Dai S-M, Tong Q. COVID-19: a recommendation to examine the effect of hydroxychloroquine in preventing infection and progression. *J Antimicrob Chemother* 2020; 75 (7): 1667–1670.
25. El Kantar S, Nehmeh B, Saad P, Mitri G, Estephan C, Mroueh M, et al. Derivatization and combination therapy of current COVID-19 therapeutic agents: a review of mechanistic pathways, adverse effects, and binding sites. *Drug Discov Today* 2020; doi: 10.1016/j.drudis.2020.08.002.
26. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet* 2020; 395 (10224): 565–574.
27. Furuta Y, Komeno T, Nakamura T. Favipiravir (T-705), a broad spectrum inhibitor of viral RNA polymerase. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2017; 93 (7): 449–463.
28. Furuta Y, Gowen BB, Takahashi K, Shiraki K, Smee DF, Barnard DL. Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor. *Antiviral Res*. 2013; 100 (2): 446–454.

29. Baranovich T, Wong S-S, Armstrong J, Marjuki H, Webby RJ, Webster RG, et al. T-705 (favipiravir) induces lethal mutagenesis in influenza A H1N1 viruses in vitro. *J Virol.* 2013; 87 (7): 3741–3751.
30. Sissoko D, Laouenan C, Folkesson E, M'Lebing A-B, Beavogui A-H, Baize S, et al. Experimental Treatment with Favipiravir for Ebola Virus Disease (the JIKI Trial): A Historically Controlled, Single-Arm Proof-of-Concept Trial in Guinea. *PLoS Med* 2016; 13 (3): e1001967.
31. Pharmaceutical and Food Safety Bureau Ministry of Health, Labour and Welfare Japan. Report on the Deliberation results: Avigan Tablet 200 mg 4 March 2014. Dostopno na <https://www.pmda.go.jp/files/000210319.pdf>.
32. Ferner RE, Aronson JK. Remdesivir in covid-19. *BMJ* 2020; 369: m1610.
33. Scavone C, Brusco S, Bertini M, Sportiello L, Rafaniello C, Zoccoli A, et al. Current pharmacological treatments for COVID-19: What's next? *Br J Pharmacol* 2020; doi: 10.1111/bph.15072.
34. Wang Y, Zhang D, Du G, Du R, Zhao J, Jin Y, et al. Remdesivir in adults with severe COVID-19: a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. *The Lancet* 2020; 395 (10236): 1569–1578.
35. Eastman RT, Roth JS, Brimacombe KR, Simeonov A, Shen M, Patnaik S, et al. Remdesivir: A Review of Its Discovery and Development Leading to Emergency Use Authorization for Treatment of COVID-19. *ACS Cent Sci* 2020; 6 (5): 672–683.
36. Sheahan TP, Sims AC, Zhou S, Graham RL, Pruijssers AJ, Agostini ML, et al. An orally bioavailable broad-spectrum antiviral inhibits SARS-CoV-2 in human airway epithelial cell cultures and multiple coronaviruses in mice. *Sci Transl Med* 2020; 12 (541): eabb5883.
37. Agostini ML, Pruijssers AJ, Chappell JD, Gribble J, Lu X, Andres EL, et al. Small-Molecule Antiviral β -D-N⁴-Hydroxycytidine Inhibits a Proofreading-Intact Coronavirus with a High Genetic Barrier to Resistance. *J Virol* 2019; 93 (24): e01348-19.
38. Kaletra SmPC. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/kaletra-epar-product-information_en.pdf.
39. Shalhoub S. Interferon beta-1b for COVID-19. *The Lancet* 2020; S0140673620311016.
40. Lokugamage KG, Hage A, Schindewolf C, Rajsbaum R, Menachery VD. SARS-CoV-2 is sensitive to type I interferon pretreatment. bioRxiv preprint; <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.03.07.982264>.

Z DOKAZI PODPRTO ZDRAVLJENJE COVIDA-19 Z ZDRAVILI

Doc. dr. Lea Knez, mag. farm., spec.^{1,2}; Tanja Tomšič, mag. farm., spec.³; asist. Tina Morgan, mag. farm., spec.¹; izr. prof. dr. Igor Locatelli, mag. farm.²

¹Klinika Golnik, Golnik 36, 4204 Golnik

²Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

³Univerzitetni klinični center Maribor, Ljubljanska ulica 5, 2000 Maribor

lea.knez@ffa.uni-lj.si

POVZETEK

Danes že imamo na voljo prvo v Evropski Uniji registrirano zdravilo za zdravljenje covid-19, remdesivir. Imamo tudi zanesljive dokaze o zmanjšanju smrtnosti najhujše bolnih bolnikov s covidom-19 ob zdravljenju z nizkimi odmerki kortikosteroidov in imamo na voljo rezultate dobro zasnovanih randomiziranih kliničnih raziskav, ki niso potrdile učinkovitosti številnih protivirusnih zdravil, pogosto predpostavljene na teoretičnih osnovah in opisih primerov. V prispevku opisujemo najbolj odmevna zdravila pri COVID-19: remdesivir, lopinavir z ritonavirjem, favipiravir in (hidroksi)klorokin. Zgodbo o (hidroksi)klorokinu opisujemo kot dokaz, kako se lahko le preko kliničnih raziskav, tudi v Sloveniji, premaknemo iz točke, ko »mislimo«, k temu, da »vemo«, katera zdravila so varna in učinkovita pri covidu-19.

VSEBINA

- 1 NUJNO POTREBUJEMO ZDRAVILA ZA BOLNIKE S COVIDOM-19, A Z DOKAZANO UČINKOVITOSTJO IN VARNOSTJO
- 2 NAČELA, POMEMBNA ZA RAZUMEVANJE ZDRAVLJENJA BOLEZNI COVID-19
- 3 UČINKOVITOST IN VARNOST REMDESIVIRJA
- 4 UČINKOVITOST IN VARNOST KOMBINACIJE LOPINAVIRJA Z RITONAVIRJEM
- 5 UČINKOVITOST IN VARNOST FAVIPIRAVIRJA
- 6 UČINKOVITOST IN VARNOST KLOOROKINA IN HIDROKSIKLOOROKINA
 - 6.1 Prve majhne opazovalne raziskave
 - 6.2 Velike opazovalne kohortne raziskave
 - 6.3 Prospektivne randomizirane klinične raziskave
- 7 SKLEP
- 8 LITERATURA

1 NUJNO POTREBUJEMO ZDRAVILA ZA BOLNIKE S COVIDOM-19, A Z DOKAZANO UČINKOVITOSTJO IN VARNOSTJO

Danes že imamo na voljo prvo pri Evropski agenciji za zdravila (*angl. European Medicines Agency; EMA*) registrirano zdravilo za zdravljenje covida-19 (*angl. Corona Virus Infectious Disease-19*), remdesivir, imamo zanesljive dokaze o zmanjšanju smrtnosti najhuje bolnih bolnikov s covidom-19 ob zdravljenju z nizkimi odmerki kortikosteroidov in imamo na voljo rezultate dobro zasnovanih randomiziranih kliničnih raziskav, ki niso potrdile učinkovitosti številnih protivirusnih zdravil, pogosto predpostavljene na teoretičnih osnovah in opisih primerov (1–7). Ob tem lahko hitro pozabimo na to, kako smo se ne le laična javnost, ampak, zaskrbljujoče, tudi strokovna in znanstvena javnost, pogosto nekritično, razveselili vsakega pozitivnega signala o učinkovitosti zdravila proti novemu koronavirusu SARS-CoV-2 (*angl. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus type 2*), tudi če le na nivoju *in vitro* učinkovitosti ali anekdotičnih opisov primerov bolnikov. Tako smo pod pritiskom pandemije covida-19 pozabljali na osnovno načelo »*primum non nocere*« in na to, da varnost in učinkovitost zdravila lahko dokažemo le v dobro načrtovanih randomiziranih kliničnih raziskavah s primerjalno skupino (8–10). Pozabili smo, da ta zahteva velja tudi za zdravila, ki že imajo dovoljenje za promet za drugo indikacijo. Seveda je izvajanje kliničnih raziskav v času epidemije in preobremenjenega zdravstvenega sistema zelo neugodno, vendar je to pri preskušanju protivirusnih zdravil edina možnost, saj izven časa epidemije primernih bolnikov preprosto ni (11). Dokaz za to imamo tudi pri covidu-19, kjer so številne klinične raziskave morali predčasno zaključiti ravno zaradi zmanjšane vključevanja ob koncu epidemije (12, 13). S tem, ko izven kliničnih raziskav bolniku ponudimo »nekaj«, kar »mislimo«, da mu bo bolj koristilo kot škodilo, onemogočamo, da bi ob naslednjem valu epidemije vedeli, katere intervencije koristijo in katere škodijo. To zelo neposredno dokazujejo izkušnje iz nedavnih epidemij virusa SARS-CoV, virusa Ebola, virusa H1N1 influence A (11, 14, 15). V trenutni pandemiji smo se lahko nekaj že naučili na primeru (hidroksi)klorokina, ki smo ju začeli množično uporabljati na podlagi poročila o pretirano dobrih izidih zdravljenja pri 36 bolnikih iz metodološko zelo pomanjkljive raziskave (16). Novejše velike in metodološko premišljene opazovalne raziskave omenjenih učinkovin so postavile sum na njihovo neučinkovitost, več randomiziranih kliničnih raziskav pa je to potrdilo (3, 5–7, 17, 18).

Preglednica 1. Povzetek osnovnih podatkov izbranih zdravil pri zdravljenju covid-19 (59).

ZDRAVILO	ODMEREK	NEŽELENI UČINKI	NOSEČNOST	OPOMBE
Remdesivir 100 mg prašek za IV RAZT	1. dan: 200 mg, 1x/d, iv; nato: 100 mg, 1x/d, iv, do 10 d	Zvišanje jetrnih encimov, ledvična toksičnost	Varnost ni poznana, se odsvetuje	KI pri oGF < 30 mL/min Ne uporabljati s (hidroksi)klorokinom: manjša učinkovitost
Lopinavir ritonavirjem 80/20 mg/mL PO RAZT 200/50 mg TBL	z 400/100 mg 2x/d, PO, do 14 d	Pogosti: GIT NU (slabost, bruhanje, driska) Resni: pankreatitis, hepatotoksičnost, podaljšanje intervala PR	Uporaba možna, pretehtati koristi in tveganja	Močna CYP 3A4 zaviralca: obvezen pregled interakcij Ne drobiti tbl: zmanjšanje biološke uporabnosti Pri PO RAZT pozornost: 1 mL vsebuje 356,3 mg alkohola in 152,7 mg propilenglikola na 1 mL , predvsem pri nosečnosti, ledvični okvari, nekompatibilno s poliuretanskimi sondami
Favipiravir 200 mg TBL	1. dan: FVP 1800 mg 2x/d, PO; nato 800 mg 2x/d, PO, do 10 d	Hiperurikemija, driska, zvišanje jetrnih encimov	Kontraindicirana uporaba	Teratogen: izključitev nosečnosti, obvezna kontracepcija tudi za moškega Zaviralec CYP2C8 in aldehydne oksidaze: pregled interakcij
Klorokin 250 mg TBL	500 mg 2x/d, PO, 5-10 d Različna odmerjanja v kliničnih raziskavah.	Pogosti: GIT NU (slabost, bruhanje, abdominalni krči, driska) Resni: podaljšanje QT intervala, hematološki NU, hipoglikemija, retinalna toksičnost, NU na CŽS	Uporaba možna, pretehtati koristi in tveganja	Pri oGF < 10 mL/min: 50 % odmerek Podaljšuje QT: pregled interakcij
Hidroksiklorokin 200 mg TBL	1. dan: 400 mg 2x/d, PO; nato 200 mg 2x/d, PO, 5- 10 d Različna odmerjanja v kliničnih raziskavah.	Kot klorokin, vendar manj pogosto	Uporaba možna, pretehtati koristi in tveganja	Podaljšuje QT: pregled interakcij

IV: intravenska; PO: peroralna; RAZT: raztopina; TBL: tablete; NU: neželeni učinki; GIT: gastrointestinalni; CYP: citokrom P450; d: dan; KI: kontraindicirano; oGF: ocena glomerulne filtracije; CŽS: centralno živčni sistem

Znanstvena skupnost je ob pandemiji covid-19 veliko bolj naravnana k raziskovanju kot v preteklih pandemijah (1). Število prijavljenih kliničnih raziskav zdravil in cepiv je izjemno, zato sedaj številni svarijo pred nerazsodno porabo virov za izpeljavo majhnih kliničnih raziskav, ki ne morejo odgovoriti na ključna vprašanja, in opozarjajo, da je trud potrebno usmeriti v izvajanje velikih in dobro načrtovanih mednarodnih raziskav (10, 19). V tem duhu je bilo vzpostavljenih več raziskovalnih platform, kot SOLIDARITY v okviru Svetovne zdravstvene organizacije (SZO) ali RECOVERY v Veliki Britaniji, kjer hospitalizirane bolnike s covidom-19 naključno razporejajo v skupine, ki prejemajo različna zdravljenja, bodisi z že registriranimi zdravili, kot so hidroksiklorokin, lopinavir z ritonavirjem z ali brez interferona- β , azitromicin, tocilizumab, deksametazon ali še eksperimentalnimi zdravili, kot je bil v času zasnove raziskave remdesivir (20, 21). Z minimalnimi administrativnimi obremenitvami skušajo vključiti čim večje število udeležencev, da bi hitreje potrdili ali ovrgli učinkovitost teh zdravljenj pri covidu-19. V nadaljevanju predstavljamo osnovne značilnosti nekaterih izmed teh zdravil (*Preglednica 1*), predvsem pa najnovejše dokaze o varnosti in učinkovitosti najbolj odmevnih zdravil, ki smo jih uporabljali tudi v Sloveniji.

2 NAČELA, POMEMBNA ZA RAZUMEVANJE ZDRAVLJENJA BOLEZNI COVID-19

Za ustrezno tolmačenje raziskav zdravljenja covid-19 je pomembno poznavanje značilnosti bolezni in zdravljenja. Koronavirusi so velika družina virusov, ki običajno povzročajo blage do zmerne okužbe zgornjih dihal, kot je navaden prehlad. Veljali so za nenevarne vse do pojava novjših koronavirusov SARS-CoV, MERS (*angl. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*) in najnovejšega SARS-CoV-2, ki lahko povzročajo tudi izbruh težkega akutnega respiratornega sindroma (22). Virus SARS-CoV-2 povzroča bolezen, ki jo imenujemo covid-19.

Pri vrednotenju raziskav covid-19 je pomembno upoštevati značilnosti vključenih bolnikov. Potek bolezni covid-19 je namreč zelo različen. Pri večini (80%) bolnikov je blag ali zmeren, pri 15% bolnikov hud in pri 5% kritičen (*Preglednica 2*) (23). Starejši bolniki, bolniki s kardiovaskularnimi obolenji, kronično pljučno boleznijo, hipertenzijo, diabetesom in/ali debelostjo, verjetno pa še z drugimi, ta trenutek še neznanimi dejavniki tveganja, so bolj ogroženi za zaplete bolezni covid-19 (24).

Huda oblika bolezni se navadno začne približno en teden po začetku simptomov. Najpogostejši simptom, ki napoveduje hud potek bolezni, je dispneja, ki jo velikokrat spremlja tudi hipoksemija. Presenetljiva lastnost covid-19 je hitro napredovanje respiratorne odpovedi, tudi do sindroma akutne dihalne stiske (25). Ker je razvoj hujše oblike zakasnen in težko predvidljiv, je pričetek zdravljenja ob pojavu simptomov v prvi fazi skoraj nemogoč.

Preglednica 2. Klinična klasifikacija bolezni covid-19 (26).

KLASIFIKACIJA	KLINIČNA SLIKA
Brezsimptomna	Brez simptomov.
Blaga	Blagi simptomi in znaki bolezni brez pljučnice.
Zmerna	Covid-19 pljučnica brez hipoksemije, običajno zdravljenje v bolnišnici.
Huda	Covid-19 pljučnica s hipoksemijo, praviloma zdravljenje v bolnišnici.
Kritična	Dihalna odpoved s potrebo po mehanski ventilaciji ali šok z odpovedjo organov in potrebo po zdravljenju v enoti intenzivnega zdravljenja.

Zdravljenje bolnikov s covidom-19 je odvisno od poteka bolezni, se pa standardna oskrba ne razlikuje od oskrbe ostalih bolnikov z respiratornimi virusnimi okužbami, za katere nimamo vzročnega zdravljenja. Ta lahko vključuje antipiretike, hidracijo, antibiotično zdravljenje, preprečevanje venskih tromboembolizmov, hemodinamski nadzor in prehransko podporo, vse odvisno od potreb in resnosti bolezni. Standardna oskrba covid-19 je bila predvsem v prvih izvedenih kliničnih raziskavah raznolika in je zajemala različna zdravila, ponekod tudi glukokortikoide, druge imunosupresivna in protivirusna zdravila (26). Ob hipoksemiji je nujno zdravljenje s kisikom, ki sprva poteka preko nosnega katetra ali maske. Če hipoksemija napreduje oz. se ne izboljša, je potrebno invazivno dovajanje zraka s kisikom v pljuča - mehanska ventilacija. Kadar običajne in napredne oblike invazivne mehanske ventilacije odpovejo, se poslužujemo še bolj invazivne metode za izboljšanje oksigenacije krvi - zunajtelesne membranske oksigenacije (*angl. extracorporeal membrane oxygenation; ECMO*) (27).

Bolezen covid-19 je zelo razširjena, do tega trenutka smo na svetu po uradnih podatkih prepoznali 27 milijonov bolnikov (26). Ker v začetku bolezni, ko ta običajno še ni huda in ko pričakujemo največji učinek protivirusnih zdravil, pri posameznem bolniku ne znamo napovedati, ali bo doživel hujši potek, bi morali s protivirusnimi zdravili zdraviti zelo veliko število ljudi, da bi pomembneje preprečili napredovanje bolezni (npr. do potrebe po hospitalizaciji) ali na smrtnost v populaciji. Ob pomembnem prispevku pretiranega vnetnega odgovora v patogenezi covid-19 pa bomo za uspešno zdravljenje, sploh pri huje bolnih, verjetno primorani k uporabi več zdravil hkrati (28). To pomeni, da je pomembno imeti na voljo učinkovita, a predvsem varna protivirusna zdravila.

3 UČINKOVITOST IN VARNOST REMDESIVIRJA

Protivirusno zdravilo remdesivir je prvo zdravilo, ki ga je že julija 2020 EMA odobrila za zdravljenje covid-19 pri odraslih bolnikih in mladostnikih, starejših od 12 let, s pljučnico, ki zahteva zdravljenje s kisikom (1). Pred registracijo je bilo zdravilo remdesivir na voljo v okviru programa sočutne uporabe, čeprav sprva le kritično bolnim, kasneje pa tudi bolnikom s hudim potekom bolezni covid-19, ki niso imeli dostopa do zdravila v okviru kliničnih raziskav (*Preglednica 1*) (29). Dostop do zdravila v okviru programa sočutne uporabe sicer res nudi bolniku možnost zdravljenja z remdesivirjem, vendar ne pripomore k ugotavljanju učinkovitosti in varnosti zdravila, kot je to mogoče v kliničnih raziskavah (30). V času pisanja so objavljene že štiri randomizirane klinične raziskave remdesivirja, in sicer tri proučujejo njegovo učinkovitost s kontrolno skupino, ena pa primerja učinkovitost 5-dnevnega s 10-dnevnim zdravljenjem z remdesivirjem (*Preglednica 3*) (13, 31–33).

Prva, ob koncu epidemije predčasno zaključena randomizirana, s placebom nadzorovana, dvojno slepa klinična raziskava remdesivirja pri 237 bolnikih s hudim potekom covid-19 je potekala v 10 bolnišnicah v Hubeju na Kitajskem (*Preglednica 3*) (5). Zanimivo, da so v obeh rokah poleg običajne standardne oskrbe številni bolniki prejeli tudi kortikosteroide (nad 60%), lopinavir z ritonavirjem (pod 30%) ter interferone (okoli 30%). Pričakovano je nad 70% bolnikov imelo sočasne bolezni. Med skupinama ni bilo statistično pomembne razlike niti v času do kliničnega izboljšanja, niti v smrtnosti 28 dni po začetku zdravljenja. Neželeni učinki, tako vsi (okoli 65%) kot resni (okoli 20%) so bili med skupinama primerljivi tako v vrsti kot pogostosti, brez novih varnostnih signalov zdravljenja z remdesivirjem. Raziskava je pokazala zadovoljivo varnost remdesivirja, dokončnega odgovora o učinkovitosti remdesivirja pa ne more ponuditi, saj je ob predčasnem zaključku vključevanja bolnikov in ob predpostavljenemu 6-dnevnu skrajšanju časa do kliničnega izboljšanja bolezni moč raziskave premajhna.

Bolj jasne odgovore dajejo rezultati raziskave ACTT-1 (*angl. Adaptive COVID-19 Treatment Trial*) ameriškega Nacionalnega inštituta za alergije in nalezljive bolezni (*Preglednica 3*) (31). Čeprav so bili objavljeni zgolj preliminarni rezultati, so ti botrovali k registraciji zdravila pri EMA. Na podlagi analize podatkov 1059 bolnikov, izmed katerih je večina (88%) imela vsaj hud potek bolezni, je remdesivir skrajšal čas do kliničnega izboljšanja bolezni iz 15 na 11 dni. Z nadaljevanjem vključevanja lahko pričakujemo tudi dokaz sedaj sicer samo nakazane manjše smrtnosti ob zdravljenju z remdesivirjem. V eksplorativni analizi podatkov so bile dobrobiti zdravljenja z remdesivirjem največje pri bolnikih s hudim covidom-19, ki so potrebovali zdravljenje s kisikom preko nosnega katetra, vendar niso potrebovali kisika preko obrazne maske, neinvazivne ventilacije, mehanske ventilacije ali ECMO. Raziskava ni zaznala novih varnostnih signalov remdesivirja.

Nedavno je bila zaključena tudi odprta, randomizirana klinična raziskava, ki je pri 596 bolnikih z blagim ali zmernim covidom-19 primerjala 5- in 10-dnevno zdravljenje z remdesivirjem s kontrolno skupino (33). Raziskovalci niso ugotovili značilnih razlik v kliničnem stanju na 11. dan med tistimi, ki so bili randomizirani v 10-dnevno zdravljenje z remdesivirjem ter bolniki v kontrolni skupini. Poročali so o

večjem izboljšanju kliničnega stanja bolnikov, randomiziranih v 5-dnevno zdravljenje z remdesivirjem, v primerjavi s kontrolno skupino (OR = 1,65; 95-% IZ: 1,09-2,48; $p = 0,02$), ki je sicer statistično značilno vendar ima že po avtorjevi oceni vprašljivo klinično pomembnost.

Omeniti moramo tudi raziskavo, ki je skušala ugotoviti optimalno dolžino zdravljenja z remdesivirjem s primerjavo 5- in 10-dnevnega zdravljenja z remdesivirjem (*Preglednica 3*) (32). Pri 397 bolnikih z zmernim ali hudim potekom covida-19 niso pokazali razlik v učinkovitosti krajšega ali daljšega časa zdravljenja z remdesivirjem. Ta izsledek je zelo pomemben, saj v času pandemije in velike potrebe po remdesivirju, omogoča zdravljenje večjega števila bolnikov z enako količino zdravila.

Rezultati treh randomiziranih kliničnih raziskav remdesivirja pri zdravljenju bolnikov s covidom-19 niso enoznačni. Dodatno lahko pričakujemo, glede na nedavno dokazano manjšo smrtnost bolnikov z najhujšim, kritičnim potekom covida-19 ob zdravljenju s kortikosteroidi, da bodo podatki vseh treh kliničnih raziskav remdesivirja podvrženi dodatnim analizam (2). Vse tri raziskave so namreč dovoljevale tudi zdravljenje s kortikosteroidi. Nedvomno pa je remdesivir prvo zdravilo, registrirano za zdravljenje covida-19 v Evropi, in ob pričakovanem velikem povpraševanju po zdravilu ob omejenih zalogah je pomemben dogovor med Evropsko komisijo in proizvajalcem zdravila o njegovem zagotavljanju in zaveza Evropske komisije o pravični razporeditvi zdravila med države članice (34). Na podlagi trenutno razpoložljivih podatkov in omejenih zalogah remdesivirja tuje smernice zdravljenja covida-19 priporočajo zdravljenje z remdesivirjem v dolžini 5 dni le pri bolnikih s hudim potekom covida-19, ki sicer potrebujejo zdravljenje s kisikom, ampak le preko nosnega katetra in ne bolj intenzivnega zdravljenja s kisikom preko maske, neinvazivne ventilacije, mehanske ventilacije ali ECMO (26, 35). Pri ostalih bolnikih s covidom-19 remdesivirja ne priporočajo.

4 UČINKOVITOST IN VARNOST KOMBINACIJE LOPINAVIRJA Z RITONAVIRJEM

Kombinacija lopinavirja z ritonavirjem je bila v preteklosti uporabljena v več kliničnih raziskavah bolnikov okuženih s koronavirusom SARS-CoV, sicer brez dokončnih zaključkov o njeni učinkovitosti (14). Te izkušnje so podlaga za preizkušanje lopinavirja z ritonavirjem pri novem koronavirusu SARS-CoV-2.

Preglednica 3. Randomizirane klinične raziskave (RCT) z remdesivirjem, s kombinacijo lopinavirja in ritonavirja ter s favipiravirjem pri bolnikih s covidom-19.

Avtor, revija	Načrt raziskave in kraj	Bolniki: oblika covid-19, starost ^{&} in spol	Zdravila v intervencijski (I) in primerjalni (P) skupini	Izidi in rezultati [#]	Opombe
REMDESIVIR (RDV)					
Wang Y, Lancet 2020 (13)	RCT, dvojno slepa, Kitajska	n = 237 huda oblika 65 (55–70) let 60% moških	I: 1. dan: RDV 200 mg, 1x/d, iv; ter 2.–10. dan: 100 mg, 1x/d, iv; (n = 158) P: placebo, iv; (n = 79)	Čas do KI*: 21 dni (I) vs. 23 dni (P); RR = 1,23 (95-% IZ: 0,87–1,75, p > 0,05). Smrtnost do 28. dne: 14% (I) vs. 13% (P); RD = 1,1 % (95-% IZ: -8,1–10,3%, p > 0,05)	Vključitev v povprečju 10 dni po prvih simptomih.
Beigel JH, NEJM 2020 (31)	RCT, dvojno slepa, mednarodna	n = 1059 zmerna, huda ali kritična 59 (49–69) let, 64% moških	I: 1. dan: RDV 200 mg, 1x/d, iv; ter 2.–10. dan: 100 mg, 1x/d, iv; (n = 538) P: placebo, iv; (n = 521)	Čas do KI*: 11 dni (I) vs. 15 dni (P); RR = 1,32 (95-% IZ: 1,12–1,55; p < 0,001). Smrtnost do 14. dne: 7,1% (I) vs. 12% (P); HR = 0,70 (95-% IZ: 0,47–1,04, p > 0,05)	88% bolnikov je imelo hudo ali kritično obliko covid-19. Vključitev v povprečju 9 dni po prvih simptomih.
Goldman JD, NEJM 2020 (32)	RCT, odprta, mednarodna	n = 397 zmerna ali huda oblika 61 (50–70) let 64% moških	I: 1. dan: RDV 200 mg, 1x/d, iv; ter 2.–10. dan: 100 mg, 1x/d, iv; (n = 197) P: 1. dan: RDV 200 mg, 1x/d, iv; ter 2.–5. dan: 100 mg, 1x/d, iv; (n = 200)	Čas do KI*: 11 dni (I) vs. 10 dni (P); RR = 0,79 (95-% IZ: 0,61–1,01, p > 0,05). Smrtnost do 14. dne: 11% (I) vs. 8,0% (P); razlika ni statistično značilna	Ni razlik med 5 in 10 dnevno terapijo. Nad 80% bolnikov je imelo hud covid-19. Vključitev v povprečju 8 ali več dni po prvih simptomih.
Spinner CD, JAMA 2020 (33)	RCT, odprta, mednarodna	n = 596 zmerna oblika 57 (46–66) let 61% moških	I1: 1. dan: RDV 200 mg, 1x/d, iv; ter 2.–10. dan: 100 mg, 1x/d, iv; (n = 197) I2: 1. dan: RDV 200 mg, 1x/d, iv; ter 2.–5. dan: 100 mg, 1x/d, iv; (n = 199) P: SO; (n = 200)	Boljša porazdelitev KS na 11. dan: I1 vs P: p = 0,18 I2 vs P: OR = 1,65 (95-% IZ: 1,09–2,48; p = 0,02) Delež s KI* na dan 11: 68% (I1) vs 70% (I2) vs 64% (P)	

Avtor, revija	Načrt raziskave in kraj	Bolniki: oblika covid-19, starost ^{&} in spol	Zdravila v intervencijski (I) in primerjalni (P) skupini	Izidi in rezultati [#]	Opombe
LOPINAVIR/RITONAVIR (LPV/r)					
Cao B, NEJM 2020 (36)	RCT, odprta, Kitajska	n = 199 huda oblika 58 (49–68) let 60% moških	I: LPV/r 400/100 mg 2x/d, PO, 14 dni; ter SO; (n = 99). P: SO; (n = 100)	Čas do KI*: 16 dni (I) vs. 16 dni (P); RR = 1,31 (95-% IZ: 0,95–1,8; p = 0,09) Smrtnost do 28. dne: 19% (I) vs 25% (P); RD = -5,8% (95-% IZ: -17%–5,7% p > 0,05)	Vključitev v povprečju 13 dni po prvih simptomih.
Hung IF, Lancet 2020 (37)	RCT, odprta, Hong Kong	n = 127 blaga ali zmerna oblika 52 (32–62) let 54% moških	I: LPV/r 400/100 mg 2x/d, PO, 14 dni; + RBV 400 mg 2x/d, PO, 14 dni; + INFβ1b 8M IU, sc; (n = 86) P: LPV/r 400/100 mg 2x/d, PO, 14 dni; (n = 41)	Čas do NB: 7 dni (I) vs. 12 dni (P); RR = 4,4 (95-% IZ: 1,9 – 10,2; p = 0,001) Čas do odpusta: 9 dni (I) vs. 14,5 d (P); RR = 2,7 (95-% IZ: 1,2 – 6,1; p = 0,016)	Vključitev v povprečju 5 dni po prvih simptomih.
Li Y, Cell Press 2020 (38)	RCT, 3 roke, enojno slepa, Kitajska	n = 86 blaga ali zmerna oblika 59 (49–69) let 41% moških	I1: LPV/r 400/100 mg 2x/d, PO, 7 do 14 dni; (n = 34) I2: umifenovir 200 mg 3x/d, PO, 7 do 14 dni; (n = 35) P: SO; (n = 17)	Čas do NB: 9,0 dni (I1) vs. 9,1 dni (I2) vs. 9,3 dni (P); p = 0,981; primerjava vseh treh med sabo	Ni primerjave med posameznimi rokami.
Huang M, J Mol Cell Biol 2020 (39)	RCT, odprta, Kitajska	n = 22 zmerna ali huda oblika 44 (37 – 58) let 59% moških	I: CQ 500 mg 2x/d, PO, 10 dni; (n = 10) P: LPV/r 400/100 mg 2x/d, PO, 10 dni; (n = 22)	Delež bolnikov z NB do 10. dne: 90 % (I) vs. 75% (P); RR = 1,20 (95-% IZ: 0,84 – 2,00, p>0,05)	
The Recovery Collaborative Group~ (4)	RCT, odprta, Velika Britanija	n = 4972 zmerna, huda ali kritična oblika	I: LPV/r 400/100 mg 2x/d, PO, 10 dni; (n = 1596). P: SO; (n = 3376)	Smrtnost do 28. dne: 22,1 % (I) vs 21,3 % (P); RR = 1,04; 95-% IZ: 0,91 – 1,18; p = 0,58)	74% vsaj s hudo obliko

Avtor, revija	Načrt raziskave in kraj	Bolniki: oblika covid-19, starost ^{&} in spol	Zdravila v intervencijski (I) in primerjalni (P) skupini	Izidi in rezultati [#]	Opombe
FAVIPIRAVIR (FVP)					
Chen C, MedRxiv 2020 (43)	RCT, odprta, Kitajska	n = 236 blaga, zmerna, huda ali kritična oblika 80% oseb < 65 let 47% moških	I: 1. dan: FVP 1600 mg 2x/d, PO; ter 600 mg 2x/d, 7 do 10 dni, PO; (n = 116) P: umifenovir 200 mg 3x/d, PO, 7 do 10 dni; (n = 120)	Delež bolnikov s KI ⁺ do 7. dne: 61 % (I) vs. 52 % (P); RD = 9,5% (95%- IZ: -3,1-22%; p>0,05)	88% oseb je imelo blago ali zmerno obliko covid-19.
Ivashchenko AA, Clin Inf Dis 2020 (44)	RCT, odprta, Rusija	n = 60 zmerna oblika	I1: 1. dan: FVP 1600 mg 2x/d, PO; ter 600 mg 2x/d, 14 dni, PO; (n = 20) I2: 1. dan: FVP 1800 mg 2x/d, PO; ter 800 mg 2x/d, 14 dni, PO; (n = 20) P: SO; (n = 20)	Delež bolnikov z NB do 5. dne: 63% (I1 + I2) vs. 30% (P); p = 0,018	

CQ: klorokin; INFβ1b 8M IU: interferon beta-1b v odmerku 8 milijonov mednarodnih enot največ 3-krat v prvih 7 dneh po pojavu simptomov; iv: intravensko; HR: razmerje ogroženosti; KI: klinično izboljšanje; KS: klinični status, ocenjen na 7-točkovni lestvici; NB: negativni nosno-žrelni bris; OR: razmerje obolevnosti; p: p vrednost, če je p > 0,05 je razlika statistično neznatna; PO: peroralno; RCT: randomizirana klinična raziskava; RR: razmerje okrevanja; RR: relativno tveganje; RD: razlika med deležema; RBV: ribavirin; sc: subkutano; SO: standardna oskrba; vs.: v primerjavi z; 1x/d: enkrat na dan, 2x/d: dvakrat na dan, 3x/d: trikrat na dan; 95%-IZ: 95-odstotni interval zaupanja.

[&] starost je podana kot mediana ali povprečje, v oklepaju je naveden razpon med prvim in tretjim kvartilom;

[#] statistično značilni izidi so v krepkem tisku;

*izboljšanje za 2 točki na 7-točkovni lestvici;

⁺ ne potrebuje več kisika ali podporne terapije;

~objava predhodne analize na spletni strani.

V znanstveni literaturi najdemo veliko podatkov o uporabi lopinavirja z ritonavirjem pri zdravljenju covid-19, med številnimi objavljenimi opazovalnimi in nekaj prospektivnimi randomiziranimi kliničnimi raziskavami (*Preglednica 3*) pa najbolj zanesljiv odgovor o (ne)učinkovitosti kombinacije lopinavirja z ritonavirjem, vsaj pri hospitaliziranih bolnikih, dajejo izsledki iz velikih raziskav kot sta RECOVERY in SOLIDARITY, čeprav šele predčasni in še ne objavljeni v recenzirani publikaciji (4, 20, 26, 36–39).

Med objavljenimi randomiziranimi kliničnimi raziskavami izpostavljam raziskavo Cao in sodelavcev, v kateri so pri 199 bolnikih s hudim potekom bolezni covid-19 primerjali učinkovitost lopinavirja z ritonavirjem proti placebo, ki kot prva randomizirana klinična raziskava pri bolnikih s covidom-19 sodi med najbolj odmevne objave na tem področju (36). Primarni izid študije, čas do kliničnega izboljšanja, je bil 16 dni in se med skupinama ni razlikoval. Smrtnost po 28 dnevih je bila sicer številčno nižja v intervencijski kot v kontrolni skupini (19,2% vs 25,0%), vendar ni dosegla statistične značilnosti. Neželene učinke so opisali pri skoraj polovici bolnikov v obeh skupinah, v intervencijski skupini so izstopali že znani gastrointestinalni neželeni učinki lopinavirja z ritonavirjem, kot so slabost, bruhanje in diareja, ki so botrovali k ukinitvi zdravljenja pri 13,8% bolnikih (*Preglednica 1*). Ob objavi rezultatov so številni izpostavili, da raziskava ob premajhni velikosti vzorca in pričakovanemu učinku skrajšanja časa do kliničnega izboljšanja za 8 dni ni mogla dokazati statistično značilno boljših izidov bolezni ob zdravljenju s kombinacijo lopinavirja z ritonavirjem (40, 41). Ta odgovor so dali rezultati britanske raziskave RECOVERY, čeprav šele preliminarni in objavljeni samo na spletni strani raziskave (4). Pri več kot 5000 hospitaliziranih bolnikih s covidom-19, med katerimi je večina imela hud potek bolezni, niso ugotovili razlik v smrtnosti. Slednja je bila med obema rokama primerljivo visoka, nad 20%. Na podlagi rezultatov so prenehali z vključevanjem bolnikov v zdravljenje s to kombinacijo. Do podobnih zaključkov in ukrepov so prišli tudi v raziskavi Svetovne zdravstvene organizacije SOLIDARITY (20).

Kombinacija lopinavirja z ritonavirjem je bila proučevana tudi pri bolnikih s covidom-19, ki niso bili hospitalizirani. Huang in sodelavci so v randomizirani klinični raziskavi pri 127 bolnikih z blagim ali zmernim potekom bolezni covid-19 primerjali sočasno uporabo treh zdravil, in sicer interferona β -1b, lopinavirja z ritonavirjem in ribavirina, proti lopinavirju z ritonavirjem (37). Ob zmerni protivirusni aktivnosti kombinacije lopinavirja z ritonavirjem je bila ta že v preteklih epidemijah z novimi koronavirusi SARS-CoV in MERS-CoV uporabljena sočasno z drugimi protivirusnimi učinkovinami, kot so nukleozidni analog ribavirin in interferoni α in β , kar je bil osnovni razmislek pri zasnovi te raziskave (14). V intervencijski skupini je bil čas do negativnega nosno-žrelnega brisa za SARS-CoV-2 bistveno, za 5 dni, krajši kot v primerjalni skupini in posledično so bili tudi 5,5 dni prej odpuščeni iz bolnišnice. Obe razliki sta se ohranili samo v podskupini 76 bolnikov, ki so bili vključeni v 7 dneh od pojava simptomov bolezni in so zato v intervencijski skupini prejeli interferon β -1b. Po 7. dnevu od pojava prvih simptomov bolezni interferona β -1b namreč niso uporabljali zaradi možnega negativnega vpliva njegovega provnetnega delovanja na kasnejši potek bolezni. Skoraj polovica bolnikov v obeh skupinah je imela neželene učinke zdravljenja, predvsem za kombinacijo lopinavirja z ritonavirjem značilno

slabost (približno tretjina bolnikov) in diarejo (okoli 40% bolnikov), ki niso zahtevali prekinitve zdravljenja in so bili med skupinama primerljivi. Seveda pa ob relativno majhnemu številu 52 bolnikov, ki so prejeli vsa tri zdravila, so zaključki o varnosti njihove sočasne uporabe še nedokončni. Ob navdušenju nad zelo pozitivnimi rezultati dobro zasnovane raziskave se seveda postavlja vprašanje, ali se bo dokazana učinkovitost pretvorila tudi v pomembnejše klinične izide, kot so napredovanje bolezni do hude ali kritične oblike in nenazadnje smrtnost, ki bi upravičevali izpostavljanje bolnikov relativno visokemu tveganju za neželene učinke zdravljenja.

Na podlagi trenutno dostopnih podatkov strokovnjaki odsvetujejo uporabo zdravila v redni klinični praksi (24, 26).

5 UČINKOVITOST IN VARNOST FAVIPIRAVIRJA

Favipiravir je od leta 2014 na Japonskem registrirano kot zdravilo za zdravljenje gripe (*Preglednica 1*) (27). Ker pa je njegove uporaba omejena le na posamezne podtipе virusa influence in le v posebnih okoliščinah bolezni, je kliničnih izkušenj s favipiravirjem relativno malo. Na podlagi kliničnih raziskav pri bolnikih z gripo in pri bolnikih z ebolo je varnostni profil favipiravirja ugoden (28). Med neželenimi učinki prevladujejo blage gastrointestinalne težave in asimptomatskimi dvigi sečne kisline, zdravljenje pa le redko, pri 1% bolnikov, zahteva prekinitve. Izpostaviti je potrebno teratogenost favipiravirja, ki zahteva izključitev nosečnosti pred uporabo in strogo kontracepcijo v in po času zdravljenja.

Dokazi o učinkovitosti favipiravirja pri bolnikih s covidom-19 so trenutno omejeni na tri klinične raziskave. Prva, v slovenskih medijih zelo odmevna, je objava majhne kohortne raziskave Cai in sodelavcev pri 80 bolnikih z blagim ali zmernim covidom-19 (42). Ker raziskava ni bila randomizirana, lahko poročani rezultati s krajšim trajanjem kužnosti ob zdravljenju s favipiravirjem v primerjavi s kombinacijo lopinavirja z ritonavirjem služijo le kot hipoteza in je zato ne opisujemo bolj podrobno. Bolj zanesljive zaključke lahko potegnemo iz druge, čeprav še nerecenzirane, objave randomizirane klinične raziskave Chena in sodelavcev (43). Raziskava je pri 236 bolnikih z diagnosticirano covid-19 pljučnico primerjala favipiravir z umifenovirjem, ki se v Rusiji in na Kitajskem uporablja za zdravljenje gripe. Delež bolnikov, pri katerih je v 7 dneh po vključitvi prišlo do kliničnega izboljšanja, se med skupinama ni razlikoval. Izboljšanje so dokazali le pri podskupini bolnikov brez kritičnega poteka bolezni, ki sicer predstavlja skoraj 90% vseh vključenih (71% vs 56%; $p = 0.0199$). Pred kratkim je bila objavljena še druga randomizirana klinična raziskava s kontrolno skupino, ki je na majhni skupini 60 bolnikov z zmernim potekom covida-19 poročala o večjem deležu bolnikov z negativnim brisom 5. dan po randomizaciji v skupini, ki je prejela favipiravir (44). V zaključku avtor izpostavi, da so ti rezultati podlaga za dodelitev pogojnega dovoljenja za promet favipiravirju v Rusiji. Tolmačenje teh izsledkov zahteva previdnost, ker je podajanje statističnih planov analiz, podatkov in rezultatov skopo. Podobno razlago razpoložljivih dokazov podaja tudi SZO, ki se ni odločila za vključitev favipiravirja v klinično preskušanje SOLIDARITY (45).

6 UČINKOVITOST IN VARNOST KLOROKINA IN HIDROKSIKLOROKINA

Teoretične domneve o možnem ugodnem učinku klorokina in hidroksiklorokina, zdravil za zdravljenje malarije in revmatoidnega artritisa, za zdravljenje bolezni covid-19 slonijo na njegovem širokem protivirusnem in protivnetnem delovanju (46). Kljub *in vitro* dokazom mnogoterih protivirusnih učinkov se v kliničnih raziskavah nista izkazala kot učinkoviti zdravili pri različnih virusnih obolenjih (47–49). Ta trenutek je objavljenih že več zelo velikih, ne le opazovalnih, ampak tudi randomiziranih kliničnih raziskav, ki niso dokazale dobrobiti (hidroksi)klorokina ne pri preprečevanju covid-19, ne pri zdravljenju tako ambulantnih kot hospitaliziranih bolnikov s covidom-19 (*Preglednica 4*). Ti dokazi so izpodrinili pretirano navdušenje nad začetnimi opazovalnimi raziskavami in široko uporabo (hidroksi)klorokina za zdravljenje covid-19 tudi izven kliničnih preizkušanj. Kljub skopim dokazom metodološko slabih začetnih opazovalnih raziskav zdravljenja covid-19 s (hidroksi)klorokinom, jih v nadaljevanju opisujemo zaradi nauka, ki nam ga daje neprimeren odziv ne le laične in politične javnosti, ampak tudi strokovne in znanstvene.

6.1 Prve majhne opazovalne raziskave

O poročilu glede učinka hidroksiklorokina z azitromicinom Gautreta s sodelavci bomo razpravljali zgolj zato, ker je močno odmevalo tako v laični kot strokovni, in celo politični javnosti, saj je raziskava tako pomanjkljiva, da ne bi smela vzbuditi nikakršnega zanimanja znanstvene in strokovne skupnosti. Izsledki nerandomizirane raziskave na 36 ljudeh so bili na videz zelo dobri. Zdravljenje s kombinacijo hidroksiklorokina z azitromicinom (v primerjavi s samim hidroksiklorokinom ali kontrolno roko brez zdravil) je pri vseh bolnikih že v 6 dneh povzročilo negativni izvid nosno-žrelnega brisa za RNA SARS-CoV-2. Dogodki, ki so sledili, so v nasprotju s tem, kar bi pričakovali po racionalnem razmisleku v stroki in biomedicinski znanosti. Delo je bilo kljub hudim pomanjkljivostim v rekordnem času sprejeto v objavo v revijo *International Journal of Antimicrobial Agents*, v kateri je soavtor dotičnega članka glavni urednik. Predvsem na spletu (in ne v znanstvenih revijah) so različni avtorji secirali metodologijo dela in izpostavili npr., da so bili brez komentarjev v rezultatih izpuščeni izsledki za 6 bolnikov (vsi so prejeli bodisi hidroksiklorokin bodisi kombinacijo), od katerih so bili trije premeščeni na intenzivni oddelk, eden pa je umrl. O še drugih pomanjkljivostih raziskave se zainteresirani bralec o njih lahko izdatno pouči preko spodaj navedenih sklicev (50, 51).

Sledil je razmah uporabe samega hidroksiklorokina in kombinacije po vsem svetu, o čemer pričajo podatki o povečanju predpisovanja in izdaji zdravila, v ZDA za neverjetnih 2000% (52). Na to so se agencije za zdravila odzvale s prepovedjo predpisovanja in izdaje klorokina, hidroksiklorokina in azitromicina za indikacijo covid-19 na recept, v bolnišničnem okolju pa so dovolile le uporabo v kliničnih raziskavah ali nacionalnih programih za izredno uporabo za zdravljenje covid-19 (53).

6.2 Velike opazovalne kohortne raziskave

Po razmahu epidemije v ZDA smo dočakali objavo velikih, dobro načrtovanih in izvedenih opazovalnih raziskav zdravljenja covid-19 s (hidroksi)klorokinom, v katerih so se avtorji posluževali sofisticiranih statističnih metod za zmanjšanje tveganja za pristranskost zaradi neintervencijske zasnove raziskave in tako nadomestiti takratno pomanjkanje dokazov iz prospektivnih randomiziranih kliničnih raziskav (*Preglednica 4*) (17, 18). Z izvedbo velikih opazovalnih kohortnih raziskav namreč lahko dobimo vpogled v dokaze o učinkovitosti v realnem okolju. Tak tip raziskav temelji na analizi elektronskih podatkov o zdravljenju bolnikov, ki jih pridobimo ob redni zdravstveni obravnavi. Kohorte predstavljajo skupine bolnikov z različnimi načini zdravljenja, tako novejšimi kot tudi z že uveljavljenimi načini. Tukaj se pojavi vprašanje, ali imajo bolniki v posameznih kohortah na začetku raziskave primerljive lastnosti. V tem delu so randomizirane klinične raziskave v veliki prednosti, saj randomizacija intervencije pri zdravljenju bolnikov zagotavlja primerljivost med skupinami in s tem relevantnost rezultatov raziskave. To se v določeni meri lahko zagotovi tudi v velikih kohortnih raziskavah, in sicer z uporabo statističnih modelov z upoštevanjem velikega števila spremenljivk, ki odražajo lastnosti bolnikov. Na tak način lahko kohortne raziskave, če so podatki anonimizirani, ustrezno zbrani in transparentno obdelani, uporabimo za proučevanje izidov, za katere npr. še nimamo rezultatov kliničnih preskušanj ali jih sploh ne pričakujemo. Dokaz pomembnosti pravilnega in transparentnega zbiranja in obdelave podatkov, ki je morda še večji izziv v retrospektivnih opazovalnih raziskavah, imamo tudi pri covidu-19, pri katerem sta dve taki raziskavi, objavljeni v odmevnih znanstvenih revijah, bili umaknjeni ravno zaradi tega vzroka (54, 55).

Nobena izmed teh dveh velikih opazovalnih kohortnih raziskav ni opisala boljših izidov bolezni covid-19 ob zdravljenju s (hidroksi)klorokinom, ravno obratno, pri nekaterih raziskavah so zaznali pomembne varnostne signale. V raziskavi Rosenberga s sodelavci so pri bolnikih, zdravljenih s (hidroksi)klorokinom, ugotovili več kot dvakrat večje tveganje za srčni zastoj v primerjavi z bolniki, ki zdravila niso prejeli (17). Srčni zastoj so zabeležili pri nezanemarljivem 15% bolnikov, ki so prejeli kombinacijo hidroksiklorokina in azitromicina. Vendarle pa opozarjamo, da je bila to skupina zelo bolnih ljudi s 25% bolnišnično smrtnostjo, ki je dvakrat večja kot pri kontrolni skupini. Večja pogostost srčne toksičnosti (hidroksi)klorokina, ki se kaže z upočasnjeno depolarizacijo in povečanjem tveganja za prekatne aritmije, je ob akutni uporabi, predvsem višjih odmerkov zdravila pri bolj bolnih ljudeh, kot so bolniki s covidom-19, pričakovana (56). To so namreč bolniki z večjo prevalenco strukturnih srčnih bolezni, pa tudi drugih dejavnikov tveganja za aritmije, npr. hipoksemijo, elektrolitskih motenj, akutno ledvično odpovedjo, ki povzroči kopičenje obeh zdravil, akutno kardiomiopatijo itd. (57, 58). Dokazana je tudi večja srčna toksičnost in celo smrtnost pri uporabi višjih (600 mg x2/dan) v primerjavi z nižjimi odmerki klorokina pri bolnikih s hudo obliko covid-19 (56). Zaradi pogoste sočasne uporabe z makrolidi velja omeniti, da so tudi slednji učinkovine z znanimi aritmogenimi lastnostmi (58). To pomeni, da vseh srčnih dogodkov, ki so jih opisali Rosenberg in sodelavci, z veliko verjetnostjo ne moremo pripisati zgolj zdravilom, je pa seveda ocena srčne varnosti (hidroksi)klorokina pri bolnikih s covidom-19 toliko pomembnejša. Pričakovano so po

objavi teh rezultatov številne komisije za nadzor varnosti v posamezni klinični raziskavi zahtevale začasno zaustavitev vključevanja bolnikov v skupino, zdravljeno s (hidroksi)klorokinom. Po predčasni analizi podatkov so izključili pomembne varnostne zadržke in so z raziskavami nadaljevali (20, 21).

6.3 Prospektivne randomizirane klinične raziskave

Vloga (hidroksi)klorokina pri preprečevanju in zdravljenju covid-19 je veliko jasnejša po objavi več randomiziranih kliničnih raziskav, ki niso dokazale dobrobiti zdravljenja s (hidroksi)klorokinom (*Preglednica 4*). V nadaljevanju omenjamo štiri najpomembnejše raziskave.

Profilaktično 5-dnevno zdravljenje s hidroksiklorokinom ni zmanjšalo verjetnosti pojava covid-19 pri ljudeh, izpostavljenim bližnjemu stiku z bolnikom s potrjenim covidom-19 (6). Ob zelo omejeni dostopnosti do testiranja SARS-CoV-2 v času poteka raziskave je bil izid bolezni covid-19 določen na podlagi poročanja udeležencev o simptomih bolezni in le pri 3% udeležencev so opravili nosno-žrelni bris za RNA SARS-CoV-2. Ob izvajanju raziskave brez študijskih obiskov bolnikov je bil začetek zdravljenja s hidroksiklorokinom v povprečju 3 ali več dni po stiku z bolnikom, kar je za profilaktično zdravljenje pozno, in tudi spremljanje neželenih učinkov je bilo omejeno le na tiste, ki so bili poročani s strani udeležencev, kar ni omogočalo strukturiranega spremljanja npr. srčne varnosti. Ob pogostih, sicer blagih neželenih učinkih pri 40% udeležencev intervencijske skupine je bila adherenca, kljub kratkotrajnem 5-dnevnom zdravljenju, nizka in le okoli 75%. Trenutno so v teku še številne druge raziskave profilaktičnega zdravljenja s (hidroksi)klorokinom.

Zdravljenje s hidroksiklorokinom ni pripomoglo k boljšim kliničnim izidom ne pri bolnikih z blago, zmerno, hudo ali kritično obliko bolezni covid-19 (3, 5, 7). V raziskavi Skipperja in sodelavcev s 491 ambulantnimi bolniki z blago obliko covid-19, potrjeno z nosno-žrelnim brisom za RNA SARS-CoV-2 le pri 58% bolnikih, zdravljenje s hidroksiklorokinom ni pripomoglo k izboljšanju simptomov bolezni v primerjavi s placebom (izboljšanje za 2,60 točk ob hidroksiklorokinu in 2,33 točk v kontrolni skupini točk na 10-točkovni lestvici ocenjevanja). Ob vključitvi relativno mlajših bolnikov (mediana starosti 40 let), večina (okoli 70%) brez komorbidnosti je bilo pričakovano število hospitalizacij majhno, 4 v intervencijski skupini in 10 v kontrolni skupini ($p = 0,29$). Podobno kot v predhodni raziskavi profilaktične uporabe hidroksiklorokina je okoli 40% bolnikov v intervencijski skupini, dvakrat več kot v kontrolni, poročalo o neželenih učinkih, ki so bili večinoma blagi. Tudi ta raziskava je bila izvedena brez študijskih obiskov in so zato varnostni podatki omejeni na tiste, ki so jih poročali bolniki.

Podobno so ugotovili Cavalcanti in sodelavci pri uporabi hidroksiklorokina z ali brez azitromicina pri 665 nekoliko bolj bolnih, hospitaliziranih bolnikih z blago ali zmerno obliko covid-19 (5). V vseh treh rokah se je klinični status bolnikov, ocenjen s 7-stopenjsko lestvico, na 15. dan izboljšal za 1 stopnjo, brez statistično značilnih razlik med skupinami. Bolniki v intervencijskih skupinah so imeli več neželenih učinkov, zvišanja jetrnih transaminaz in podaljšanja intervala QTc.

Verjetno najpomembnejši so izsledki velike raziskovalne platforme RECOVERY, čeprav so trenutno objavljeni še v nerecenzirani obliki (3). V primerjavo so vključili 4716 hospitaliziranih bolnikov, 76% bolnikov je imelo najmanj hudo obliko covid-19. Zdravljenje s hidroksiklorokinom ni vplivalo na nobenega od spremljanih izidov: ne na smrtnost, ki je bila v obeh skupinah velika (25% umrlih do 28. dne), ne na delež odpuščenih ali tistih s poslabšanjem bolezni do kritične oblike, ki zahteva zdravljenje na enoti intenzivne terapije. Varnostni rezultati so pomirjujoči, saj niso poročali o večjemu številu motenj srčnega ritma ob zdravljenju s hidroksiklorokinom. Ob jasnem dokazu odsotnosti dobrobiti hidroksiklorokina so v raziskavi RECOVERY ustavili vključevanje v roko s hidroksiklorokinom. Do podobnih zaključkov in posledične ukinitve roke zdravljenja s hidroksiklorokinom so prišli tudi v raziskavi SOLIDARITY Svetovne zdravstvene organizacije (20).

Objava teh kliničnih raziskav je s ponujenimi dokazi umaknila (hidroksi)klorokin iz nabora zdravil za zdravljenje covid-19 v redni klinični praksi. Še več, nekatere smernice zdravljenja ne odsvetujejo njegove uporabe le v redni klinični praksi, temveč tudi v okviru kliničnih raziskav na bolnikih, za katere imamo že dovolj zanesljive dokaze o njegovi neučinkovitosti, npr. pri hospitaliziranih bolnikih s covidom-19 (26). Nekaj večjih raziskovalnih platform je tako zaradi neučinkovitosti tudi predhodno zaključilo vključevanje v roko s hidroksiklorokinom (3, 20).

7 SKLEP

S pomočjo dobro načrtovanih randomiziranih kliničnih raziskav s kontrolno skupino, izvedenih v izjemnih razmerah pandemije, imamo danes več odgovorov o učinkovitih in varnih načinih zdravljenja covid-19. Pri EMA je tako registrirano zdravilo za zdravljenje covid-19, remdesivir. Za kombinacijo lopinavirja z ritonavirjem in predvsem za (hidroksi)klorokin, ki je bil v začetku pandemije ne le glasno opevan, ampak tudi množično predpisovan, danes vemo, da niso učinkovita pri zdravljenju covid-19, vsaj ne pri hospitaliziranih bolnikih. O učinkovitosti favipiravirja imamo manj podatkov, saj ni vključen v večje raziskovalne platforme. Široko uporabo zdravil morajo podpirati izsledki dovolj velikih kliničnih raziskav, to pa mora veljati ne le na papirju in v priporočilih raznih združenj ter organizacij, temveč tudi v vsakodnevni klinični praksi.

Preglednica 4. Randomizirane klinične raziskave in večje opazovalne raziskave s klorokinom (CQ) in hidroksiklorokinom (HCQ) pri bolnikih s covidom-19.

Avtor, revija	Načrt raziskave in kraj	Bolniki	Zdravila v intervencijski (I) in primerjalni (P) skupini ali kohortah (K)	Izidi in rezultati	Opombe
RANDOMIZIRANE KLINIČNE RAZISKAVE					
Chen J, MedRxiv 2020(60)	RCT, Kitajska	n = 30 nabor bolnikov ni opisan	I: HCQ 400 mg 1/d, PO, 5 dni; (n = 15) P: SO (n=15)	Delež bolnikov z NB do 7. dne: 87 % (I) vs. 93 % (P); p>0,05	V kitajščini, dostopen zgolj povzetek.
Chen Z, MedRxiv 2020 (61)	RCT, odprta, Kitajska	n = 62 zmerna oblika bolezni 44 (SD: 15) let 47% moških	I: HCQ 200mg 2x/d, PO, 5 dni; (n = 31) P: SO (n=31)	Čas do normalne TT: 2,2 dni (I) vs 3,2 dni (P) p>0,05 Izboljšanje pljučnice na CT do 6. dne: 80% (I) vs. 55% (P)	Nejasno poročanje o izidih, neustrezne statistične metode in drugo, zato nezanesljiv rezultat (62).
Tang W, BMJ 2020(12)	RCT, odprta, Kitajska	n = 150 blaga, zmerna ali huda 46 (SD: 15) let 55% moških	I: 1.-3. dan: HCQ 1200 mg 1/d, PO; ter 4.-21. dan: HCQ 800 mg 1/d, PO; (n = 75) P: SO (n = 75)	Delež bolnikov z NB do 28. dne: 85% (I) vs. 81% (P); RD = 4,1% (95-% IZ: -10,3-18,5) Čas do NB: 8 dni (I) vs. 7 dni (P); p>0,05 progres pljučnice (CT): 33% vs 47% RR = 0,85 (95-% IZ: 0,58-1,23; p = 0,34)	Predčasno zaključena, zato ne poročajo prvotno načrtovanih primarnih izidov in je zanesljivost zaključkov manjša.
Boulware DR; NEJM 2020 (6)	RCT, slepa, ZDA in Kanada	n = 821 Brez bolezni, izpostavljeni okuženim osebam 40 (33 – 50) let 48% moških	I: 1. dan: HCQ 800 mg ob 0 h in 600 mg 6-8 h, PO, ter 2.- 5. dan: HCQ 600 mg x1/d, PO; (n = 414) P: placebo (n = 407)	Incidenca covid-19: 12% (I) vs. 14% (P); RD: -2,4% (95-% IZ: -7,0 – 2,2; p = 0,35); Neželeni učinki: 40% (I) vs 17% (P); p < 0,001	Pod 3% opravljen nosno-žrelni bris. Pozen začetek zdravljenja: večina ≥ 3 d.
Cavalcanti AB, NEJM 2020 (5)	RCT, odprta, multicentrična v Braziliji	n = 665 Blaga ali zmerna bolezen 50 (SD: 14) let 58% moških	I1: HCQ 400 mg x2/dan, PO, 7 dni; (n = 221) I2: HCQ 400 mg x2/dan, PO, + AZT 500 mg x1/dan, PO, 7 dni; (n = 217) P: SO (n=227)	KS na 15. dan: 1 (I1) vs 1 (I2) vs 1 (P) I1 vs P: OR = 1,21 (95-% IZ: 0,69-2,11; p = 1,00) I2 vs P: OR = 0,99 (95-% IZ: 0,57 – 1,73; p = 1,00).	Ob vključitvi dovoljeno zdravljenje s kisikom, vendar ne več kot v nizkem pretoku.

Avtor, revija	Načrt raziskave in kraj	Bolniki	Zdravila v intervencijski (I) in primerjalni (P) skupini ali kohortah (K)	Izidi in rezultati	Opombe
Skipper CP, Ann Intern Med 2020 (7)	RCT, dvojno slepa, ZDA in Kanada	n = 491 Blaga bolezen 40 (32-50) let 44% moških	I: 1. dan: HCQ 800 mg ob 0 h in 600 mg 6-8 h, PO, ter 2.- 5. dan: HCQ 600 mg x1/d, PO; (n =) P: placebo (n =)	Izboljšanje simptomov na 14. dan*: -2,60 (I) vs -2,33 (P); p = 0,117. Neželeni učinki: 43% (I) vs 22% (P); p < 0,001	Samo 58% opravljen nosno-žrelni bris.
The Recovery Collaborative Group, MedRxiv, 2020 (3)	RCT, odprta. Velika Britanija	n = 4.716 zmerna, huda, kritična 65 (SD: 15) let 62% moških	I: 1. dan: HCQ 800 mg ob 0 h in 6h, 400 mg ob 12 h, PO, ter 2.-10. dan: HCQ 400 mg x2/d, PO; (n = 1.561) P: SO (n = 3.155)	Smrtnost do 28. dne: 27% (I) vs 25 % (P); RR = 1,09 (95-% IZ: 0,96 - 1,23 p = 0.18) Delež odpuščenih do 28. dne: 60% (I) vs 63% (P); RR = 0,92 (95-% IZ: 0,85 - 0,99) Delež s poslabšanjem do kritične oblike ali smrti do 28. dne: 30% (I) vs 27 % (P); RR = 1,12 (95-% IZ: 1,01 - 1,25)	76% bolnikov s hudo ali kritično obliko.
VEČJE OPAZOVALNE RAZISKAVE					
Rosenberg ER, JAMA 2020 (17)	retrospektivna kohortna, multicentrična znotraj ZDA	n = 1.438, hospitalizirani s COVID-19	K1*: HCQ+AZT: 61 let, 62 % moških; n = 735 K2*: HCQ: 66 let, 58% moških; n = 271 K3*: AZT: 62 let, 64% moških; n = 211 K4: brez HCQ ali AZT: 64 let, 50% moških; n = 221	Čas do smrti K1 vs. K4: HR = 1,08 (95-% IZ: 0,76-2,40) K2 vs. K4: HR = 1,08 (95-% IZ: 0,63-1,85) K3 vs. K4: HR = 0,56 (95-% IZ: 0,26-1,21) K2 vs. K3: HR = 1,92 (95-% IZ: 0,99-3,74) Pojavnost srčnega zastoja: K1 vs. K4: OR = 2,13 (95-% IZ: 1,12-4,05) K2 vs. K4: OR = 1,91 (95-% IZ: 0,96-3,81) K3 vs. K4: OR = 0,64 (95-% IZ: 0,27-1,56) K2 vs. K3: OR = 2,97 (95-% IZ: 1,56-5,64)	V celotni skupini 20% smrtnost, kar nakazuje hud potek bolezni.
Geleris J, NEJM 2020 (18)	retrospektivna, kohortna, en center v ZDA	n = 1.376, hospitalizirani s covid-19	K1: 1.dan: HCQ 600 mg 2x/d, PO, ter 2.-5. dan: HCQ 400 mg 2x/d, PO; 63 % nad 60 let; 58 % moških; (n = 811) ^{\$} K2: brez HCQ: n = 274 ^{&,\$}	Čas do mehanske ventilacije ali smrti ⁺ : HR = 1,04 (95-% IZ: 0,82- 1,32)	V celotni skupini pri 25% potrebo po mehanski ventilaciji ali smrt. Uporabili so več statističnih modelov s podobnimi rezultati.

AZT: azitromicin; TT: telesna temperatura; SO: standardna obravnava; SD: standardna deviacija; 95-% IZ: 95% interval zaupanja; HR: razmerje ogroženosti; KS: klinični status, ocenjen na 7-točkovni lestvici; NB: negativni nosno-žrelni bris; OR: razmerje obetov; RR: razmerje okrevanja; RR: relativno tveganje; RD: razlika med deležema.

*90% bolnikov prejeli d1: 400 mg HCQ 2x/dan, po +/- 500 mg azitro 1x/dan, po/iv; d2-3: 200mg HCQ 2x/dan, po +/- 250 mg azitro 1x/dan, po;

#prilagojena za spol, starost (<65 vs. ≥65 let), sladkorna bolezen, kronična pljučna bolezen, srčno-žilna bolezen, spremembe na slikovnih preiskavah pljuč;

§sočasno lahko prejeli azitro (I: 60 %, P: 37 %), tocilizumab (I: 7,2%, P: 3,3%), remdesivir (I: 2,7%, P: 1,8%);

+prilagojeno za spol, kronična pljučna bolezen, indeks telesne sestave ter dodatno za starost, raso, etnično skupino, zavarovalnim statusom, kadilskim statusom, komorbidnosti, sočasna zdravila, vitalnimi znaki in laboratorijskimi izvidi ob sprejemu;

& v eni izmed statističnih modelov so izbrali samo tiste osebe, ki so podobne osebam v kohorti 1, zato je število vključenih manjše od razlike do 1376 oseb.

°Poročanje o simptomih covid-19 s strani udeležencev z ali brez dokazane okužbe s SARS-CoV-2.

•Ocenjeno z 10-stopenjsko lestvico, kjer 0 = odsotnost simptomov, 10 = najhujši simptomi.

8 LITERATURA

1. Evropska agencija za zdravila. European Public Assessment Reports [Internet]. [cited 2020 Aug 29]. Available from: www.ema.europa.eu
2. The RECOVERY Collaborative Group. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19 – Preliminary Report. N Engl J Med [Internet]. 2020 Jul 17;NEJMoa2021436. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa2021436>
3. Horby P, Mafham M, Linsell L, Bell JL, Staplin N, Emberson JR, et al. Effect of Hydroxychloroquine in Hospitalized Patients with COVID-19: Preliminary results from a multi-centre, randomized, controlled trial. medRxiv [Internet]. 2020;2020.07.15.20151852. Available from: <https://doi.org/10.1101/2020.07.15.20151852>
4. The RECOVERY Collaborative Group. Statement from the Chief Investigators of the Randomised Evaluation of COVid-19 thERapY (RECOVERY) Trial on lopinavir-ritonavir, 29 June 2020 [Internet]. Vol. 20. 2020 [cited 2020 Aug 29]. p. 98–9. Available from: www.recoverytrial.net/results/lopinavar-results
5. Cavalcanti AB, Zampieri FG, Rosa RG, Azevedo LCP, Veiga VC, Avezum A, et al. Hydroxychloroquine with or without Azithromycin in Mild-to-Moderate Covid-19. N Engl J Med. 2020;
6. Boulware DR, Pullen MF, Bangdiwala AS, Pastick KA, Lofgren SM, Okafor EC, et al. A Randomized Trial of Hydroxychloroquine as Postexposure Prophylaxis for Covid-19. N Engl J Med. 2020;383(6):517–25.
7. Skipper CP, Pastick KA, Engen NW, Bangdiwala AS, Abassi M, Lofgren SM, et al. Hydroxychloroquine in Nonhospitalized Adults With Early COVID-19. Ann Intern Med. 2020;1–10.
8. Freedman B. Equipoise and the ethics of clinical research. NEJM. 1987;317:141–5.
9. Rome BN, Avorn J. Drug Evaluation during the Covid-19 Pandemic. N Engl J Med. 2020 Apr 14;NEJMp2009457.
10. Eichler H, Cavaleri M, Enzmann H, Scotti F, Sepodes B, Sweeney F, et al. Clinical trials for Covid-19: can we better use the short window of opportunity? Clin Pharmacol Ther. 2020 May 14;cpt.1891.
11. Kalil AC. Treating COVID-19—Off-Label Drug Use, Compassionate Use, and Randomized Clinical Trials During Pandemics. JAMA. 2020 May 19;323(19):1897.
12. Tang W, Cao Z, Han M, Wang Z, Chen J, Sun W, et al. Hydroxychloroquine in patients with mainly mild to moderate coronavirus disease 2019: open label, randomised controlled trial. Bmj. 2020;(April):m1849.
13. Wang Y, Zhang D, Du PG, Du PR, Zhao PJ, Jin PY, et al. Remdesivir in adults with severe COVID-19: a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. Lancet. 2020;6736(20):1–10.
14. Stockman LJ, Bellamy R, Garner P. SARS: Systematic Review of Treatment Effects. PLoS Med. 2006;3(9):e343.
15. Sorbello A, Jones SC, Carter W, Struble K, Boucher R, Truffa M, et al. Emergency Use Authorization for Intravenous Peramivir: Evaluation of Safety in the Treatment of Hospitalized Patients Infected With 2009 H1N1 Influenza A Virus. Clin Infect Dis. 2012 Jul 1;55(1):1–7.
16. Gautret P, Lagier J, Parola P, Hoang VT, Meddeb L, Mailhe M, et al. Hydroxychloroquine and azithromycin as a treatment of COVID-19: results of an open-label non-randomized clinical trial. Int J Antimicrob Agents. 2020 Mar;105949.
17. Rosenberg ES, Dufort EM, Udo T, Wilberschied LA, Kumar J, Tesoriero J, et al. Association of Treatment With Hydroxychloroquine or Azithromycin With In-Hospital Mortality in Patients With COVID-19 in New York State. Jama. 2020;12203:1–10.
18. Geleris J, Sun Y, Platt J, Zucker J, Baldwin M, Hripcsak G, et al. Observational Study of Hydroxychloroquine in Hospitalized Patients with Covid-19. N Engl J Med. 2020 May 7;NEJMoa2012410.
19. Lane HC, Fauci A. Research in the Context of a Pandemic. N Engl J Med. 2020;1–2.
20. Svetovna, Zdravstvena, Organizacija. Solidarity clinical trial for Covid treatment [Internet]. [cited 2020 May 20]. Available from: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/global-research-on-novel-coronavirus-2019-ncov/solidarity-clinical-trial-for-covid-19-treatments>

21. RECOVERY randomised evaluation of COVID-19 therapy [Internet]. [cited 2020 Aug 29]. Available from: www.recoverytrial.net
22. Bhimraj A, Morgan R, Hirsh Shumaker A, Laverigne V, Baden L, Cheng V et al. Infectious Diseases Society of America guidelines on the treatment and management of patients with COVID-19 [Internet]. 2020 [cited 2020 May 22]. Available from: www.idsociety.org/COVID19guidelines
23. Lian J, Jin X, Hao S, Cai H, Zhang S, Zheng L, et al. Analysis of Epidemiological and Clinical Features in Older Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outside Wuhan. *Clin Infect Dis*. 2020 Mar 25;44(8):085201.
24. Gandhi RT, Lynch JB, del Rio C. Mild or Moderate Covid-19. Solomon CG, editor. *N Engl J Med*. 2020 Apr 24;NEJMcp2009249.
25. Berlin DA, Gulick RM, Martinez FJ. Severe Covid-19. *N Engl J Med*. 2020 May 15;NEJMcp2009575.
26. National Institute of Health. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines [Internet]. [cited 2020 Aug 29]. Available from: <https://covid19treatmentguidelines.nih.gov>
27. Jurekovič V. Osnovni principi mehanske ventilacije, konvencionalne oblike. In: Miha Mežnar, Primož Gradišek GM, editor. ŠOLA intenzivne medicine 2017 : 1 letnik : mehanska ventilacija in hemodinamska nestabilnost. Ljubljana, Slovenija: Slovensko združenje za intenzivno medicino : Katedra za anesteziologijo in reanimatologijo, Medicinska fakulteta; 2017.
28. Gaborit BJ, Bergmann J-F, Mussini C, Arribas JR, Behrens G, Walmsley S, et al. Plea for multitargeted interventions for severe COVID-19. *Lancet Infect Dis*. 2020 Apr;(January):19–20.
29. Zdravila E agencija za. EMA recommends expanding remdesivir compassionate use to patients not on mechanical ventilation [Internet]. 2020 [cited 2020 May 11]. Available from: www.ema.europa.eu
30. Grein J, Ohmagari N, Shin D, Diaz G, Asperges E, Castagna A, et al. Compassionate Use of Remdesivir for Patients with Severe Covid-19. *N Engl J Med*. 2020 Apr 10;NEJMoa2007016.
31. Beigel JH, Tomashek KM, Dodd LE, Mehta AK, Zingman BS, Kalil AC, et al. Remdesivir for the Treatment of Covid-19 - Preliminary Report. *N Engl J Med*. 2020;1–12.
32. Goldman JD, Lye DCB, Hui DS, Marks KM, Bruno R, Montejano R, et al. Remdesivir for 5 or 10 Days in Patients with Severe Covid-19. *N Engl J Med*. 2020 May 27;NEJMoa2015301.
33. Spinner CD, Gottlieb RL, Criner GJ, Arribas López JR, Cattelan AM, Soriano Viladomiu A, et al. Effect of Remdesivir vs Standard Care on Clinical Status at 11 Days in Patients With Moderate COVID-19: A Randomized Clinical Trial. *Jama* [Internet]. 2020;94404. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32821939>
34. Komisija E. European Commission secures EU access to Remdesivir for treatment of. 2020;(July):2020.
35. Rochwerf B, Agarwal A, Zeng L, Leo YS, Appiah JA, Agoritsas T, et al. Remdesivir for severe covid-19: a clinical practice guideline. *BMJ*. 2020;370:m2924.
36. Cao B, Wang Y, Wen D, Liu W, Wang J, Fan G, et al. A Trial of Lopinavir–Ritonavir in Adults Hospitalized with Severe Covid-19. *N Engl J Med*. 2020 May 7;382(19):1787–99.
37. Hung IF, Lung K-C, Tso EY, Liu R, Chung TW, Chu M-Y, et al. Triple combination of interferon beta-1b, lopinavir–ritonavir, and ribavirin in the treatment of patients admitted to hospital with COVID-19: an open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet*. 2020 May;6736(20):1–10.
38. Li Y, Xie Z, Lin W, Cai W, Wen C, Guan Y, et al. Efficacy and safety of lopinavir/ritonavir or arbidol in adult patients with mild/moderate COVID-19: an exploratory randomized controlled trial. *Cell Press*. 2020 May;doi: 10.1016/j.medj.2020.04.001 (preproof).
39. Huang M et al, Tang T, Pang P, Li M, Ma R, Lu J, et al. Treating COVID-19 with Chloroquine. *J Mol Cell Biol*. 2020;12:322–5.
40. K K. A Trial of Lopinavir–Ritonavir in Covid-19. *N Engl J Med*. 2020 May 21;382(21):e68.
41. Dalerba P, Levin B, Thompson J. A Trial of Lopinavir–Ritonavir in Covid-19. *N Engl J Med*. 2020 May 21;382(21):e68.
42. Cai Q, Yang M, Liu D, Chen J, Shu D, Xia J, et al. Experimental Treatment with Favipiravir for COVID-19: An Open-Label Control Study. *Engineering*. 2020 Mar;doi: 10.1016/j.eng.2020.03.007.
43. Chen C, Huang J, Cheng Z, Wu J, Chen S, Zhang Y, et al. Favipiravir versus Arbidol for COVID-19 : A Randomized Clinical. *medRxiv*. 2020;doi.org/10.1101/2020.03.17.20037432.
44. Ivashchenko AA, Dmitriev KA, Vostokova N V, Azarova VN, Blinow AA, Egorova AN, et al. AVIFAVIR for Treatment of Patients with Moderate COVID-19: Interim Results of a Phase II/III Multicenter Randomized Clinical Trial. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2020 Aug 9;1–14. Available from: <https://academic.oup.com/cid/advance-article/doi/10.1093/cid/ciaa1176/5890024>

45. Svetovna, Zdravstvena, Organizacija. Informal consultation on the potential inclusion of Favipiravir in a clinical trial. 2020.
46. Zhou D, Dai SM, Tong Q. COVID-19: a recommendation to examine the effect of hydroxychloroquine in preventing infection and progression. *J Antimicrob Chemother.* 2020;(February):4–7.
47. Paton NI, Lee L, Xu Y, Ooi EE, Cheung YB, Archuleta S, et al. Chloroquine for influenza prevention: A randomised, double-blind, placebo controlled trial. *Lancet Infect Dis.* 2011;11(9):677–83.
48. Hashem AM, Alghamdi BS, Algaissi AA, Alshehri FS, Bukhari A, Alfaleh MA, et al. Therapeutic use of chloroquine and hydroxychloroquine in COVID-19 and other viral infections: A narrative review. *Travel Med Infect Dis.* 2020;101735.
49. Tricou V, Minh NN, van TP, Lee SJ, Farrar J, Wills B, et al. A randomized controlled trial of chloroquine for the treatment of dengue in vietnamese adults. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(8).
50. Retraction Watch. Hydroxychloroquine-COVID-19 study did not meet publishing society's "expected standard" [Internet]. Retraction Watch. 2020 [cited 2020 May 22]. Available from: <https://retractionwatch.com/>
51. Bik E. Thoughts on the Gautret et al. paper about Hydroxychloroquine and Azithromycin treatment of COVID-19 infections. *Sci Integr Dig.* 2020;1–17.
52. Vaduganathan M, van Meijgaard J, Mehra MR, Joseph J, O'Donnell CJ, Warraich HJ. Prescription Fill Patterns for Commonly Used Drugs During the COVID-19 Pandemic in the United States. *JAMA* [Internet]. 2020 Jun 23;323(24):2524. Available from: <https://www.acpjournals.org/doi/10.7326/M20-0504>
53. Uradni list RS. Odlok o omejitvi predpisovanja in izdaje zdravil z učinkovino klorokin, hidroksiklorokin ali azitromicin. 2020. št. 43/20.
54. Mehra MR, Desai SS, Ruschitzka F, Patel AN. Hydroxychloroquine or chloroquine with or without a macrolide for treatment of COVID-19: a multinational registry analysis. *Lancet.* 2020;6736(20):1–10.
55. Mehra M, Desai S, Kuy, SR et al. Cardiovascular disease, drug therapy, and mortality in Covid-19. *NEJM.* 2020;382:e102.
56. Borba MGS, Val FFA, Sampaio VS, Alexandre MAA, Melo GC, Brito M, et al. Effect of High vs Low Doses of Chloroquine Diphosphate as Adjunctive Therapy for Patients Hospitalized With Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Infection. *JAMA Netw Open.* 2020;3(4.23):e208857.
57. Touret F, de Lamballerie X. Of chloroquine and COVID-19. *Antiviral Res.* 2020;177(February):104762.
58. CredibleMeds. Clinical Factors Associated with Prolonged QTc and / or TdP [Internet]. 2020 [cited 2020 May 22]. p. 1–6. Available from: www.QTFactors.org
59. Sanders JM, Monogue ML, Jodlowski TZ, Cutrell JB. Pharmacologic Treatments for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *JAMA.* 2020 Apr 13;2019:1–13.
60. Chen J, Liu D, Liu L, Liu P, Xu Q, XIA L, et al. A pilot study of hydroxychloroquine in treatment of patients with common coronavirus disease-19 (COVID-19). 2020;(March):3–8.
61. Chen Z et al. Efficacy of hydroxychloroquine in patients with COVID-19: results of a randomized clinical trial. *medRxiv.* 2020;doi: 10.1101/2020.03.22.20040758.
62. Yap C. Statistical review of efficacy of hydroxychloroquine in patients with COVID-19: results of a randomized clinical trial Study Summary [Internet]. [cited 2020 May 22]. Available from: <https://zenodo.org/>

UČINKOVINE ZA BLAŽENJE SINDROMA SPROŠČANJA CITOKINOV

Izr. prof. dr. Tomaž Bratkovič, mag. farm.

*Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana;
tomaz.bratkovic@ffa.uni-lj.si*

POVZETEK

Pri nekaterih bolnikih s koronavirusno boleznijo 19 (covid-19) imunski mehanizmi ne uspejo zamejiti namnoževanja virusa SARS-CoV-2 v zgodnji fazi okužbe. Kasneje velika virusna obremenitev ter obsežna apoptoza endotelijskih celic in pnevmocitov izzoveta sproščanje vnetnih citokinov in kemokinov v pljučnem tkivu ter infiltracijo številnih imunskih celic, ki sproščajo nove vnetne mediatorje. Pojav je znan kot sindrom sproščanja citokinov ali citokinska nevihta. Posledica nenadzorovanega imunskega odziva na virusno okužbo je povečana prepustnost kapilar ter sindrom akutne dihalne stiske zaradi alveolarnega edema in poškodb pljučnega tkiva. Zaviranje sproščanja vnetnih citokinov ali preprečevanje njihove signalizacije zato predstavlja pomembno podporno zdravljenje hudih oblik covid-19. Trenutno v številnih kliničnih raziskavah vrednotijo učinkovitost in varnost različnih imunomodulatornih učinkovin, zlasti zaviralcev kinaz JAK (*angl. Janus kinase*) in BTK (*angl. Bruton tyrosine kinase*), ki omejijo nastajanje in sproščanje nekaterih citokinov ter aktivacijo in migracijo imunskih celic, in antagonistov interleukina (IL)-6, IL-1 ter dejavnika tumorske nekroze α (TNF- α). V vseh primerih gre za uveljavljene učinkovine za zdravljenje kroničnih vnetnih bolezni ali nekaterih rakavih obolenj, ki jih poskušajo preusmeriti v terapijo covid-19.

VSEBINA

1 UVOD

2 SINDROM SPROŠČANJA CITOKINOV

3 OBETAVNE UČINKOVINE ZA BLAŽENJE SINDROMA SPROŠČANJA CITOKINOV PRI COVID-19

3.1 Zaviralci kinaz JAK

3.2 Antagonisti IL-6

3.3 Antagonisti IL-1

3.4 Antagonisti TNF- α

3.5 Zaviralci tirozin kinaz ABL in BTK

3.6 Fingolimod

3.7 Ostale imunosupresivne in imunomodulatorne učinkovine

4 SKLEP

5 LITERATURA

1 UVOD

Covid-19, infekcijska bolezen, ki jo povzroča respiratorni betakoronavirus SARS-CoV-2, se pri okuženih izrazi na zelo različne načine. Velika večina (okoli 80%) okuženih je asimptomatskih ali izkazuje relativno blage, prehladu ali gripi podobne simptome (vročina, utrujenost, kašelj, bolečine v žrelu), a pri približno 15% obolelih se okužba razvije v pljučnico, 5% pa doživi celo sindrom hude akutne dihalne stiske, septični šok in/ali odpoved več organov (1). Okužba z virusom SARS-CoV-2 praviloma sproži odziv prirojene (nespecifične) in pridobljene (specifične) komponente imunskega sistema, kar omogoča pri imunsko sposobnih posameznikih učinkovito zamejitev in končno odpravo okužbe. Nasprotno se pri ljudeh z oslabljenim imunskim sistemom, zlasti starejših in kroničnih bolnikih, specifična imunost ne vzpostavi, zaradi česar pride do dolgoročne in okrepljene aktivacije mehanizmov prirojene imunosti. To vodi do lokalne in sistemske vnetne reakcije, odgovorne za nepovratne poškodbe pljuč in drugih organov (2). Sindrom je povezan z obsežnim sproščanjem vnetnih citokinov in kemokinov, zato ga žargonsko imenujemo tudi »citokinska nevihta«. Trenutno uveljavljenih terapevtskih strategij za blaženje sindroma sproščanja citokinov pri covidu-19 (sicer osrednjega vzroka smrti okužbe s SARS-CoV-2) še ni na voljo, a v številnih kliničnih raziskavah vrednotijo učinkovine, ki bodisi zavirajo sproščanje ali blokirajo signalizacijo citokinov (3). V pričujočem prispevku skušamo osvetliti mehanizme, ki privedejo do sindroma sproščanja citokinov, in predstavljamo obetavne skupine imunomodulatornih učinkovin za morebitno zdravljenje hudih oblik covid-19.

2 SINDROM SPROŠČANJA CITOKINOV

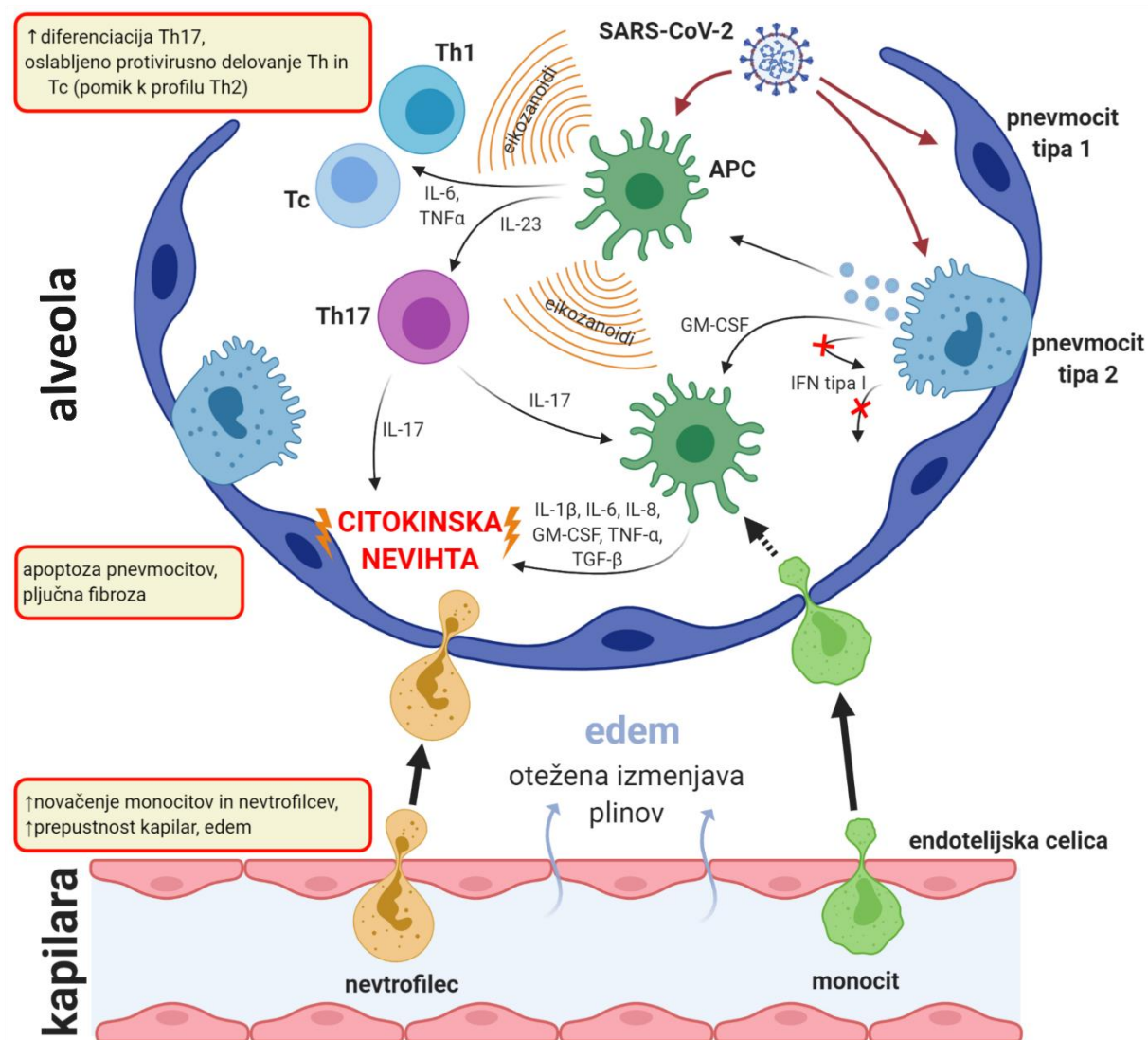
Ko določen virus vdre v celico, njegove evolucijsko ohranjene komponente prepoznajo posebni receptorji prirojene imunosti v citosolu in endosomih. Aktivirajo se signalne poti, ki privedejo do sproščanja interferonov (IFN) tipa I in aktivacije transkripcijskega dejavnika NF- κ B. V sosednjih celicah IFN spodbudijo sintezo protivirusnih proteinov, ki se aktivirajo šele v prisotnosti virusne RNA in izzovejo nespecifično razgradnjo citosolnih RNA ter zavrejo translacijo, s čimer omejijo širjenje virusa. Spodbudijo tudi izražanje poglobitnega histokompatibilnega kompleksa (MHC) I in tako povečajo verjetnost predstavljanja virusnih epitopov na površini okuženih celic, na katere se odzovejo citotoksični limfociti T (Tc), ter uravnavajo delovanje antigen-predstavitvenih celic, naravnih celic ubijalk (NK), limfocitov B, T-celic pomagalk (Th) in Tc (4). Transkripcijski dejavnik NF- κ B sproži izražanje številnih genov, povezanih z imunskim odzivom. Med drugim nadzira nastajanje pleiotropnih citokinov interleukina (IL) 6 in IL-1 β ter dejavnika tumorske nekroze α (TNF- α), ki sodelujejo pri aktivaciji in novačenju imunskih celic na mestu vnetja ter predstavljajo pomembno vez med prirojeno in pridobljeno imunostjo (5).

Koronavirusi poleg genov za strukturne proteine in proteine, potrebne za replikacijo, nosijo v genomu zapis za t. i. pomožne proteine (*angl. accessory proteins*). Ti se domnevno vpletajo v signalne poti receptorjev prirojene imunosti in ovirajo sproščanje interferonov iz okuženih celic, zato se virusi zelo uspešno namnožujejo. Nedavno so na človeškem pljučnem tkivu *ex vivo* pokazali, da okužba z virusom SARS-CoV-2 ne inducira močnega sproščanja IFN (6), medtem ko so pri bolnikih s covidom-

19 opisali inverzno korelacijo med plazemsko koncentracijo IFN- α in IFN- β ter resnostjo klinične slike (7). V raziskavah *in vitro*, opravljenih na respiratornih epitelijskih celicah, dendritičnih celicah in makrofagih, in s poskusi na živalskih modelih so ugotovili, da virusa, sorodna SARS-CoV-2, SARS-CoV in MERS-CoV, zavreta sproščanje vnetnih in kemotaktičnih citokinov v zgodnji fazi okužbe, kar jima omogoči nenadzorovano namnožitev. V kasnejših stadijih okužbe so zaznali okrepljeno sproščanje IL-1 β , IL-6, TNF- α in nekaterih kemokinov (CCL2, CCL3 in CCL5), ki nastajajo kot odziv na tvorbo vnetnih mediatorjev levkotrienov in prostaglandinov v alveolarnih makrofagih, sproženo s piroptozo okuženih celic (*Slika 1*; (8)). Bolniki s covidom-19 izkazujejo limfopenijo (znižano število celic Tc, Th, NK in limfocitov B; (2, 9)), ki je izrazitejša pri hudem poteku bolezni. Domnevajo, da SARS-CoV-2 učinkovito vstopa ne le v celice respiratornega epitelijskega, temveč (podobno kot SARS-CoV in MERS-CoV) okuži tudi alveolarne makrofage in dendritične celice. Te se na okužbo odzovejo s sproščanjem IL-6, kar privede do izčrpavanja in apoptoze limfocitov T in aktivacije endotelijskih celic. IL-6 (skupaj z IL-1 β in IL-23) je odgovoren tudi za polarizacijo celic Th k podtipu celic Th17, ki s sproščanjem citokina IL-17 vzdržujejo in okrepijo vnetni proces (10), le v manjši meri pa nastajajo celice Th1, ki so ključne za obračunavanje z virusnimi patogeni. Posledica vsega tega je nadaljnje obsežno sproščanje vnetnih citokinov in kemokinov, ki so odgovorni za infiltracijo levkocitov (nevtrofilcev, monocitov in limfocitov), in ker ti sproščajo še več citokinov, pride do nepovratnih poškodb pljučnega tkiva zaradi apoptoze epitelijskih in endotelijskih celic ter pojava edema, t. i. sindroma akutne dihalne stiske (*Slika 1*; (11)). Če se proces razširi sistemske, lahko nastopi tudi odpoved drugih organov.

3 OBETAVNE UČINKOVINE ZA BLAŽENJE SINDROMA SPROŠČANJA CITOKINOV PRI COVID-19

Obsežen in nenadzorovan vnetni proces, ki ga sproži virus SARS-CoV-2, je torej odgovoren za nepopravljive poškodbe in odpoved notranjih organov (prvenstveno pljuč) ter s tem razmeroma visoko smrtnost med okuženimi. Zato se zdi smiselno pri podpornem zdravljenju covida-19 poseči po imunosupresivnih učinkovinah, ki ciljno zavirajo signalizacijo specifičnih mediatorjev vnetja in jih že uspešno uporabljamo za blaženje simptomov nekaterih kroničnih vnetnih bolezni. Poudariti velja, da je takšen terapevtski poseg verjetno smiseln zgolj v poznem stadiju hujših oblik covida-19, saj je zaviranje delovanja imunskega odziva med resno virusno okužbo dvorezen meč. Tako bo pred vpeljavo uporabe imunosupresivnih zdravil v klinično zdravljenje bolnikov s covidom-19 potrebno ne le potrditi njihovo učinkovitost in varnost v nadzorovanih kliničnih raziskavah, temveč bo ključno tudi identificirati skupine bolnikov (npr. klinična slika, napredovanje bolezni, imunski status, starost...), ki jim bo takšen način zdravljenja prinesel ugoden terapevtski izid.



Slika 1. Domneven mehanizem nastanka citokinske nevihte, ki jo sproži okužba z virusom SARS-CoV-2. Piroptoza epiteljskih celic na mestu vdora virusa je povezana s sproščanjem celičnih komponent, ki aktivirajo alveolarne makrofage, da proizvajajo eikozanoide. Prostaglandini in levkotrieni spodbudijo sproščanje vnetnih citokinov iz imunskih celic. Virus verjetno vstopa tudi v antigen-predstavitvene celice (APC), kjer okužba neposredno izzove nastajanje vnetnih citokinov in kemokinov. Disfunkcija APC je odgovorna za diferenciacijo Th17 ter izčrpavanje in končno apoptozo limfocitov. Vnetni proces privablja v pljučno tkivo nevtrofilce, monocite in limfocite, ki sproščajo nove citokine, in je vzrok povečane prepustnosti kapilar in tvorbe alveolarnega edema. Posledica opisanih procesov sta akutni sindrom dihalne stiske in hipotenzija. Prirejeno po (2, 8). Slika je izrisana s programom BioRender.

3.1 Zaviralci kinaz JAK

Ena od osrednjih signalnih poti, povezanih s prekomernim imunskim odzivom na okužbo z virusom SARS-CoV-2, je pot JAK (*angl. Janus kinase*)-STAT (*angl. signal transducer and activator of transcription*). Celična signalizacija nekaterih citokinov, zlasti IL-6 (glej 3.2), poteka namreč preko aktivacije tirozin kinaz JAK, ki sprožijo fosforilacijo proteinov STAT. Ti se pomaknejo v jedro, kjer uravnavajo transkripcijo genov, povezanih z vnetnim procesom. Enako signalno pot izkorišča tudi angiotenzin II po vezavi na receptor AT₁R. Ker SARS-CoV-2 na račun receptorsko-posredovane endocitoze domnevno zniža število membranskih receptorjev ACE2, ki sicer cepijo angiotenzin II, se biološki učinki slednjega verjetno okrepijo, to pa pomeni dodatno sproščanje vnetnih citokinov (Slika 2A; (12)).

V družino kinaz JAK umeščamo štiri encime (JAK1-3 in TYK2), povezane z različnimi citokinskimi receptorji. Zaviralce kinaz JAK baricitinib, peficitinib, upadacitinib in tofacitinib predpisujemo za zdravljenje revmatoidnega artritisa, medtem ko ruksolitinib in fedratinib uporabljamo za zdravljenje mielofibroze. Gre za učinkovine, ki selektivno zavirajo kinaze JAK, niso pa specifične za posamezne predstavnike družine. V primerjavi z učinkovinami, ki selektivno blokirajo signalizacijo enega citokina (npr. antagonisti TNF- α , IL-6 ali IL-1), je moč pri zaviralcih kinaz JAK pričakovati širši spekter protivnetnega delovanja. Potencialna dodatna prednost te skupine učinkovin je, da aktivnosti citokinov ne zavrejo v celoti, saj primarno naslavlja učinke *patološko povišanih* koncentracij citokinov (13), zaradi česar jih smatramo za razmeroma varne. Kljub temu ne gre prezreti, da je ravno signalna pot JAK/STAT, ki jo aktivirajo IFN tipa I, bistvena za indukcijo protivirusnih odzivov. Tako je znano, da dolgoročno zdravljenje z zaviralci kinaz JAK pri bolnikih z revmatoidnim artritisom poveča tveganje za reaktivacijo latentnih virusnih okužb zaradi oslavljenega imunskega odziva na račun neučinkovite signalizacije IFN in limfocitopenije. Uporabo zaviralcev kinaz JAK povezujemo tudi s povečanim tveganjem za tromboembolijo. Ker nekateri bolniki s covidom-19 izkazujejo motnje v koagulaciji, je potrebno skrbno ovrednotiti varnost zaviralcev kinaz JAK tudi s tega vidika (14). Vsekakor jih ni smotrno predpisati bolnikom v zgodnji fazi okužbe, ko se mora imunski sistem aktivirati za boj proti virusu; verjetno jih je bolje aplicirati v kasnejši fazi bolezni, ko se virusna obremenitev nekoliko zmanjša, a še pred nastopom citokinske nevihte (15).

Trenutno v več kliničnih raziskavah vrednotijo varnost in učinkovitost **baricitiniba**, **ruksolitiniba** in **tofacitiniba** pri preprečevanju oz. blaženju sindroma sproščanja citokinov, povezanega s covidom-19 (glej: <https://clinicaltrials.gov/>). Med naštetimi verjetno največ obeta baricitinib, zaviralec kinaz JAK1 in 2, za katerega predvidevajo, da deluje tudi na kinazi iz družine NAK (*angl. numb-associated kinase*) – AAK1 (*angl. adapter-associated protein kinase 1*) in GAK (*angl. cyclin G-associated kinase*) – ki sodelujeta pri s klatrinom posredovani endocitozi virusa SARS-CoV-2. Zato utegne baricitinib ublažiti vnetno reakcijo in hkrati preprečiti vdor virusa v pnevmoците (12, 16). V pilotni klinični raziskavi, v kateri je 12 bolnikov z blago do zmerno pljučnico 14 dni prejelo baricitinib v odmerku 4 mg/dan sočasno z ritonavirjem in lopinavirjem, so poročali o značilni izboljšavi nekaterih kliničnih znakov in pljučne funkcije brez

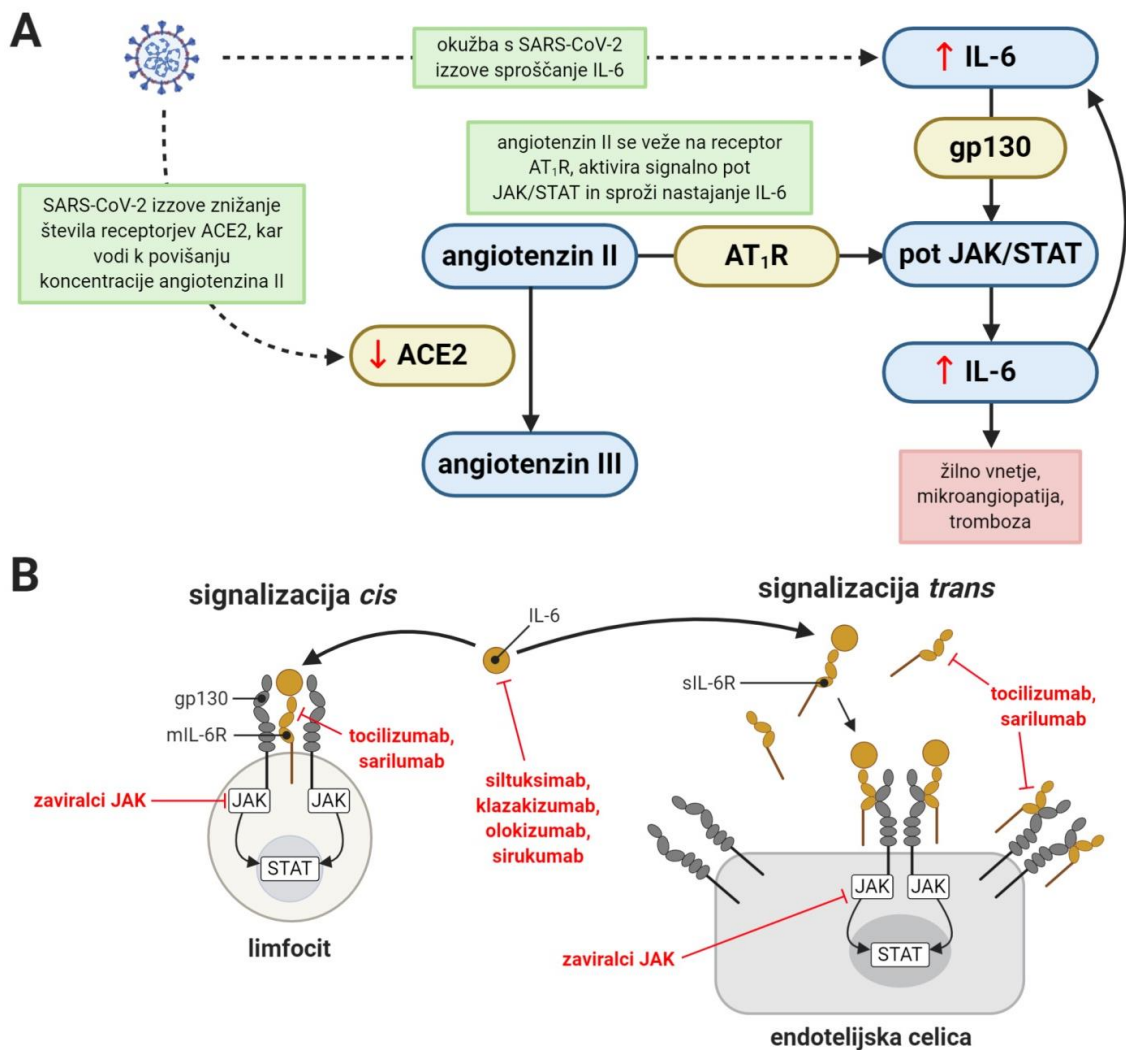
resnih neželenih učinkov, medtem ko v kontrolni skupini (deležni le zdravljenja z ritonavirjem/lopinavirjem in hidroksiklorokinom) izboljšanja niso opazili (17).

3.2 Antagonisti IL-6

IL-6, eden od najpomembnejših aktivatorjev signalne poti JAK/STAT, velja za ključni mediator vnetja v kontekstu sindroma sproščanja citokinov. Nastaja v aktiviranih monocitih, makrofagih in dendritičnih celicah kot odziv na evolucijsko ohranjene virusne strukture. IL-6 lahko sproži signalizacijo v tarčnih celicah po dveh poteh, imenovanih *cis* in *trans* (Slika 2B; (18)). Signalizacija *cis* je klasična, pri tem se IL-6 veže na membranski receptor za IL-6 (mIL-6R) v kompleksu z gp130. mIL-6R je izražen le na imunskih celicah in njegova aktivacija izzove pleiotropne učinke v limfocitih B in T, nevtrofilcih, makrofagih in naravnih celicah ubijalkah (NK), kar okrepi sproščanje vnetnih citokinov. Pri signalizaciji *trans* se IL-6 veže na topno obliko receptorja za IL-6 (sIL-6R), ta pa nato tvori kompleks z dimerno obliko gp130 na vseh celicah, ne le imunskih, npr. na endotelijskih celicah. Ta mehanizem je podlaga sistemske citokinske nevihte, ki med drugim zajema povečano prepustnost kapilar, izražanje celičnih adhezijskih molekul in infiltracijo imunskih celic v prizadeta tkiva. IL-6 igra pomembno vlogo pri diferenciaciji celic Th17, katerih prekomerno aktivnost povezujemo s številnimi avtoimunskimi in kroničnimi vnetnimi boleznimi.

Zaviranje signalizacije IL-6 se je izkazalo kot učinkovita strategija za blaženje citokinske nevihte, ki predstavlja neželen učinek zdravljenja limfomov in levkemij z avtologno transfuzijo citotoksičnih limfocitov T, transduciranih s himernimi antigenskimi receptorji (CAR-T). Na osnovi sicer omejenih kliničnih raziskav sta EMA in FDA odobrili uporabo tocilizumaba za preprečevanje citokinske nevihte, povezane s CAR-T (19). **Tocilizumab** je humanizirano monoklonsko protitelo, ki ga primarno uporabljamo za zdravljenje hudih oblik revmatoidnega artritisa in juvenilnega idiopatskega artritisa. Deluje po mehanizmu receptorskega antagonizma (blokira vezavna mesta za IL-6 tako na mIL-6R kot sIL-6R), ni pa potrjeno, da bi izzval smrt celic, ki izražajo mIL-6R, po principu s protitelesi posredovane celične citotoksičnosti ali s komplementom posredovane citotoksičnosti. Za preprečevanje sindroma sproščanja citokinov pri CAR-T ga odraslim bolnikom apliciramo v obliki enourne infuzije v odmerku 8 mg/kg telesne mase, bodisi v obliki monoterapije ali v kombinaciji s kortikosteroidi. Če se stanje po prvi infuziji ne izboljša, lahko zdravilo apliciramo še do trikrat v razmiku najmanj 8 ur (20). V aktualnih kliničnih raziskavah, v katerih vrednotijo učinkovitost tocilizumaba za blaženje citokinske nevihte pri covidu-19, večinoma povzemajo takšen terapevtski režim (1 do 8 mg/kg telesne mase z najvišjim dovoljenim odmerkom 800 mg in po potrebi ponovitev infuzije po 12 urah). Za enako terapevtsko indikacijo proučujejo v več kliničnih raziskavah še nekatere novejšje biološke učinkovine, ki selektivno zavirajo prenos signala IL-6 (Slika 2B; glej: <https://clinicaltrials.gov/>). **Sarilumab** je humano monoklonsko protitelo, ki podobno kot tocilizumab deluje kot antagonist IL-6R in ga uporabljamo za zdravljenje zmernih in hudih oblik revmatoidnega artritisa, le da ga apliciramo subkutano (21). **Siltuksimab**, **klazakizumab**, **olokizumab** in **sirukumab** so monoklonska protitelesa, ki z vezavo IL-6 preprečijo njegovo asociacijo z IL-6R in proženje znotrajceličnih signalov (22). Siltuksimab je sicer zdravilo sirota za zdravljenje multicentrične Castlemanove bolezni pri odraslih, ki niso okuženi z virusom humane imunske

pomanjkljivosti (HIV) in humanim virusom herpesa tipa 8 (HHV-8). Apliciramo ga v obliki infuzije. Klazakizumab in olokizumab sta učinkovini v razvoju, katerih varnost in učinkovitost pri zdravljenju kroničnega idiopatskega artritisa (revmatoidnega, juvenilnega idiopatskega in psoriaznega artritisa ter ankilizirajočega spondilitisa) vrednotijo v kliničnih raziskavah, medtem ko je razvoj sirukumaba za enak nabor indikacij zastal, potem ko sta tako EMA kot FDA pri ocenjevanju dosjeja vloge za pridobitev tržnega dovoljenja zahtevali dodatne klinične podatke.



Slika 2. IL-6 kot osrednji aktivator signalne poti JAK-STAT. **A.** Predviden mehanizem, po katerem SARS-CoV-2 vzpostavi povratno zanko med IL-6 in angiotenzinom, ki potencira vnetni proces. IL-6, ki ga sproščajo aktivirane antigen-predstavitvene celice, se veže na topno obliko receptorja IL-6R in po interakciji z gp130 aktivira pot JAK/STAT. Posledica je okrepljeno nastajanje IL-6 in drugih citokinov, ki privede do poškodb žilja. Sintezo IL-6 izzove tudi angiotenzin II, ki po vezavi na receptor AT₁R aktivira pot JAK/STAT. Ker virus zniža število ACE2 na celicah, je hidroliza angiotenzina II omejena in njegova koncentracija naraste, kar še okrepi sproščanje IL-6. Prirejeno po (12). **B.** Ponazoritev signalizacije IL-6 po poteh *cis* (na imunskih celicah) in *trans* (na večini celic) ter mehanizmov delovanja učinkovin, ki se vpletajo v ti signalni poti. mIL-6R – membranska oblika receptorja za IL-6, sIL-6R – topna oblika receptorja za IL-6. Prirejeno po (18).

Tudi pri uporabi antagonistov IL-6 za blaženje sindroma sproščanja citokinov pri covidu-19 se soočamo z enakimi varnostnimi pomisleki kot pri zaviralcih kinaz JAK. Tako so na primer resni neželeni učinki, povezani z uporabo tocilizumaba, izbruh resnih okužb in levkopenija, a tudi poškodbe jeter, trombocitopenija, perforacije gastrointestinalnega trakta in hipertenzija (20).

3.4 Antagonisti IL-1

Ob IL-6 igra verjetno najpomembnejšo vlogo v patogenezi bronhoalveolarnega edema IL-1 β (23). Tudi IL-1 β izločajo aktivirani makrofagi in ta citokin sproži številne učinke, podobne tistim, ki jih pripisujemo IL-6. Zaviranje signalizacije IL-1 je uveljavljena terapevtska strategija pri simptomatskem zdravljenju kroničnih vnetnih bolezni – pri tem izkoriščamo rekombinantno različico endogenega antagonista receptorja za IL-1 (**anakinro**) ter protitelo **canakinumab**, usmerjeno proti IL-1 β (24). Primernost obeh učinkovin za blaženje sindroma sproščanja citokinov pri covidu-19 vrednotijo v več kliničnih raziskavah (glej: <https://clinicaltrials.gov/>). Anakinro in canakinumab sicer predpisujemo bolnikom z revmatoidnim artritisom, tistim, s periodičnimi vročinskimi sindromi, povezanimi s kriopirinom, bolnikom s Stillovo boleznijo in nekaterimi drugimi kroničnimi vnetnimi boleznimi (24); apliciramo ju v obliki subkutanih injekcij. V veliki multicentrični klinični raziskavi faze III se je zdravljenje sepse s sindromom aktiviranih makrofagov, po mehanizmu in zapletih sorodnemu citokinski nevihti, povezani s covidom-19, z anakinro izkazalo kot učinkovito: smrtnost do 28. dne je bila pri bolnikih s hepatobiliarno disfunkcijo in diseminirano intravaskularno koagulacijo značilno nižja v tretirani skupini v primerjavi s kontrolno skupino (34,6% anakinra proti 64,7% placebo; $p = 0.0006$ (25)).

3.3 Antagonisti TNF- α

Membranski protein S virusa SARS-CoV (in po analogiji verjetno tudi SARS-CoV-2) v okuženih celicah aktivira signalno pot NF- κ B, kar izzove nastajanje in sproščanje IL-6 in TNF- α (26). Plazemske koncentracije TNF- α pri bolnikih s covidom-19 so značilno višje kot pri zdravih posameznikih in koncentracija tega citokina korelira z zaostrovanjem klinične slike (1). Zaviranje signalizacije TNF- α med citokinsko nevihto je smiselno, saj prav ta citokin preko aktivacije signalne poti NF- κ B okrepi nastajanje IL-6 in spodbuja vnetni proces preko številnih drugih mehanizmov. Temu v prid govori tudi dejstvo, da so v raziskavah na miših, okuženih z virusom SARS-CoV, pokazali, da nevtralizacija TNF- α poveča verjetnost preživetja živali (27). Antagoniste TNF- α (tj. rekombinantna monoklonska protitelesa, usmerjena proti TNF- α (npr. infliksimab, adalimumab, golimumab) ali fuzijski protein ektodomene receptorja za TNF- α in regije Fc IgG (etanercept)) uporabljamo za zdravljenje različnih kroničnih vnetnih bolezni, kot so revmatoidni artritis, psoriaza, Crohnova bolezen in ulcerozni kolitis. Ob nevtralizaciji TNF- α te učinkovine izzovejo tudi znižanje števila aktiviranih monocitov in makrofagov, ki izražajo membransko obliko tega citokina po mehanizmu s komplementom posredovane citotoksičnosti in/ali s protitelesi posredovane celične citotoksičnosti (28). Ker so prav monociti/makrofagi eni od osrednjih krivcev za citokinsko nevihto (*Slika 1*), predstavljajo antagonisti TNF- α še eno potencialno skupino učinkovin za blaženje simptomov hujših oblik covid-19.

Trenutno za to indikacijo v klinični raziskavi faze II vrednotijo **infliksimab** (NCT04425538).

3.5 Zaviralci tirozin kinaz ABL in BTK

Tirozin kinaze so raznovrstna skupina kinaz, ki fosforilira tirozinske ostanke proteinskih substratov. Udeležene so v signalnih poteh, ki uravnavajo celično proliferacijo, diferenciacijo, migracijo in vnetne procese (29). Zaviralce tirozin kinaz, kot so imatinib, dasatinib, nilotinib, bosutinib in ponatinib, uporabljamo za zdravljenje kronične mieloidne levkemije, nekaterih akutnih limfoblastnih levkemij in specifičnih tumorjev, a izkazujejo tudi imunomodulatorne učinke (30). Imatinib je v raziskavah *in vitro* in *in vivo* z zaviranjem kinaze Arg/Abl2 (*angl. Abelson-related gene/Abelson kinase* 2) omejil nastanek edema in pozitivno vplival na integriteto endotelijske pregrade (31), v raziskavah *in vitro* pa so potrdili celo njegovo protivirusno delovanje na primeru SARS-CoV in MERS-CoV, kar so pripisali zaviranju kinaze Abl2, ki ga virusa potrebuje za zlitje z membrano endosomov (32). Trenutno učinkovitost in varnost **imatiniba** in **nintedaniba** (slednjega sicer uporabljamo v terapiji idiopatske pljučne fibroze) pri zdravljenju zmerne in hude pljučnice covid-19 s ciljem preprečitve napredovanja bolezni do stopnje sindroma hude akutne dihalne stiske vrednotijo v več kliničnih raziskavah (glej: <https://clinicaltrials.gov/>).

V kontekstu preprečevanja oz. blaženja citokinske nevihte velja izpostaviti še **akalabrutinib**, selektivni kovalentni zaviralec kinaze BTK (*angl. Bruton tyrosine kinase*), sicer indiciran za zdravljenje limfoblastoidne levkemije in limfoma. BTK je v aktiviranih makrofagih vpletena v proženje signalne poti NF- κ B in aktivacijo inflammasoma NLRP3, kar je podlaga sproščanja vnetnih citokinov in kemokinov. V pilotni klinični raziskavi, v kateri je 19 bolnikov s hudo obliko covid-19 prejelo 100 mg akalabrutiniba dvakrat dnevno 10 do 14 dni, so poročali o hitrem izboljšanju klinične slike in pljučne funkcije (33). Ob akalabrutinibu trenutno za zdravljenje covid-19 v več kliničnih raziskavah vrednotijo še en zaviralec BTK, **ibrutinib** (glej: <https://clinicaltrials.gov/>). Ker BTK nadzira signalne procese v nevtrofilcih, megakariocitih in trombocitih, ki so verjetno tudi vpeti v imunopatološke procese pri covidu-19, predstavljajo selektivni zaviralci BTK zelo zanimivo potencialno skupino učinkovin za blaženje citokinske nevihte.

3.6 Fingolimod

Sfingozin-1-fosfat (S1P) je pomemben endogeni lipidni mediator vnetja, ki nadzira migracijo različnih celic imunskega sistema, prepustnost endotelijske pregrade in sproščanje citokinov in kemokinov (34). Svoje učinke na prirojeno in pridobljeno komponento imunskega sistema izkazuje preko vezave na s proteinom G sklopljene receptorje, med katerimi je zelo pogost receptor S1PR₁. S poskusi na miših so pokazali, da aktivacija receptorja S1PR₁ prepreči citokinsko nevihto po okužbi z virusom gripe (35). Selektivni agonist S1PR₁ je namreč zavrl zgodnji odziv prirojene imunosti v respiratornih endotelijskih celicah in preprečil sproščanje IL-6, TNF- α , CCL2, IFN- α in IFN- γ . V kasnejši raziskavi (36) so na enakem živalskem modelu dokazali, da je signalizacija prek S1PR₁ odgovorna tudi za zmanjšanje aktivacije in infiltracije imunskih celic v pljučno tkivo. **Fingolimod** je neselektivni modulator

receptorjev za S1P, indiciran za zdravljenje multiple skleroze. Trenutno poteka majhna klinična raziskava faze II, v kateri vrednotijo učinkovitost fingolimoda za preprečevanje sindroma akutne respiratorne stiske pri covidu-19 (NCT04280588).

3.7 Ostale imunosupresivne in imunomodulatorne učinkovine

Kortikosteroide že desetletja uporabljamo za blaženje vnetnih reakcij najrazličnejših vzrokov. Pri zdravljenju virusnih pljučnic jih praviloma ne predpisujemo, saj oslabijo protivirusno reakcijo imunskega sistema in zavlečejo okužbo (37). Kljub temu je, kot kaže nedavna klinična raziskava (38), uporaba kortikosteroidov pri določenih bolnikih s covidom-19 smiselna. Desetdnevno zdravljenje s po 10 mg deksametazona (p.o. ali i.v.) je namreč značilno povečalo preživetje bolnikov (do 28. dne) na invazivnem mehanskem predihavanju (razmerje okrevanja: 0,64; 95-% interval zaupanja (IZ): 0,51-0,81) oz. tistih, ki so prejeli kisik (razmerje okrevanja: 0,82; 95-% IZ: 0,72-0,94), v primerjavi s skupino, ki je bila deležna standardnega zdravljenja. Nasprotno pri bolnikih, ki so v času randomizacije dihal brez pomoči, niso zaznali razlik v preživetju med skupino, ki je prejela deksametazon, in kontrolno skupino (razmerje okrevanja: 1,19; 95-% IZ: 0,91-1,55). Ugotovitve raziskave, čeprav preliminarne, nakazujejo, da je za doseg optimalnega terapevtskega izida ključno opredeliti bolnike, ki se bodo na zdravljenje s kortikosteroidi ugodno odzvali.

Azitromicin je makrolidni antibiotik, ki ga med drugim predpisujemo za zdravljenje bakterijskih pljučnic in bronhitisov. Deluje tudi imunomodulatorno, a ta mehanizem še ni povsem pojasnjen (39). Obstajajo dokazi, da makrolidi zavirajo aktivnost nevtrofilcev ter sproščanje nekaterih citokinov in kemokinov. Pri zdravljenju covid-19 bi utegnili biti zanimivo tudi protivirusno delovanje eritromicina, saj se kot relativno lipofilna in šibko bazična učinkovina kopiči v endosomih, kjer prepreči zakisanje vsebine teh organelov in s tem ovira življenjski cikel virusa (40). Podoben mehanizem delovanja na osnovi raziskav, opravljenih na celicah *in vitro* (41), pripisujemo tudi **klorokinu** in njegovemu analogu **hidroksiklorokinu**, ki ju sicer uporabljamo za zdravljenje malarije in (zaradi imunomodulatornih učinkov) nekaterih avtoimunskih bolezni (42, 43). Hidroksiklorokin je Svetovna zdravstvena organizacija sprva vključila v obsežen sklop kliničnih vrednotenj potencialnih zdravil za covid-19 (t.i. raziskava SOLIDARITY), a so sredi junija 2020 ta del raziskav ustavili (44). Zdravljenje s hidroksiklorokinom namreč ni znižalo smrtnosti v primerjavi s standardno terapijo. Že pred tem je Evropska agencija za zdravila opozorila (45), da (hidroksi)klorokin lahko izzove srčno aritmijo (podaljša veznico QT), povzroči poškodbe jeter in ledvic, hipoglikemijo in periferno nevropatijo, zato ob pomanjkanju dokazov o učinkovitosti zdravljenja covid-19 njuna uporaba za to terapevtsko indikacijo ni upravičena.

4 SKLEP

Sindrom sproščanja citokinov predstavlja resen zaplet pri nekaterih bolnikih s covidom-19. Gre za močno reakcijo imunskega sistema na virusno okužbo, ki ni specifična za SARS-CoV-2, saj so podobne simptome opisali tudi pri nekaterih drugih infekcijah (46). V primeru covida-19 je obsežna vnetna reakcija in infiltracija tkiv z imenskimi celicami odgovorna za nastanek pljučnega edema ter poškodbe pljuč in drugih organov. Tako se ob nadejanih profilaktičnih cepivih in protivirusnih zdravilih kot pomembna skupina učinkovin za zdravljenje hujše oblike covida-19 ponujajo imunomodulatorne učinkovine, ki po različnih mehanizmih selektivno utišajo signalizacijo posameznih mediatorjev vnetja oz. zavrejo aktivacijo in rekrutiranje imunskih celic. Seveda je v želji po čim hitrejšem oblikovanju učinkovitih terapevtskih strategij za blaženje citokinske nevihte smiselno poseči po prenamembi zdravil, katerih uporaba je odobrena za druge terapevtske indikacije, saj sta njihova farmakokinetika in varnostni profil že dobro ovrednotena. Pri tem bo ključno v dobro načrtovanih, obsežnih in nadzorovanih kliničnih raziskavah potrditi varnost in učinkovitost novih terapevtskih pristopov in optimizirati terapevtski režim. Ker imunski odziv sproži aktivacijo več vzporednih redundantnih signalnih poti, nekateri avtorji predlagajo sočasno aplikacijo različnih imunomodulatornih učinkovin, s katerimi bi na podlagi sinergističnih ali aditivnih učinkov dosegli boljši terapevtski izid (12).

5 LITERATURA

1. Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020; 395(10223): 497-506.
2. Pelaia C, Tinello C, Vatrella A, et al. Lung under attack by COVID-19-induced cytokine storm: pathogenic mechanisms and therapeutic implications. *Ther Adv Respir Dis* 2020; 14: 1-9. doi: 10.1177/1753466620933508
3. Jakopin Ž, Lunder M, Anderluh M, et al. Blaženje sindroma sproščanja citokinov pri covid-19. *Farm Vestn* 2020; 71(2): 152-162.
4. McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, et al. Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol* 2015; 15(2): 87-103.
5. Liu T, Zhang L, Joo D, et al. NF-kappaB signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther* 2017; 2: e17023.
6. Chu H, Chan JF, Wang Y, et al. Comparative replication and immune activation profiles of SARS-CoV-2 and SARS-CoV in human lungs: an *ex vivo* study with implications for the pathogenesis of COVID-19. *Clin Infect Dis* 2020. doi: 10.1093/cid/ciaa410
7. Hadjadj J, Yatim N, Barnabei L, et al. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science* 2020. doi: 10.1126/science.abc6027
8. Panigrahy D, Gilligan MM, Huang S, et al. Inflammation resolution: a dual-pronged approach to averting cytokine storms in COVID-19? *Cancer Metastasis Rev* 2020; 39(2): 337-340.
9. Qin C, Zhou L, Hu Z, et al. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. *Clin Infect Dis* 2020; 71(15): 762-768.
10. Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, et al. Th17 cells in human disease. *Immunol Rev* 2008; 223: 87-113.
11. Ye Q, Wang B, Mao J. The pathogenesis and treatment of the 'Cytokine Storm' in COVID-19. *J Infect* 2020; 80(6): 607-613.
12. Catanzaro M, Fagiani F, Racchi M, et al. Immune response in COVID-19: addressing a pharmacological challenge by targeting pathways triggered by SARS-CoV-2. *Signal Transduct Target Ther* 2020; 5(1): 84.
13. Peterson D, Damsky W, King B. The use of Janus kinase inhibitors in the time of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *J Am Acad Dermatol* 2020; 82(6): e223-e226.

14. Spinelli FR, Conti F, Gadina M. HiJAKing SARS-CoV-2? The potential role of JAK inhibitors in the management of COVID-19. *Sci Immunol* 2020; 5(47): eabc5367.
15. Richardson P, Griffin I, Tucker C, et al. Baricitinib as potential treatment for 2019-nCoV acute respiratory disease. *Lancet* 2020; 395(10223): e30-e31.
16. Stebbing J, Phelan A, Griffin I, et al. COVID-19: combining antiviral and anti-inflammatory treatments. *Lancet Infect Dis* 2020; 20(4): 400-402.
17. Cantini F, Niccoli L, Matarrese D, et al. Baricitinib therapy in COVID-19: A pilot study on safety and clinical impact. *J Infect* 2020; 81(2): 318-356.
18. Moore JB, June CH. Cytokine release syndrome in severe COVID-19. *Science* 2020; 368(6490): 473-474.
19. Kotch C, Barrett D, Teachey DT. Tocilizumab for the treatment of chimeric antigen receptor T cell-induced cytokine release syndrome. *Expert Rev Clin Immunol* 2019; 15(8): 813-822.
20. EMA. Povzetek glavnih značilnosti zdravila RoActemra. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/roactemra-epar-product-information_en.pdf. Dostop: 20. julij 2020.
21. Lamb YN, Deeks ED. Sarilumab: a review in moderate to severe rheumatoid arthritis. *Drugs* 2018; 78(9): 929-940.
22. Karkhur S, Hasanreisoglu M, Vigil E, et al. Interleukin-6 inhibition in the management of non-infectious uveitis and beyond. *J Ophthalmic Inflamm Infect* 2019; 9(1): 17.
23. Tisoncik JR, Korth MJ, Simmons CP, et al. Into the eye of the cytokine storm. *Microbiol Mol Biol Rev* 2012; 76(1): 16-32.
24. Rigante D. A systematic approach to autoinflammatory syndromes: a spelling booklet for the beginner. *Expert Rev Clin Immunol* 2017; 13(6): 571-597.
25. Shakoory B, Carcillo JA, Chatham WW, et al. Interleukin-1 receptor blockade is associated with reduced mortality in sepsis patients with features of macrophage activation syndrome: reanalysis of a prior phase III trial. *Crit Care Med* 2016; 44(2): 275-281.
26. Wang W, Ye L, Li B, et al. Up-regulation of IL-6 and TNF-alpha induced by SARS-coronavirus spike protein in murine macrophages via NF-kappaB pathway. *Virus Res* 2007; 128(1-2): 1-8.
27. Channappanavar R, Fehr AR, Vijay R, et al. Dysregulated type I interferon and inflammatory monocyte-macrophage responses cause lethal pneumonia in SARS-CoV-infected mice. *Cell Host Microbe* 2016; 19(2): 181-193.
28. Mitoma H, Horiuchi T, Tsukamoto H, et al. Mechanisms for cytotoxic effects of anti-tumor necrosis factor agents on transmembrane tumor necrosis factor alpha-expressing cells: comparison among infliximab, etanercept, and adalimumab. *Arthritis Rheum* 2008; 58(5): 1248-1257.
29. Assaad HS, Assaad-Khalil S. Imatinib, a tyrosine kinase inhibitor: a potential treatment for SARS-COV-2 induced pneumonia. *Alexandria Journal of Medicine* 2020; 56(1): 68-72.
30. Galimberti S, Baldini C, Barate C, et al. The CoV-2 outbreak: how hematologists could help to fight Covid-19. *Pharmacol Res* 2020; 157: 104866.
31. Aman J, van Bezu J, Damanafshan A, et al. Effective treatment of edema and endothelial barrier dysfunction with imatinib. *Circulation* 2012; 126(23): 2728-2738.
32. Coleman CM, Sisk JM, Mingo RM, et al. Abelson kinase inhibitors are potent inhibitors of severe acute respiratory syndrome coronavirus and Middle East respiratory syndrome coronavirus fusion. *J Virol* 2016; 90(19): 8924-8933.
33. Roschewski M, Lionakis MS, Sharman JP, et al. Inhibition of Bruton tyrosine kinase in patients with severe COVID-19. *Sci Immunol* 2020; 5(48): eabd0110.
34. Spiegel S, Milstien S. The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity. *Nat Rev Immunol* 2011; 11(6): 403-415.
35. Teijaro JR, Walsh KB, Cahalan S, et al. Endothelial cells are central orchestrators of cytokine amplification during influenza virus infection. *Cell* 2011; 146(6): 980-991.
36. Teijaro JR, Walsh KB, Rice S, et al. Mapping the innate signaling cascade essential for cytokine storm during influenza virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111(10): 3799-3804.
37. Russell CD, Millar JE, Baillie JK. Clinical evidence does not support corticosteroid treatment for 2019-nCoV lung injury. *Lancet* 2020; 395(10223): 473-475.
38. Horby P, Lim WS, Emberson JR, et al. Dexamethasone in hospitalized patients with Covid-19 - preliminary report. *N Engl J Med* 2020. doi: 10.1056/NEJMoa2021436

39. Zimmermann P, Ziesenitz VC, Curtis N, et al. The immunomodulatory effects of macrolides - A systematic review of the underlying mechanisms. *Front Immunol* 2018; 9: 302.
40. Homolak J, Kodvanj I. Widely available lysosome targeting agents should be considered as potential therapy for COVID-19. *Int J Antimicrob Agents* 2020. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.106044
41. Liu J, Cao R, Xu M, et al. Hydroxychloroquine, a less toxic derivative of chloroquine, is effective in inhibiting SARS-CoV-2 infection in vitro. *Cell Discov* 2020; 6: 16.
42. Ben-Zvi I, Kivity S, Langevitz P, et al. Hydroxychloroquine: from malaria to autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol* 2012; 42(2): 145-153.
43. Schrezenmeier E, Dörner T. Mechanisms of action of hydroxychloroquine and chloroquine: implications for rheumatology. *Nat Rev Rheumatol* 2020; 16(3): 155-166.
44. WHO. Q&A: Hydroxychloroquine and COVID-19. <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/q-a-hydroxychloroquine-and-covid-19>. Dostop: 20. julij 2020.
45. EMA. COVID-19: reminder of the risks of chloroquine and hydroxychloroquine. <https://www.ema.europa.eu/en/news/covid-19-reminder-risks-chloroquine-hydroxychloroquine>. Dostop: 20. julij 2020.
46. Ramos-Casals M, Brito-Zeron P, Lopez-Guillermo A, et al. Adult haemophagocytic syndrome. *Lancet* 2014; 383(9927): 1503-1516.

IZZIVI IN PRIHODNOST DIAGNOSTIKE OKUŽBE S SARS-CoV-2

Doc. dr. Alenka Šmid, mag. farm., asist. dr. Jasna Omersel, mag. farm.

*Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana;
alenka.smid@ffa.uni-lj.si, jasna.omersel@ffa.uni-lj.si*

POVZETEK

Laboratorijska diagnostika ima v spopadanju s pandemijo covida-19 nedvomno velik pomen. Hitra in zanesljiva identifikacija okuženih oseb, ki omogoči njihovo izolacijo in nadaljnjo epidemiološko poizvedovanje, predstavlja enega ključnih korakov pri zaustavljanju širjenja pandemije in omogoča boljšo klinično obravnavo bolnikov. Določanje protiteles proti SARS-CoV-2 v vzorcih posameznikov pa po drugi strani omogoča napredek v razumevanju imunskega odziva na okužbo s SARS-CoV-2. Slednje je ključnega pomena pri razvoju cepiv in terapevtskih pristopov, omogoča spremljanje razširjenosti okužbe in ugotavljanje učinkovitosti preventivnih ukrepov. Vloga laboratorijske diagnostike je, da izbira najboljše metode, ki so v danem trenutku na razpolago in zagotavljajo kvalitetne, zanesljive rezultate v najkrajšem možnem času. V prispevku predstavljamo različne metode za ugotavljanje prisotnosti okužbe s SARS-CoV-2 z analizo virusne RNA in metode za ugotavljanje prebolele okužbe z merjenjem protiteles proti virusnim antigenom. Posebno se posvečamo tudi razpravi o klinični uporabnosti rezultatov posameznih testov za uspešno obvladovanje pandemije SARS-CoV-2 in predstavljamo njihove prednosti in omejitve.

VSEBINA

1 UVOD

2 POTEK OKUŽBE IN IMUNSKI ODZIV NA OKUŽBO S SARS-CoV-2

3 PRINCIPI METOD V LABORATORIJSKI DIAGNOSTIKI SARS-CoV-2

3.1 Metode za detekcijo virusne RNA

3.1.1 Vzorci

3.1.2 Referenčna metoda za dokaz okužbe s SARS-CoV-2

3.1.3 Novejše (hitre) metode za dokaz okužbe s SARS-CoV-2

3.1.4 Klinični pomen rezultatov

3.2 Serološke metode za dokazovanje prisotnosti protiteles proti SARS-CoV-2

3.2.1 Encimsko imunske metode na trdnem nosilcu (ELISA)

3.2.2 Imunokromatografske metode (hitri testi)

3.2.3 Klinični pomen rezultatov

4 SKLEP

5 ZAHVALA

6 LITERATURA

1 UVOD

Pandemija covid-19 je že v svojih začetnih fazah posegla tudi na področje laboratorijske diagnostike in do danes vplivala na bliskovit razvoj novih metod, hiter odziv regulatornih organov, pripravo nacionalnih smernic in iskanje novih laboratorijskih rešitev z namenom obvladovanja različnih stopenj pandemije. V pandemiji covid-19 je laboratorijska diagnostika potrebna za:

- potrditev diagnoze covid-19 pri simptomatskih pacientih, ki so zato lahko pravočasno napoteni v izolacijo ali nadaljnjo klinično obravnavo,
- testiranje simptomatskih in asimptomatskih posameznikov, ki so bili v kontaktu z okuženo osebo, ki že ima potrjeno diagnozo covid-19,
- določitev posameznikove odpornosti (imunosti) na SARS-CoV-2,
- bazične raziskave imunskega odziva ob okužbi s SARS-CoV-2 in razvoj cepiv,
- identifikacijo posameznikov, ki so razvili močan protitelesni imunski odziv na okužbo in bi lahko bili darovalci rekonvalescentnega seruma za terapijo,
- spremljanje razširjenosti okužbe in določitev prevalece virusa v populaciji,
- spremljanje učinkovitosti preventivnih ukrepov in z epidemijo povezanih nacionalnih strategij.

Vloga medicinskih laboratorijev je, da v danem trenutku izbirajo najboljše metode, s katerimi zagotavljajo kakovostne in zanesljive rezultate ter s tem omogočijo hitrejšo in učinkovito obravnavo pacienta. Laboratorijske metode, reagenti in pripomočki uporabljeni v Evropski uniji morajo biti skladni z zakonodajo na področju (oznaka CE) in validirani kot *in vitro* diagnostični medicinski pripomoček (oznaka IVD).

Pri vrednotenju analize metode sta pomembni lastnosti analiza občutljivost in analiza specifičnost. Prva je definirana kot najmanjša sprememba količine merjenja, ki jo v nekem koncentracijskem območju še določimo. Kot oblika analize občutljivosti je lahko obravnavana denimo meja zaznavanja ali meja detekcije. Analiza specifičnost je definirana s sposobnostjo določiti samo željeni merjenec v mešanici različnih merjencev. Zaradi heterogenosti merjencev je analiza specifičnost lahko problematična zlasti na področju imunokemijskih metod, ki jih opisujemo v nadaljevanju. Vrednotenje rezultatov diagnostičnih metod je po drugi strani vezano na njihovo uporabnost v klinični obravnavi pacienta. Pri vrednotenju rezultatov (*Slika 1*) je pomembna klinična učinkovitost, t.j. ali lahko z njimi ločujemo med skupinami zdravih in bolnih ter med skupinami bolnih s podobnimi boleznimi. Klinična učinkovitost testov je pri okužbi s SARS-CoV-2 še posebej pomembna, saj je osnovno reprodukcijsko število, ki je merilo nalezljivosti kužne bolezni, precej visoko, simptomi bolezni covid-19 pa zelo nespecifični in podobni številnim drugim respiratornim infektom.

Prva metoda za dokazovanje prisotnosti virusa je bila objavljena 16. januarja 2020, le 3 dni po objavi genoma SARS-CoV-2. Število molekularnih in seroloških testov, ki prihajajo na tržišče pa še vedno iz dneva v dan narašča. Do 1. septembra 2020 je bilo na seznamu fundacije FIND (neprofitna organizacija, ki spodbuja inovacije in razvoj diagnostike) vpisanih kar 193 CE-IVD certificiranih metod za molekularno

diagnostiko okužbe s SARS-CoV-2 in 240 seroloških metod (CE-IVD) za dokazovanje prisotnosti protiteles. Nove tehnološke rešitve so na trg že postavile metode dokazovanja okužbe ali imunskega odziva nanjo, ki dajejo rezultat v nekaj urah ali minutah. Med serološkimi metodami pa naj bi bilo po teh podatkih dostopnih že vsaj 157 metod, ki jih uvrščamo med hitre diagnostične teste (1).

Klinična (diagnostična) specifičnost: definirana je kot delež zdravih, pri katerih je rezultat testa normalen. $\text{Klinična specifičnost} = \frac{\text{število resnično negativnih rezultatov}}{\text{število resnično negativnih} + \text{število lažno negativnih}}$
Klinična (diagnostična) občutljivost: definirana je kot delež bolnih, pri katerih je rezultat testa patološki. $\text{Klinična občutljivost} = \frac{\text{število resnično pozitivnih rezultatov}}{\text{število resnično pozitivnih} + \text{število lažno negativnih}}$
Pozitivna napovedna vrednost testa (PNV): definirana kot delež preiskovancev s patološkim izvidom, ki imajo bolezen. Napove verjetnost, da bo preiskovanec ob pozitivnem testu res imel določeno bolezen. $\text{Pozitivna napovedna vrednost (PNV)} = \frac{\text{št.resnično pozitivnih rezultatov}}{\text{št.resnično pozitivnih rezultatov} + \text{število lažno pozitivnih rezultatov}}$ $\text{PNV} = \frac{\text{prevalenca} \times \text{klinična občutljivost}}{\text{prevalenca} \times \text{klinična občutljivost} + (1 - \text{prevalenca}) \times (1 - \text{klinična specifičnost})}$
Negativna napovedna vrednost (NNV): definirana kot delež preiskovancev z normalnim izvidom, brez znakov bolezni. Napove verjetnost, da preiskovanec ob negativnem testu res nima bolezni. $\text{Negativna napovedna vrednost (NNV)} = \frac{\text{št.resnično negativnih rezultatov}}{\text{št.resnično negativnih rezultatov} + \text{število lažno negativnih rezultatov}}$ $\text{NNV} = \frac{(1 - \text{prevalenca}) \times \text{klinična specifičnost}}{(1 - \text{prevalenca}) \times \text{klinična specifičnost} + \text{prevalenca} \times (1 - \text{klinična specifičnost})}$

Slika 1. Definicije pojmov, ki jih uporabljamo pri kliničnem vrednotenju diagnostičnih testov s prikazanimi enačbami za izračun vrednosti posameznega parametra.

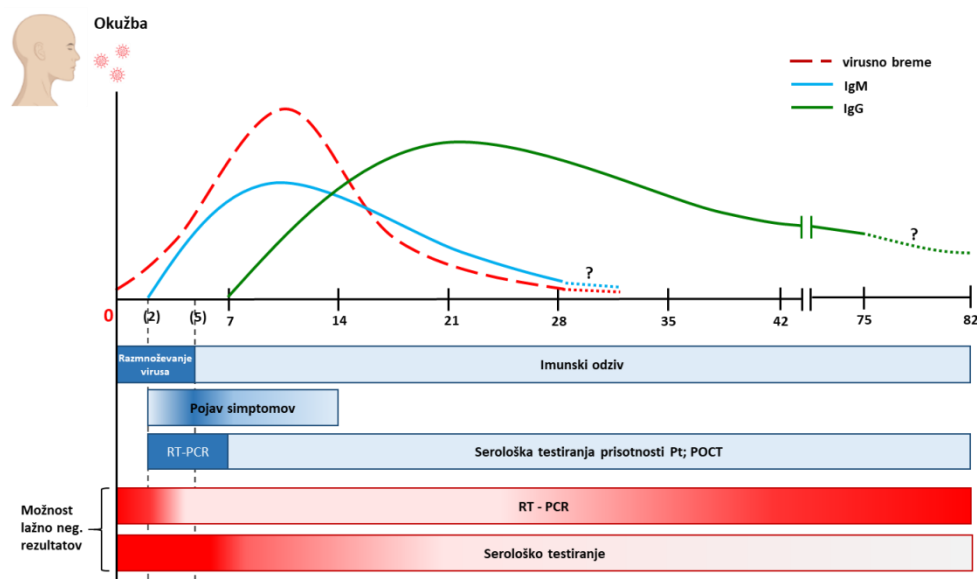
V primeru laboratorijske diagnostike tehnologija zagotovo ni več omejitev. Izzivi, ki nas čakajo na področju biologije/biokemije, so poznavanje značilnosti podvrste koronavirusa SARS-CoV-2, saj bo s tem možno pridobiti ustrezen material, ki služi za postavljanje novih laboratorijskih metod. Neposredno na področju diagnostike pa ostaja izziv pridobivanje kvalitetnega biološkega materiala, vzorčenje pacienta v ustreznem časovnem obdobju in razumevanje kliničnega pomena rezultata.

2 POTEK OKUŽBE IN IMUNSKI ODZIV NA OKUŽBO S SARS-CoV-2

Okužba z virusom SARS-Cov-2 se po do sedaj znanih podatkih običajno zgodi, ko kapljice izločkov okuženega preko neposrednega ali posrednega, običajno tesnega kontakta, dosežejo dihalne poti ali očesno sluznico druge osebe. Virus se nato preko receptor-vezavne domene (RBD) proteina S (*angl. spike protein*) veže na humani receptor – encim angiotenzin konvertaza 2 (ACE2), ki se nahaja na površini gostiteljske celice. Humane proteaze (furin, TMPRSS2) nato cepijo protein S, čemur sledi zlitje virusne membrane s celično in posledično vstop virusne RNA v celico. Tam se virus razmnožuje in izstopi iz celice ter se tako zopet znajde in zadržuje na površini sluznic. (2, 3). Posledica vstopa, dozorevanja virusa in sproščanja virusnih delcev je piroptoza, posebna oblika programirane celične smrti. Ta sproži aktivacijo okoliških celic

epitelija, endotelija in alveolarnih makrofagov, da izločajo kemokine in vnetne citokine, kar vodi v privabljanje monocitov, makrofagov in limfocitov na mesto vnetja v pljučih (3). Prvi odziv je torej aktivacija prirojenega imunskega odziva. Temu sledi aktivacija pridobljenega imunskega sistema, ki se pri bolnikih s covidom-19 pokaže po približno enem tednu od nastopa simptomov (4). Aktivacija citotoksičnih limfocitov T vodi neposredno do smrti okužene celice, aktivirane dendritične celice in celice T pomagalka pa še dodatno aktivirajo tako citotoksične limfocite T, kot tudi limfocite B, sočasno se sproži sinteza vnetnih citokinov. Aktivirani limfociti B posredujejo humoralno imunost v obliki specifičnih protiteles (5). Razvoj protiteles proti SARS-CoV-2 je načeloma hiter in v skladu z dinamiko virusnega bremena (4). Pri bolnikih s covidom-19 so detektirali serokonverzijo (protitelesni imunski odziv) v prvem tednu po nastopu simptomov okužbe, najprej v obliki nizkoafinitetnih protiteles IgM, v drugem tednu so prevladala IgG, katerih titer naj bi vrh dosegel po 3-4 tednih (4, 6, 7). Long s sodelavci je v raziskavi na 285 bolnikih pri vseh dokazal specifična protitelesa v tretjem tednu od pojava simptomov covida-19 in potek serokonverzije na tri načine: IgM pred IgG, IgG sočasno z IgM in IgM za IgG. Koncentracija IgM oz. IgG je plato dosegla šest dni po serokonverziji, razlike med bolniki z najvišjo in najnižjo koncentracijo pa so bile kar do dvajsetkratne, ob čemer pa koncentracija ni nujno korelirala s kliničnimi znaki (4). Za dolgotrajno imunost proti SARS-CoV-2 so potrebna nevtralizacijska protitelesa, usmerjena proti površinskim antigenom. V primeru SARS-CoV-2 je ključen antigen protein S, ki je odgovoren za vstop virusa v celice. Nasprotno so raziskave covida-19 pokazale, da visoke koncentracije protiteles v akutni fazi okužbe (prva dva tedna) lahko poslabšajo vnetje in vodijo v prizadetost organov preko s protitelesi posredovanega ojačanja imunskega odziva, to pa naj bi po nekaterih raziskavah pomenilo težji klinični potek bolezni (4, 8). Na *Sliki 2* je shematsko prikazan približen časovni potek pojava, naraščanja in upada virusnega bremena in dinamika protitelesnega odziva po okužbi z virusom.

Trenutno še ni znano, ali preboleli ostanejo dolgotrajno odporni proti SARS-CoV-2 (4, 10). V zadnjih mesecih je bilo potrjenih tudi nekaj ponovnih okužb. Z vidika imunskega odziva je to seveda mogoče v primeru, da gre za osebe z imunsko pomankljivostjo, ki niso razvile zadostnega protitelesnega odziva ali napake v celičnem imunskem odzivu. Dosedanje študije so namreč potrdile, da je za trajno imunost proti SARS-CoV-2 zagotovo pomemben tudi učinkovit celični imunski odziv (11), ki ga vršijo štiri podvrste limfocitov T: (i) celice T pomagalka (CD4), ki sodelujejo z limfociti B pri proizvodnji nevtralizacijskih protiteles, (ii) citotoksični limfociti T (CD8), ki lahko neposredno uničijo z virusom okuženo celico ter (iii) regulatorne T celice in limfociti Th-17, ki usmerjajo in regulirajo vnetni odziv.



Slika 2. Prikaz časovnega poteka pojava, naraščanja in upada virusnega bremena in dinamika protitelesnega odziva IgG in IgM po okužbe s SARS-CoV-2 ter klinična možnost lažno negativnih rezultatov molekularnih (RT-PCR) in seroloških testov v posamezni fazi okužbe (svetlejši deli prikazujejo manjšo verjetnost za lažno negativni rezultat, temnejši pa večjo verjetnost). Prirejeno po (7, 9).

3 PRINCIPI METOD V LABORATORIJSKI DIAGNOSTIKI SARS-CoV-2

3.1 Metode za detekcijo virusne RNA

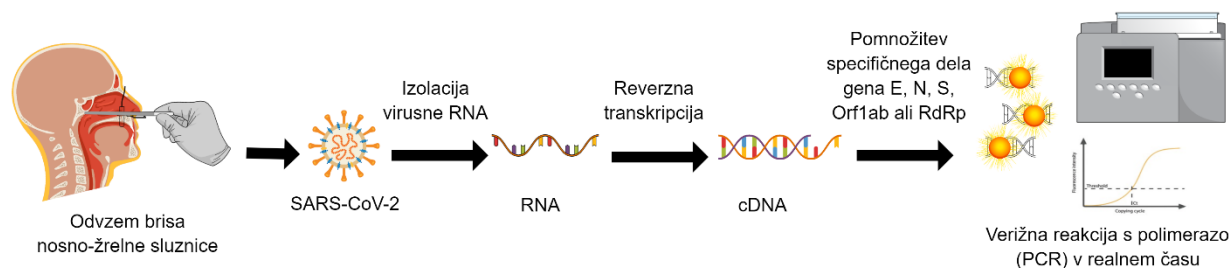
3.1.1 Vzorci

Prisotnost virusa oziroma okužbo s SARS-CoV-2 običajno ugotavljamo v vzorcih dihal, in sicer najpogosteje v vzorcih zgornjih dihal, kot sta bris ali izpirek nosno-žrelnega predela ali žrela. Vzorci spodnjih dihal, kot sta sputum in bronhoalveolarni izpirek, so za odvzem težavnejši, vendar so zaradi večjega virusnega bremena v prvih 2 tednih po okužbi v spodnjih dihalih, analize na teh vzorcih zanesljivejše. Poleg tega pri samem odvzemu obstaja večja možnost nastanka aerosola in posledično prenosa okužbe (12, 13). Nekateri novejši testi omogočajo tudi določanje virusne RNA v vzorcu sline (14), katerega zbiranje je ne-invazivno in tako za pacienta precej lažje, prijetnejše, zato lahko pričakujemo tudi večje sodelovanje (15).

3.1.2 Referenčna metoda za dokaz okužbe s SARS-CoV-2

Referenčna metoda za dokazovanje okužbe s SARS-CoV-2, ki jo priporočata Svetovna zdravstvena organizacija (SZO) in Evropski center za preprečevanje in obvladovanje bolezni (ECDC), temelji na uporabi verižne reakcije s polimerazo v realnem času s predhodno reverzno transkripcijo (RT-qPCR) (Slika 3). Z njo pomnožimo in kvantificiramo enega ali več tarčnih genov v genomu SARS-CoV-2, ki smo ga predhodno izolirali iz odvzetega vzorca zgornjih ali spodnjih dihal. Geni, ki jih določamo, kodirajo različne strukturne proteine, ki se nahajajo na površinski ovojnici (označujemo jih z E, N, S), pomožne proteine (Orf1ab) ali virusno od RNA

odvisno RNA-polimerazo (RdRp). Testni kompleti vsebujejo reagente za določitev vsaj dveh ali treh genov hkrati, le redki določajo prisotnost samo enega gena (12, 16). Z določitvijo več genov tudi zmanjšamo verjetnost za lažno negativni rezultat v primeru potencialne mutacije virusnega genoma na mestih, kamor se vežejo začetni oligonukleotidi, ki omogočijo pomnožitev tarčnih genov (17). Kot pozitivni kontrolni vzorec se uporablja standardizirana koncentracija specifičnega zaporedja RNA SARS-CoV-2, za negativno kontrolo pa voda brez RN-az in DN-az in negativni vzorec izolacije RNA, ki ga pripravimo iz neuporabljene palčke za odvzem brisa.



Slika 3. Prikaz metode RT-qPCR za določanje prisotnosti virusne RNA v vzorcu nosno-žrelnega brisa preiskovanca.

Metode, ki temeljijo na RT-qPCR, imajo visoko analizno specifičnost, t.j. sposobnost ločitve SARS-CoV-2 od drugih podobnih virusov (97–100%), in analizno občutljivost, saj z njimi lahko zaznamo zelo nizko koncentracijo virusne RNA (meja detekcije nekaterih testov je 1 do 10 kopij virusne RNA/reakcijo). Celoten analizni postopek skupaj z izolacijo virusne RNA iz vzorca traja od 3 do 5 ur, za izvedbo pa je potrebna posebna laboratorijska oprema in izkušeno osebje (16).

3.1.3 Novejše (hitre) metode za dokaz okužbe s SARS-CoV-2

Zaradi velike obremenitve laboratorijev, ki edini lahko izvajajo analizo z referenčno metodo, so države Evropske unije, Velika Britanija in Združene države Amerike spodbudile in investirale v razvoj novih testov, ki bi jih lahko izvajali izven specializiranih laboratorijev. Tako pospešeno razvijajo metode, ki bi omogočile hitrejšo in enostavnejšo izvedbo analize. Med temi so denimo zanimive metode za detekcijo virusne RNA, ki temeljijo na mehanizmu z zanko posredovanega izotermnega pomnoževanja z reverzno transkripcijo (RT-LAMP) in metode, ki temeljijo na uporabi tehnologije CRISPR/Cas.

Princip RT-LAMP temelji na pomnoževanju virusne RNA, ki je bila predhodno prepisana v komplementarno DNA z DNA polimerazo in uporabo 6 parov začetnih oligonukleotidov. Ti prepoznajo in se vežejo na tarčno zaporedje DNA in omogočijo pomnoževanje le-te preko tvorbe zank, ki poteka pri konstantni temperaturi, običajno okoli 60 °C. Analiza je končana v 30–60 minutah, za izvedbo ni potrebna draga oprema, rezultat pa je pri nekaterih testih možno odčitati tudi s prostim očesom preko spremembe barve reakcijske mešanice (18, 19). V zbirki FIND je bilo do sedaj zabeleženih 5 komercialnih testov z oznako CE-IVD, ki temeljijo na principu LAMP.

Med testi, ki temeljijo na uporabi tehnologije CRISPR/Cas, zaenkrat še ni nobenega z oznako CE-IVD. Je bil pa maja 2020 s strani ameriške Agencije za hrano in

zdravila odobren za uporabo v nujnih primerih prvi test iz te skupine, ki ga je razvilo podjetje Sherlock Biosciences (20). Princip temelji na uporabi encima Cas13a, ki se v prisotnosti predhodno pomnožene virusne RNA aktivira in jo cepi, hkrati pa cepi tudi fluorescentno označene sonde, ki so prisotne v reakcijski mešanici. To vodi v porast fluorescence vzorca, kar lahko zaznamo oz. merimo (21). Metoda je sposobna zaznati zelo nizke koncentracije virusne RNA - limita detekcije je 6,75 kopij RNA/ μ L transportnega medija (21). Analiza enako kot RT-LAMP poteka pri nespremenjeni temperaturi, zato za izvedbo ne potrebujemo drage opreme.

Poleg metod, ki temeljijo na novejših tehnologijah in principih, pa se v smer poenostavitve in krajše ter cenejše izvedbe, razvijajo tudi različice testov, ki temeljijo na RT-PCR. Tako se na tržišču že pojavljajo tudi manjši, prenosni in cenejši sistemi za izvedbo RT-PCR, pri katerih so vsi reagenti spravljani v kartuši za enkratno uporabo, rezultat pa je po nanosu vzorca v kartušo na voljo že v 30–45 minutah (22, 23).

3.1.4 Klinični pomen rezultatov

Ne glede na zelo visoko analizo občutljivost in specifičnost opisanih testov je pomembno razumeti tudi njihove omejitve oziroma njihov klinični pomen. Lažno negativni ali lažno pozitivni rezultat ima namreč neželene posledice tako za ljudi kot javno zdravje. Lažno pozitivni rezultati lahko vodijo v odrejanje nepotrebne karantene za ljudi, ki niso okuženi. Po drugi strani pa lažno negativni rezultati pri okuženi osebi lahko predstavljajo nevarnost za hitrejše širjenje bolezni, saj okuženi ni pravočasno poslan v osamitev, poleg tega pa lahko dobi tudi lažen občutek varnosti in se posledično vede manj samozaščitno.

Rezultati testov so zlasti uporabni v primeru, ko so pozitivni, saj to z veliko gotovostjo potrdi prisotnost okužbe. Manj uporabni so negativni rezultati, saj le-ti nujno ne izključujejo prisotnosti okužbe s SARS-CoV-2. Lažno pozitivnih rezultatov je manj kot lažno negativnih, do njih pa pride v primeru navzkrižne kontaminacije vzorca med rokovanjem ali do kontaminacije med vzorci različnih pacientov (16). Občutno več je lažno negativnih rezultatov, do katerih lahko pride zaradi variabilnih količin virusa (t.i. virusnega bremena) v zgornjih dihalih v posameznih stopnjah okužbe. Virusno breme je namreč nižje v zgodnji fazi okužbe, pred samim pojavom simptomov ter v fazi odstranjevanja virusa, kot je prikazano na *Sliki 2*, zato je takrat povečano tveganje za lažno negativni rezultat. Poleg tega lahko lažno negativni rezultat dobimo, ko je vzorec neprimerno odvzet ali se je z vzorcem nepravilno ravnilo (16). V primeru, da pri pacientu obstaja močan sum na okužbo, je zato priporočljivo ponovno testiranje, ki ga, če je to le možno, izvedemo na vzorcu iz spodnjih dihal (13).

V splošnem lahko povzamemo, da je klinična občutljivost metod, ki ugotavljajo prisotnost virusne RNA, odvisna tako od načina in mesta odvzema vzorca (bris, sputum, bronho-alveolarni izpirek) kot tudi od stopnje okužbe, hitrosti razmnoževanja virusa in hitrosti odstranjevanja virusa iz sluznic (16).

3.2 Serološke metode za dokazovanje prisotnosti protiteles proti SARS-CoV-2

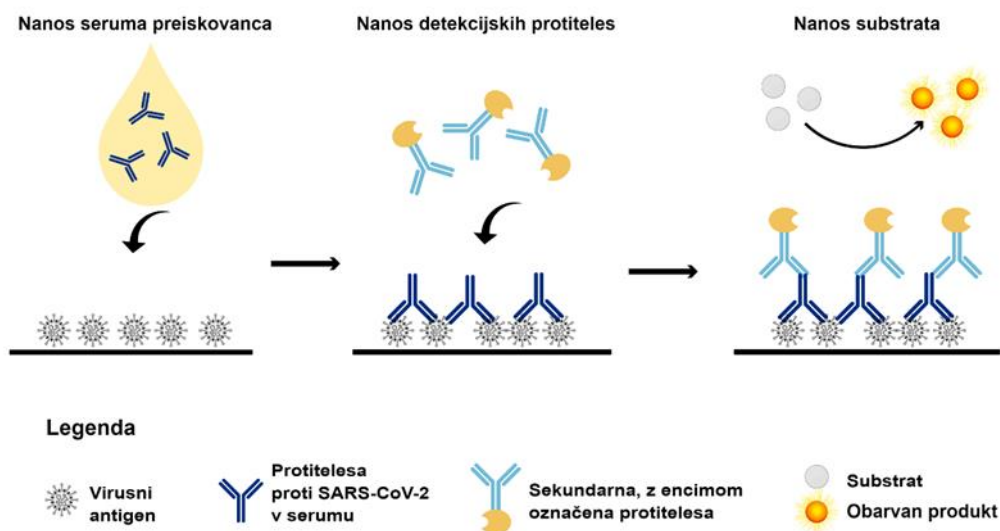
Za dokazovanje prisotnosti protiteles proti SARS-CoV-2 so danes na trgu številni analizni kompleti, ki temeljijo na encimsko-imunski tehniki na trdnem nosilcu.

Metode, ki so namenjene izvedbi v laboratoriju zahtevajo posebno opremo, ki omogoči spektrofotometrično ali elektrokemiluminescenčno detekcijo signala, omenjeni hitri testi pa bodo omogočili testiranje izven laboratorija in bodo namenjeni pridobivanju rezultata ob preiskovancu (POCT analize) (npr. v urgentnih enotah, pred operacijo) ali samotestiranju na domu.

3.2.1 Encimsko imunske metode na trdnem nosilcu (ELISA)

Metoda ELISA temelji na specifični interakciji med antigenom (npr. protein virusne ovojnice) in protitelesom v serumu preiskovanca (*Slika 4*). V primeru okužbe s SARS-CoV-2 metodo ELISA uporabljamo predvsem za določanje prisotnosti specifičnih protiteles IgG in IgM, ki nastanejo kot odziv na okužbo s SARS-CoV-2.

Uporabljen biološki material je serum, ki ga pridobimo s postopkom centrifugiranja iz venske krvi preiskovanca. Priprava vzorca traja približno 30 min, sama analiza vzorca pa približno 20 min. Kot antigen sta v trenutnih različicah metod ELISA uporabljena dva površinska proteina SARS-CoV-2: rekombinantni protein jedrne ovojnice (N) ali »spike« protein (S1 podenota ali domena za vezavo receptorja (RBD)). Predvsem domena RBD naj bi bila značilna za SARS-CoV-2, kar je iz vidika analize specifičnosti pomembno za ločevanje novega seva koronavirusa od predhodnih (24, 25). Pri uporabi teh proteinov kot antigenov se je namreč potrebno zavedati potencialne navzkrižne reaktivnosti preiskovančevih protiteles proti običajno krožečim α - (NL63 in 229E) in β -koronavirusom (OC43 in HKU1), ki so v našem prostoru stalno prisotni. Ravno okoli potencialne navzkrižne reaktivnosti se trenutno vrti največ pomislekov glede specifičnosti serološkega testiranja na protitelesa proti SARS-CoV-2 (24, 26).



Slika 4. Princip metode ELISA za določanje prisotnosti protiteles IgG in IgM v serumu preiskovanca s prisotno okužbo s SARS-CoV-2.

3.2.2 Imunokromatografske metode (hitri testi)

Hitri testi za dokazovanje prisotnosti protiteles proti SARS-CoV-2 so v nekaj mesecih od pojava covid-19 dobesedno preplavili vse svetovne trge. Med hitrimi testi za dokazovanje okužbe s SARS-CoV-2 najhitreje razvijajo imunokromatografske teste za določanje protivirusnih protiteles (IgM in IgG) v polni kapilarni krvi, serumu ali plazmi (27). Osnovna reakcija med antigenom na nosilcu in protitelesom v krvi preiskovanca ostaja enaka kot pri metodi ELISA. Uporabljen biološki material je kapilarna kri, običajno odvzeta iz prsta, rezultat pa pridobimo v času 10 do 30 minut (26). Cenovno so relativno dostopni, zato priljubljenost uporabe v družbi narašča.

Značilnost metodologije omogoča pripravo analiznega kompleta, ki je majhen, prenosljiv, enostaven za uporabo, zato ga lahko uporabljamo tudi za POCT analize ali samotestiranje. Stroka na (samo)testiranje s trenutno dostopnimi hitrimi testi gleda kritično, saj ti testi v mnogih primerih niso bili validirani na ustreznih skupinah bolnikov oz. zdravih oseb, da bi lahko realno ocenili kvaliteto rezultatov z vidika klinične občutljivosti oz. specifičnosti. Prav tako bi bila interpretacija rezultata prepuščena preiskovancu. Po sedanjih študijah je bilo na trgu zaznanih in posledično odpoklicanih kar nekaj testov zaradi velike verjetnosti za lažno negativne rezultate (količina prisotnih protiteles je pod pragom detekcije) ali lažno pozitivne rezultate (npr. v primeru pretekle okužbe z drugo vrsto koronavirusa (SARS-CoV, MERS-CoV)). Kljub temu pa so raziskave in razvoj hitrih kakovostnih diagnostičnih testov, ki bi lahko doprinesle k dostopnejšim, cenejšim in hitrejšim pristopom obvladovanja in spremljanja pandemij, ena izmed prioritet na seznamu SZO (28). Predvsem bi lahko imeli velik pomen v državah v razvoju, kjer je zaradi visoke cene molekularno testiranje omejeno ali pa zaradi tehnoloških zmogljivosti sploh ni možno. Prav tako bi lahko imele velik doprinos k hitrejši diagnostični obravnavi v urgentnih enotah in enotah patronažne službe.

3.2.3 Klinični pomen rezultatov

Učinkovitost seroloških metod za zgodnje diagnosticiranje covid-19 je zelo omejena. Kdaj lahko zaznamo prisotna protitelesa proti SARS-CoV-2, je odvisno od posameznikovega imunskega odziva na SARS-CoV-2 in od analize občutljivosti uporabljene metode.

Izvedba metode ELISA SARS-CoV-2, ki jo uporabljajo nekateri osrednji slovenski laboratoriji, izkazuje 99,81% klinično specifičnost (95% interval zaupanja) in 88,1 oz. 100% klinično občutljivost (95% interval zaupanja), v primeru, da so bili vzorci seruma testirani po sedmem oz. po štirinajstem dnevu po potrjeni okužbi s RT-qPCR (26). V tem času namreč že pričakujemo imunski odziv (serokonverzijo) pri večini preiskovancev, tako se izognemo možnosti lažno negativnega rezultata zaradi neprimerne vzorca. Zadnje primerjalne študije testiranja dinamike imunskega odziva nakazujejo tudi na pomembno razliko v hitrosti nastajanja in ohranjanju specifičnih protiteles pri posameznikih. In sicer bi naj anti-N-protein protitelesa IgG koncentracijski plato dosegla že po petih dneh in močno upadla že po enem mesecu, medtem ko bi anti-S-protein protitelesa IgG lahko bila tista, ki se sicer razvijejo kasneje, a v večjih koncentracijah in so morda prisotna skozi daljše obdobje (9). Zaradi

raznolikosti v dinamiki imunskega odziva in interindividualne raznolikosti, nekatere smernice priporočajo vzporedno testiranje: anti-N-protein IgG za diagnostiko covid-19 in anti-S-protein IgG za epidemiološke študije.

Protitelesni odziv ni primeren za oceno, ali je preiskovana oseba v danem trenutku kužna ali ne. Prav tako serološka testiranja niso priporočljiva za potrjevanje okužbe pri asimptomatskih okuženih preiskovancih, saj bi test zaradi verjetno nizke koncentracije protiteles dal lažno negativen rezultat. Kar lahko z gotovostjo trdimo je, da pri zanesljivih, ustrezno validiranih seroloških metodah negativen rezultat lahko kaže na odsotnost predhodne izpostavljenosti virusu ali pa na odsotnost imunskega odziva: oseba je bila lahko izpostavljena virusu, do serokonverzije pa še ni prišlo ali pa v manjšem obsegu, zato protiteles v krvi (še) ni mogoče zaznati. Nasprotno pa pozitiven rezultat testiranja na protitelesa IgM proti SARS-CoV-2 pomeni nedavno, akutno, okužbo, prisotnost IgG pa akutno ali že prebolelo okužbo (24). Glede na trenutno znanje prisotnost katerikoli protiteles ne pomeni nujno tudi trajne imunosti.

4 SKLEP

Laboratorijska diagnostika se je hitro odzvala na pandemijo. Razvoj metod je bil hitrejši kot kadarkoli prej, seveda pa imajo vse omenjene metode svoje omejitve. Rezultate je potrebno interpretirati kritično in z velikim poznavanjem medicinskega in analitskega ozadja.

Iz pregleda trenutnega stanja lahko ugotovimo, da so izzivi v diagnostiki okužbe s SARS-CoV-2 vezani tako na pred-analizno fazo (odvzem in rokovanje z vzorci), analizno fazo (analizna specifičnost, čas do izdaje izvida) in post-analizno fazo (način in hitrost sporočanja rezultatov, pomen rezultatov za posameznika in družbo). Ob ponovnem večjem razširjanju okužb s SARS-CoV-2 bo hitrost analiziranja vzorcev izjemnega pomena. Ta je delno pogojena s samim potekom okužbe, v veliki meri pa odvisna oziroma omejena s kapaciteto ustrezno opremljenih laboratorijev za testiranje posameznikov s sumom na okužbo. Poleg pospešenega razvoja in boljše dostopnosti hitrih testov za dokazovanje prisotnosti virusne RNA, se ob povečanih potrebah po številčnejšem testiranju pogosto omenja tudi strategija združevanja vzorcev (t.i. »pooling«), ki bi bistveno zvečala kapaciteto narejenih testov, predvsem tudi na območjih, na katerih primanjkuje laboratorijev in ustrezne opreme (29).

Z bazičnimi raziskavami bo poznavanje virusa in njegovega delovanja v telesu vse večje. Tudi to bo omogočilo razvoj seroloških metod, predvsem hitrih testov, ki bodo imele bolj primerljive vrednosti klinične občutljivosti in specifičnosti z metodo ELISA. Poznavanje dinamike imunskega odziva na okužbo SARS-CoV-2 pri sicer zdravi populaciji in morebitne specifičnosti pri ranljivih skupinah pa bo vodilo do učinkovitejše klinične obravnave pacientov. Trenutno se po potrditvi okužbe za diagnostiko covid-19 priporoča sočasno spremljanje več analitov, katerih vrednosti so deloma lahko odraz stopnje bolezni, analizira se tudi pomen novih bioloških označevalcev (29). Zaradi kompleksnosti imunskega odziva na okužbo, tako humuralnega kot celičnega, pa bomo na odgovor o tem, ali specifične imunske celice ali protitelesa posredujejo trajno imunost, morali še počakati.

5 ZAHVALA

Avtorici se zahvaljujeva asist. Taji Zore, mag. lab. biomed., za pomoč pri pripravi slikovnega materiala in vsem sodelavcem za poglobljene diskusije o predstavljeni tematiki.

6 LITERATURA

1. SARS-CoV-2 diagnostic pipeline [Internet]. FIND. Available from: <https://www.finddx.org/covid-19/pipeline/>. Datum dostopa: 4.9.2020.
2. Shang J, Wan Y, Luo C, Ye G, Geng Q, Auerbach A, et al. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci*. 2020 May 26;117(21):11727–34.
3. Cyranoski D. Profile of a killer: the complex biology powering the coronavirus pandemic. *Nature*. 2020 May 4;581(7806):22–6.
4. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(6):363–74.
5. Nikolich-Zugich J, Knox KS, Rios CT, Natt B, Bhattacharya D, Fain MJ. SARS-CoV-2 and COVID-19 in older adults: what we may expect regarding pathogenesis, immune responses, and outcomes. *GeroScience*. 2020 Apr 10;1–10.
6. di Mauro Gabriella, Cristina S, Concetta R, Francesco R, Annalisa C. SARS-Cov-2 infection: Response of human immune system and possible implications for the rapid test and treatment. *Int Immunopharmacol*. 2020 Jul;84:106519.
7. Iyer AS, Jones FK, Nodoushania A, Kelly M, Becker M, Slater D, et al. Dynamics and significance of the antibody response to SARS-CoV-2 infection. *medRxiv*. 2020 Jul 20;2020.07.18.20155374.
8. Long Q-X, Liu B-Z, Deng H-J, Wu G-C, Deng K, Chen Y-K, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med*. 2020;26(6):845–8.
9. Caruana G, Croxatto A, Coste AT, Opota O, Lamothe F, Jatton K, et al. Diagnostic strategies for SARS-CoV-2 infection and interpretation of microbiological results. *Clin Microbiol Infect*. 2020 Sep 1;26(9):1178–82.
10. Wu F, Wang A, Liu M, Wang Q, Chen J, Xia S, et al. Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in a COVID-19 recovered patient cohort and their implications. 2020 Apr 6; Available from: <https://europepmc.org/article/ppr/ppr139479>. Datum dostopa: 3.9.2020
11. Sewell HF, Agius RM, Stewart M, Kendrick D. Cellular immune responses to covid-19. *BMJ* [Internet]. 2020 Jul 31 [cited 2020 Sep 3];370. Available from: <https://www.bmj.com/content/370/bmj.m3018>
12. Udugama B, Kadhiresan P, Kozlowski HN, Malekjahani A, Osborne M, Li VYC, et al. Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection. *ACS Nano*. 2020 Apr 28;14(4):3822–35.
13. Organization WH. Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance, 2 March 2020. 2020; Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331329>. Datum dostopa: 2.9.2020
14. Commissioner O of the. Coronavirus (COVID-19) Update: FDA Authorizes First Diagnostic Test Using At-Home Collection of Saliva Specimens [Internet]. FDA. FDA; 2020. Available from: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-authorizes-first-diagnostic-test-using-home-collection-saliva>. Datum dostopa: 3.9.2020
15. Fakheran O, Dehghannejad M, Khademi A. Saliva as a diagnostic specimen for detection of SARS-CoV-2 in suspected patients: a scoping review. *Infect Dis Poverty*. 2020 Jul 22;9(1):100.
16. Kubina R, Dziedzic A. Molecular and Serological Tests for COVID-19. A Comparative Review of SARS-CoV-2 Coronavirus Laboratory and Point-of-Care Diagnostics. *Diagnostics* [Internet]. 2020 Jun 26;10(6). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7345211/>. Datum dostopa: 1.9.2020.
17. Khailany RA, Safdar M, Ozaslan M. Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2. *Gene Rep*. 2020 Jun;19:100682.
18. Kashir J, Yaqinuddin A. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) assays as a rapid diagnostic for COVID-19. *Med Hypotheses*. 2020 Aug;141:109786.
19. Thi VLD, Herbst K, Boerner K, Meurer M, Kremer LP, Kirrmaier D, et al. A colorimetric RT-LAMP assay and LAMP-sequencing for detecting SARS-CoV-2 RNA in clinical samples. *Sci Transl Med*

- [Internet]. 2020 Aug 12; 12(556). Available from: <https://stm.sciencemag.org/content/12/556/eabc7075>. Datum dostopa: 1.9.2020.
20. Commissioner O of the. Coronavirus (COVID-19) Update: Daily Roundup May 7, 2020 [Internet]. FDA. FDA; 2020. Available from: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-daily-roundup-may-7-2020>. Datum dostopa: 1.9.2020.
 21. Patchsung M, Jantarug K, Pattama A, Aphicho K, Suraritdechachai S, Meesawat P, et al. Clinical validation of a Cas13-based assay for the detection of SARS-CoV-2 RNA. *Nat Biomed Eng*. 2020 Aug 26;1–10.
 22. Products [Internet]. Mesa Biotech.. Available from: <https://www.mesabiotech.com/products>. Datum dostopa: 1.9.2020.
 23. Cepheid | SARS-CoV-2-Test-Development-Information [Internet]. Available from: <https://www.cepheid.com/coronavirus>. Datum dostopa: 1.9.2020.
 24. Theel ES, Slev P, Wheeler S, Couturier MR, Wong SJ, Kadkhoda K. The Role of Antibody Testing for SARS-CoV-2: Is There One? *J Clin Microbiol*. 2020 Jul 23;58(8).
 25. Torres R, Rinder HM. Double-Edged Spike-Are SARS-CoV-2 Serologic Tests Safe Right Now? *Lab Med*. 2020 06;51(3):236–8.
 26. Elecsys Anti-SARS-CoV-2. Roche Diagnostics. [Internet]. Available from: <https://www.fda.gov/media/137605/download>. Datum dostopa: 3.9.2020
 27. Carter LJ, Garner LV, Smoot JW, Li Y, Zhou Q, Saveson CJ, et al. Assay Techniques and Test Development for COVID-19 Diagnosis. *ACS Cent Sci*. 2020 May 27;6(5):591–605.
 28. WHO. Target product profiles for priority diagnostics to support response to the COVID-19 pandemic v.0.1. 31. July 2020 [Internet]. Available from: <https://www.activateleadership.co.za/wp-content/uploads/2020/08/rd-blueprint-diagnostics-tpp-final-v31july2020-1.pdf>. Datum dostopa: 3.9.2020.
 29. Tromberg BJ, Schwetz TA, Pérez-Stable EJ, Hodes RJ, Woychik RP, Bright RA, et al. Rapid Scaling Up of Covid-19 Diagnostic Testing in the United States – The NIH RADx Initiative. *N Engl J Med* [Internet]. 2020 Jul 22; Available from: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMSr2022263>. Datum dostopa: 3.9.2020.

OKUŽBE S SARS-CoV-2 IN AVTOIMUNSKÉ BOLEZNI

Doc. dr. Katja Lakota, mag. farm., asist. dr. Polona Žigon, univ. dipl. mikrobiol.

Laboratorij za imunologijo revmatizma, Klinični oddelek za revmatologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Vodnikova cesta 62, 1000 Ljubljana; polona.zigon@guest.arnes.si, katja.lakota@guest.arnes.si

POVZETEK

Avtoimunske bolezni in okužbe se pogosto tesno prepletajo. Glede na to, da so infektivne bolezni lahko sprožilci avtoimunskih bolezni, bi lahko bil pričakovan pojav avtoimunskega odziva tudi pri covidu-19. V znanstvenih publikacijah so poročali o pojavu avtoprotiteles in potencialnem razvoju avtoimunske bolezni po okužbi s SARS-CoV-2. Novejši podatki kažejo, da je pojavnost avtoimunskih bolezni po okužbi s SARS-CoV-2 primerljiva s pojavnostjo pri drugih znanih okužbah, povišane vrednosti avtoprotiteles pa se zdijo prehodne narave. Tveganje za okužbo s covidom-19 pri bolnikih s sistemsko vnetno revmatično boleznijo (SVRB) ni večje kot v splošni populaciji in potek bolezni ni zelo različen od tistega pri splošni populaciji, pri čemer manjkajo primerjalne študije z večjim številom bolnikov. Zaenkrat tudi ni posebnih poročil o morebitnem poslabšanju SVRB ob okužbi s covidom-19. Ker so mnoga zdravila, ki se uporabljajo pri zdravljenju SVRB, usmerjena neposredno ali posredno proti citokinom vpletenim v sindrom citokinskega sproščanja, se je pojavilo razmišljanje, da bi zdravila za te bolezni lahko koristila tudi pri covidu-19. Trenutno ni dokazov, da bi katerikoli imunomodulirajoče zdravilo, ki se uporablja v terapiji SVRB, varovalo pred težjim potekom covid-19, vendar pa se številčnejši dokazi za uporabo teh zdravil pri zdravljenju citokinske nevihte šele zbirajo.

VSEBINA

1 UVOD

2 VPLIV OKUŽBE NA RAZVOJ AVTOIMUNSKÉ BOLEZNI

2.1 Avtoimunske bolezni, ki se pojavljajo v literaturi v povezavi s covidom-19

2.2.1 Antifosfolipidni sindrom

2.1.2 Kawasakijska bolezen

2.1.3 Druga avtoimunske bolezni povezane s covidom-19

3 OKUŽBE S SARS-CoV-2 PRI SISTEMSKIH AVTOIMUNSKIH BOLEZNIH

3.1 Tveganje okužbe s SARS-CoV-2 pri SVRB

3.2 Potek covid-19 pri SVRB

3.3 Potek SVRB ob okužbi s SARS-CoV-2

3.4 Priporočila za zdravljenje SVRB in covid-19

4 UPORABA ANTIREVMATIKOV ZA ZDRAVLJENJE COVIDA-19

4.1 Tarčne proti-citokinske terapije nevtralizirajo posamezne mediatorje vnetja

4.2 Zdravila, ki zavrejo delovanje več citokinov

4.3 Klorokin/hidroksiklorokin

4.4 Glukokortikoidi

5 SKLEP

6 LITERATURA

1 UVOD

Avtoimunske bolezni in okužbe so tesno prepletene v več pogledih. Avtoimunost se pojavi, ko imunski sistem prepozna telesu lastne molekule kot tujek in jih napade. Okužbe lahko delujejo kot okoljski sprožilec avtoimunskih bolezni pri genetsko dovzetnih posameznikih. Poročila kažejo, da okužbi s SARS-CoV-2 lahko sledi izbruh vnetnih avtoimunskih bolezni (1). Pretirano vnetje, ki spremlja hud potek covid-19, je posledica citokinov, ki so tarča terapije pri vnetnih sistemskih avtoimunskih boleznih. Zato za obvladovanje pretiranih vnetnih reakcij lahko uporabimo podobna zdravila, eden takšnih je blokada signaliziranja interleukina-6 (IL-6) (2). Tretja stična točka med okužbami in avtoimunostjo je večja dovzetnost za okužbo in spremenjen potek okužbe zaradi imunomodulatornega zdravljenja bolnikov s SVRB (3).

2 VPLIV OKUŽBE NA RAZVOJ AVTOIMUNSKE BOLEZNI

Avtoimunske bolezni so posledica neustreznega odziva imunskega sistema na lastne antigene. Znani so trije glavni mehanizmi, ki lahko razložijo razvoj avtoimunosti: (i) molekulska mimikrija, (ii) razširjanje epitopov (*angl. epitope spreading*) in aktivacija sosednjih antigensko nespecifičnih imunskih celic (*angl. bystander activation*) (4). Telo lahko napade lastno molekulo zaradi molekulske mimikrije takrat, ko so patogeni epitopi navzkrižno reaktivni z lastnimi epitopi. Odseki SARS-CoV-2 virusnega proteina S (*angl. spike protein*), ki je sicer odgovoren za vstop virusa v celice, dolgi 5 aminokislin, ustrezajo zaporedjem 24-ih s surfaktantom povezanih človeških peptidov (5). Ujemanje so našli tudi med heptapeptidi virusnega proteina S ter 26 peptidi človeškega proteoma, pri čemer je nekaj od teh proteinov vpletenih v patofiziologijo bolezni covid-19. Razširjanje epitopov je sekundarni imunski odziv, do katerega pride zaradi sprostitve novih, telesu lastnih antigenov, do katerih imunski sistem običajno nima dostopa. Patogen ali imunski odziv na patogen povzroči lizo tkiva, sproščene (neo)antigene pa prevzamejo antigen predstavitvene celice, ki poskrbijo za sekundarni imunski odziv. V primeru aktivacije sosednjih celic, pa se različni deli imunskega sistema odzovejo na patogen in nastalo vnetno okolje poškoduje tkivo do te mere, da se nespecifično izpostavijo antigeni, hkrati pa takšno okolje spodbuja aktivacijo imunskih celic. Poleg tega v vnetnem okolju delujejo številne proteaze, ki lahko predelajo lastne proteine, pri čemer se izpostavijo tudi imunskemu sistemu običajno nevidni nedominantni epitopi (6).

Glede na podobnosti v klinični sliki in patogenetskih mehanizmih med boleznimi s pretiranim vnetnim odgovorom, kjer patogenezo vodi aktivacija imunskega sistema, in covidom-19, lahko pričakujemo pojav avtoimunskega odziva tudi pri covidu-19. Pri 22 bolnikih z akutno respiratorno odpovedjo zaradi SARS-CoV-2 so tako našli radiografske in histomorfološke podobnosti z akutnim zagonom intersticijske pljučne bolezni pri vezivnotkivnih boleznih. V tej raziskavi so pri bolnikih sprejetih na intenzivni oddelk, v 90% potrdili prisotnost avtoprotiteles proti jedrnim antigenom (*angl. antinuclear antibodies; ANA*), medtem ko so pri hospitaliziranih bolnikih, ki niso potrebovali intenzivnega oddelka ta avtoprotitelesa dokazali v 36%. Glede na to, da ne vemo, kdaj so se ta protitelesa pojavila, ti podatki nakazujejo, da lahko SARS-CoV-2 bodisi izzove avtoimunost, oziroma ima bolezen

morda težji potek pri bolnikih, ki že imajo prisoten avtoimunski odziv (7). Podobna študija 21 bolnikov, ki so bili zaradi okužbe s SARS-CoV-2 sprejeti v enoto intenzivne terapije, je pri polovici bolnikov potrdila prisotnost ANA in pri 20% protitelesa proti antigenu Ro (8). Študija, ki je potekala na 29 bolnikih brez predhodno znanih SVRB, ki so bili sprejeti v enoto intenzivne terapije zaradi SARS-CoV-2, je potrdila prisotnost ANA v 34%, protiteles proti citoplazmi nevtrofilnih granulocitov (ANCA) v 13%, proti kardiolipinu (aCL) v 24% in proti β 2-glikoproteinu I (anti- β 2-GPI) v 34% (9). Našteta avtoprotitelesa so lahko patogena, zato je potrebna še posebna pozornost, če razmišljamo o uporabi konvalescentne plazme v terapevtske namene.

2.1 Avtoimunske bolezni, ki se pojavljajo v literaturi v povezavi s covidom-19

2.2.1 Antifosfolipidni sindrom

Prehoden pojav antifosfolipidnih protiteles (aPL) je bil opažen pri različnih okužbah, kot so okužbe kože (18%), okužbe z virusom človeške imunske pomanjkljivosti (HIV) (17%), pljučnice (14%), virus hepatitisa C (HCV) (13%) ter okužbe sečil (10%) (10). Več skupin je poročalo o pojavu aPL pri bolnikih s covidom-19 in ta poročila nakazujejo možnost z virusom SARS-CoV-2 sproženega antifosfolipidnega sindroma (APS), t.i. bolezni, za katero je značilna hiperkoagulabilnost oz. nagnjenost k arterijskim, venskim ter drobnožilnim trombotičnim dogodkom (3, 11, 12). Zanj so značilni pa so tudi zapleti v nosečnosti.

Laboratorijsko je APS opredeljen s trajno prisotnostjo aPL. Slednja so heterogena skupina imunoglobulinov razredov G, M in A, katerih antigen predstavljajo plazemski proteini, vezani na negativno nabite fosfolipide v celični membrani (13). Razvrstitvena merila za APS, zadnjič posodobljena 2006 (14), vključujejo poleg kliničnih znakov tudi prisotnost treh podskupin aPL: lupusne antikoagulate (LA), aCL ter anti- β 2-GPI, katerih pozitivne vrednosti morajo biti dokazane dvakrat v razmaku najmanj 12 tednov. Raziskave kažejo, da so pri APS prisotna tudi nekatera druga avtoprotitelesa, med drugim protitelesa proti kompleksu protrombin-fosfatidilserin (aPS/PT) (15-17), ki pa zaenkrat še niso vključena v merila.

Koagulopatija je ena od posebnosti kritično bolnih bolnikov s covidom-19 in trombotični dogodki (globoka venska tromboza, pljučna embolija in možganska kap) spadajo med hude zaplete covida-19. Vloga aPL pri trombotičnih zapletih v poteku covida-19 ostaja nejasna. Podobno kot pri hudih koagulopatijah, povezanih s covidom-19, lahko tudi pri podtipu bolnikov z APS v zelo kratkem časovnem obdobju nastanejo tromboze v več organih hkrati (18). Govorimo o katastrofičnem APS (CAPS), ki je redko stanje z visoko stopnjo umrljivosti, pri katerem pride do več hkratnih tromboz predvsem v drobnem žilju v treh ali več organih.

Zaradi podobnosti med potekom covida-19 in APS se je razvila hipoteza, da bi okužba s SARS-CoV-2 lahko bila morebitni sprožilec APS (*Preglednica 1*). V preglednem članku, v katerem so zajeli rezultate 250 bolnikov testiranih za aPL, poročajo, da so bili LA pozitivni pri 64%, aCL pri 9% in anti- β 2-GPI pri 13% bolnikov s covidom-19 (19). Najpogosteje so bila prisotna protitelesa razreda IgM. Pomembno dejstvo je, da nobena izmed v članek vključenih študij ni poročala o ponovnem testiranju aPL po 12 tednih, in tako ni jasno ali gre pri covidu-19 zgolj za prehodno ali pa trajno prisotnost aPL.

Edina študija, v kateri so ponovili testiranje aPL po enem mesecu in so določali tudi aPS/PT protitelesa je vključila 31 bolnikov s covidom-19 (20). Povišane vrednosti aPL so potrdili pri 23 (74%) bolnikov, od tega, jih je 21 (67%) imelo prisotne LA, sedem aCL in aPS/PT ter trije anti- β 2-GPI. Pri ponovnem testiranju LA je 9/10 bolnikov imelo določene negativne vrednosti. Njihova opažanja govorijo v prid prehodnemu pojavu LA (to je med akutno fazo okužbe), poleg tega pa aPL tudi niso bila jasno povezana s dokumentiranimi trombotičnimi zapleti.

V nedavno objavljeni raziskavi, ki je zajela 122 bolnikov s covidom-19 so določili prevalenco aCL IgG in IgM v 13,4% in 2,7% ter anti- β 2-GPI IgG in IgM v 6,3% in 7,1% primerov, kar je značilno manj kot pri bolnikih z APS (21). LA so bili določeni v 22,2% covid-19 v primerjavi z 54,1% pri APS. Avtorji prav tako niso potrdili povezave med arterijskimi in venskimi trombozami pri covidu-19 in aPL.

Do zanimivega odkritja so prišli še italijanski znanstveniki, ki so proučevali antigensko specifičnost aPL, določenih pri bolnikih s covidom-19. Avtorji povzemajo, da so za razliko od APS, za katerega so značilni visoki titri anti- β 2-GPI s specifičnostjo proti domeni 1, pri bolnikih s covidom-19 prisotna anti- β 2-GPI v nizkih titrih in s specifičnostjo proti domenama 4 in 5.

Tveganje za ponovitev trombotičnega dogodka pri bolnikih z APS je močno povečano pri tistih, ki imajo prisotnih več podtipov aPL (LA, aCL, anti- β 2-GPI, aPS/PT), t.i. dvojno, trojno pozitivni bolniki. Pri bolnikih s covidom-19 je bila dvojna ali trojna pozitivnost aPL redko določena in v večini dokumentiranih primerov zgolj prehodne narave. Dodatno oviro za trdnejše zaključke predstavlja tudi metodologija določanja aPL. Na vrednotenje rezultatov namreč močno vplivajo pred-analitski dejavniki, metodološki problemi, heterogena narava aPL in nenazadnje tudi nezadostna standardizacija nekaterih diagnostičnih testov.

Preglednica 1. Vzporednosti med covidom-19 in antifosfolipidnim sindromom (povzeto po (11)).

ANTIFOSFOLIPIDNI SINDROM	COVID-19
podaljšan APTČ, povišan D-dimer	Spremenjeni parametri koagulacije v 69%: podaljšan PČ in spremenjen APTČ, povišan D-dimer, povišani FDP
Tromboze žilja (≥ 1 klinično dokumentiranih tromboz arterij, ven ali malih žil)	Tromboembolični dogodki zaznani pri 21 % bolnikov
Pljučni zapleti	Tromboze velikega žilja Pljučna intravaskularna koagulopatija
Aktivacija komplementa	Odlaganje komponent komplementa C5b-9, C4d v drobnem žilju pljuč in kože
Porušeno ravnovesje citokinov in citokinska nevihta pri CAPS	Povišano sproščanje vnetnih citokinov značilno za citokinsko nevihto
Trajna prisotnost aPL (LA, aCL, anti- β 2-GPI) (tj. določena 2x v razmaku 12 tednov)	Povišane vrednosti aPL LA 64% , aCL 9%, anti- β 2-GPI 13% v akutni fazi bolezni

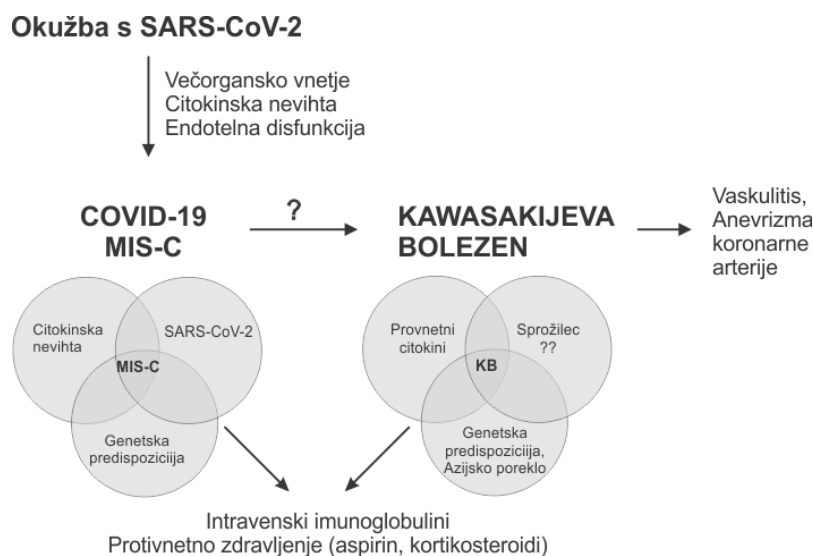
* APTČ, aktivirani parcialni tromboplastinski čas, PČ, protrombinski čas, FDP, fibrin razgradnji produkti

2.1.2 Kawasakijska bolezen

Objave o covidu-19 so bile sprva osredotočene na odrasle, saj se je zdelo, da pri otrocih okužba s SARS-CoV-2 večinoma poteka blago. Vendar pa so se konec aprila 2020, tako v Severni Ameriki kot v Evropi pojavili opisi morebitne povezave med predhodnim prebolevanjem covid-19 in večorganskim vnetnim sindromom pri otrocih (*angl. Multisystem Inflammatory Syndrome in children; MIS-C*), ki zaradi močnega sistemskega vnetja večkrat zahteva intenzivno zdravljenje in lahko vodi tudi v odpoved enega ali več organskih sistemov (22-24). Prvo opredelitev primera je Svetovna zdravstvena organizacija (SZO) predlagala sredi maja (25). Vzrok za MIS-C naj bi bil nepravilen odziv imunskega sistema na sprožilni dejavnik, ki bi lahko bil novi koronavirus. MIS-C v povezavi SARS-CoV-2 je novo prepoznani sindrom, ki se klinično kaže s povišano telesno temperaturo, prebavnimi težavami in drugimi pridruženimi znaki, kot so izpuščaji, ne-gnojno vnetje oči, hipotenzija ali šokovno stanje, prizadetost srca, motnje v strjevanju krvi, pogosto je tudi povečano sproščanje citokinov (26). Sindrom je podoben Kawasakijski bolezni (KB), pri kateri gre verjetno za dereguliran imunski odziv pri otrocih z genetsko nagnjenostjo, ki ga sproži okužba (*Slika 1*) (27). KB je akutno sistemsko vnetje srednje velikih žil, posebno koronarnih arterij, ki se lahko zaradi vnetja žilne stene anevrizmatsko razširijo. Bolezen je leta 1967 prvič opisal japonski pediater Tomisaku Kawasaki (28). KB je redka bolezen, vendar je skupaj z vaskulitisom IgA ena najpogostejših oblik sistemskega vaskulitisa pri otrocih. Najpogostejša je na Japonskem, primeri pa se pojavljajo tudi drugod po svetu. Zbolevalo mlajši otroci, saj je do 85% otrok s KB mlajših od 5 let. Čeprav se lahko obolenje pojavi kadarkoli, se več primerov običajno pojavi v pozni zimi in spomladi. Vzrok za KB ni znan, domnevno pa je posledica okužbe (29). Preobčutljivostna reakcija ali motnja v imunskem odzivu, verjetno sprožena z okužbo, lahko povzroči aktivacijo vnetnega procesa in pripelje do sistemskega vnetja in vaskulitisa (*Slika 1*).

Med MIS-C in KB obstajajo podobnosti. Pri obeh so namreč prizadete srednje velike žile, za bolnike je značilna dlje trajajoča visoka temperatura, bolečine v trebuhu, driska, kožni izpuščaj in hitro poslabšanje kliničnega stanja. Razlikujeta pa se v tem, da se MIS-C pojavlja predvsem pri otrocih, starejših od pet let. Poleg tega pri MIS-C opažajo več prebavnih težav in hujšo prizadetost srca ter izraziteje povišane vnetne kazalce (30). Podatki kažejo, da se MIS-C pogosteje pojavlja v državah, ki so bolj obremenjene s covidom-19 (3). Retrospektivna časovna analiza, narejena v Parizu, epicentru epidemije v Franciji, je ocenila incidenco pojavljanja KB v zadnjih 15 letih in potrdila značilno povišanje incidence KB v času epidemije covid-19 (31). Druga italijanska študija iz province Bergamo je našla 30-kratno povečanje pogostnosti KB (pred epidemijo 0,3/mesec, v času epidemije 10/mesec), pri čemer je skupina otrok, ki je zbolela v času epidemije imela več kardioloških zapletov, pogosteje se je razvil sindrom aktivacije makrofagov (MAS), otroci so potrebovali dodatno glukokortikoidno zdravljenje (32). V nedavno objavljenem preglednem članku so zajeli 46 študij s skupaj vključenimi 114 pediatričnimi primeri covid-19 (30). Otroci so imeli večinoma blage simptome, vključno z vročino (64%), kašljem (35%) in rinorejo (16%) ali so bili brez simptomov (15%). Glavni laboratorijski parametri so bili limfopenija (33%), zvišan D-dimer (52%) in C-reaktivni protein (40%). Identificirali pa so tudi 17 bolnikov (15%) z MIS-C. Avtorji povzemajo, da so otroci oboleli s covidom-

19 na splošno manj prizadeti, ali pa so brez simptomov, vendar pa so lahko tudi dojenčki hudo bolni in starejši otroci lahko razvijejo MIS-C s hudo sistemsko prizadetostjo.



Slika 1. Primerjava covida-19 in Kawasakijeve bolezni. Povzeto po preglednem članku (27).

2.1.3 Druga avtoimunske bolezni povezane s covidom-19

V literaturi se v manjši meri pojavljajo tudi poročila o povezavi covida-19 z nekaterimi drugimi avtoimunskimi boleznimi. **Idiopatska trombocitopenična purpura (ITP)** je avtoimunska bolezen, ki je posledica s protitelesi in T-celično posredovanega razpada trombocitov ter njihovega zmanjšane nastajanja. ITP se lahko kaže kot akutno stanje pri otrocih ali kronično stanje pri odraslih. 52% pediatričnih bolnikov ozdravi bodisi spontano bodisi po zdravljenju. Kronična oblika ITP se razvije pri 64% odraslih oseb, od katerih jih 12% razvije tudi drugo avtoimunsko bolezen. Kot sprožilci ITP se omenjajo različne okužbe, vključno s citomegalovirusom, virusom Epstein-Barr, parvovirusi, virusi rdečk, ošpic ali HIV, ki najverjetneje sprožijo ITP preko molekulske mimikrije (33, 34). Na možnost povezave med ITP in covidom-19 so prvič opozorili v poročilu primera 65-letne bolnice z anamnezo hipertenzije, avtoimunskega hipotiroidizma in pozitivnim brisom za SARS-CoV-2, pri kateri so potrdili ITP in jo kasneje uspešno zdravili s transfuzijo trombocitov in prednizolonom (35). Pred kratkim objavljena prispevka poročata tudi o pediatričnem bolniku z ITP (36) ter o treh novih primerih ITP povezanih s covidom-19 (37, 38).

Guillain-Barréjev sindrom (GBS) je imunsko povzročena bolezen z simetričnimi ohromitvami, ki se pričnejo v spodnjih udih in postopoma ascendirajo in napredujejo ter lahko poleg udov prizadenejo tudi bulbarne živce. Bolezen lahko sprožijo nekatere respiratorne ali črevesne okužbe, kot so okužba z virusom influence, citomegalovirusom, virusi noric, rdečk, mumpsa, HIV, poliovirusi, virusom hepatitisa E. Med bakterijskimi okužbami se najpogosteje omenjajo klamidija, borelija, *Mycoplasma pneumoniae*, pa tudi *Campylobacter jejuni*. Pri GBS ima molekulska mimikrija pomembno vlogo. Imunski sistem napade ganglioide perifernega živčnega sistema. Do danes sta bila objavljena le dva primera GBS v povezavi s covidom-19 (39),

ki pa nedvoumno ne potrjujeta, da bi okužba s SARS-CoV-2 spodbudila nastanek protiteles proti gangliozidom.

3 OKUŽBE S SARS-CoV-2 PRI SISTEMSKIH AVTOIMUNSKIH BOLEZNIH (SVRB)

3.1 Tveganje okužbe s SARS-CoV-2 pri SVRB

SVRB zdravimo z imunomodulirajočimi zdravili, ki pa hkrati tudi zvečajo dovzetnost za okužbe (40). Nedavna analiza 180 raziskav o pojavnosti okužb spodnjih in zgornjih dihal pri SVRB je potrdila povezavo med glukokortikoidi in povečanjem pogostosti virusnih respiratornih okužb. Pri uporabi zaviralcev Janusovih kinaz (JAK), predvsem v visokih odmerkih ter zaviralcev dejavnika tumorske nekroze (TNF) in interlevkina-17 (IL-17) so ugotovili povezavo s povišano pojavnostjo blagih virusnih respiratornih obolenj, medtem ko nesteroidna protivnetna zdravila, hidroksiklorokin, metotreksat in nekatera druga zdravila niso bila povezana s povečanim tveganjem za respiratorne okužbe (41). Zato je na mestu vprašanje ali je tudi obolevnost za covidom-19 pri bolnikih s SVRB pogostejša. Štiri raziskave, ki so analizirale pogostnost okužb s SARS-CoV-2, so skupno vključile več kot 4300 bolnikov s SVRB in poročajo o podobni incidenci laboratorijsko potrjenih diagnoz covid-19 med bolniki s SVRB ter lokalno in časovno primerljivo populacijo brez vnetnih revmatičnih bolezni (pri obeh populacijah je bil delež okuženih med 0,2% in 0,6%) (42-46). Ob tem velja pomislek, da so morda bolniki, ki so veljali za ogroženo skupino, bolj spoštovali pravila fizičnega distanciranja v primerjavi s splošno populacijo.

3.2 Potek covid-19 pri SVRB

Opisani so posamezni primeri manj patogenih koronavirusov, ki lahko pri imunsko oslabeledih bolnikih povzročijo pljučnico, zato je skrb ob pojavu SARS-CoV-2 pri bolnikih s SVRB upravičena (47). Po drugi strani bi že vzpostavljene imunomodulatorne in protivnetne terapije, ki jih prejemajo bolniki s SVRB, lahko dolgoročno vplivale na imunski status tudi ob takojšnji opustitvi terapije, pri čemer bi v začetnih fazah bolezni zmanjšale odziv organizma na okužbo in tako zmanjšale protivirusno obrambo, kasneje pa bi lahko koristile in morebiti preprečile zaplete citokinske nevihte ob hudem poteku covid-19.

V treh študijah, ki so jih izvedli revmatologi med skupno 1709 bolniki z vnetnimi revmatičnimi boleznimi, je bilo 9 bolnikov potrjeno pozitivnih na SARS-CoV-2, pri čemer je kratkotrajno hospitalizacijo potreboval le en bolnik (48-50). Med 1037 bolniki na biološki oziroma tarčni sintezni imunomodulirajoči terapiji hospitalizirani 3 bolniki, od katerih nihče ni potreboval zdravljenja s kisikom (51).

Študije, ki so primerjale bolnike s covidom-19 s SVRB z bolniki brez SVRB niso našle razlik v simptomih in poteku covid-19 (52-54). Med samimi bolniki s SVRB so bili hospitalizacija (55, 56), hujši potek (53) in smrtnost (55) povezani s podobnimi komorbidnostnimi dejavniki kot pri splošni populaciji – to je s starostjo, spolom, hipertenzijo in sladkorno boleznijo. V študiji, ki je analizirala dejavnike povezane z umrljivostjo več kot 5000 bolnikov, hospitaliziranih zaradi covid-19, so ugotovili, da imajo bolniki z avtoimunskimi boleznimi (revmatoidni artritis, luskavica, sistemski

lupus eritematozus (SLE)) 1,23-krat večje tveganje za smrt, pri čemer pa nobena SVRB ni izstopala. Pri tem je bilo tveganje zaradi starosti, spola, povečane telesne teže, diabetesa, respiratornih bolezni (razen astme), tveganje pri bolnikih po presaditvi organov in hematoloških malignih obolenjih bistveno večje v primerjavi s sistemskimi avtoimunskimi boleznimi (57). Podobno tudi študija na 103 bolnikih z RA in spondiloartritis (SpA) iz New Yorka poroča o primerljivem deležu hospitaliziranih in deležu umrlih med SVRB bolniki s covidom-19 in splošno populacijo (56).

Glede vpliva terapije SVRB na potek bolezni na podlagi analiz baze »COVID-19 Global Rheumatology Alliance«, ki zaenkrat vsebuje podatke 600 bolnikov s SVRB, pozitivnih na SARS-CoV-2, uporaba nesteroidnih antirevmatikov, antimalarikov, klasičnih sinteznih imunomodulatornih zdravil samostojno ali v kombinaciji z biološkimi zdravili ter zaviralci kinaz JAK ni povezana z večjo verjetnostjo hospitalizacije zaradi covid-19. Uporaba glukokortikoidov (prednizolon v ekvivalentnem odmerku $\geq 10\text{mg/dan}$) je bila povezana z večjo verjetnostjo hospitalizacije, medtem ko pri bolnikih, zdravljenih z zaviralci TNF poročajo celo o manjši verjetnosti hospitalizacije (58). Do podobnih izsledkov glede glukokortikoidov so prišli v študiji 103 bolnikov z vnetimi artritis (59), medtem ko študija na 228 bolnikih s SVRB ni našla nobene povezave z resnostjo covid-19 in terapijo (53).

3.3 Potek SVRB ob okužbi s SARS-CoV-2

Le dve študiji posebej omenjata potek sistemske avtoimunske bolezni med samo okužbo s SARS-CoV-2. Med 17 bolniki s SLE v remisiji, zbolelimi za covidom-19, ni bilo zabeleženega nobenega zagona osnovne bolezni v času trajanja okužbe (60). Zagona bolezni prav tako niso opazili med 320 bolniki s kroničnim artritisom (49). Glede na to, da ostale študije SVRB s covidom-19 posebej ne omenjajo nobenih sprememb v poteku revmatskih bolezni lahko povzamemo, da v kliniki ne opažajo posebnega vpliva covid-19 na potek SVRB (48-50, 51).

3.4 Priporočila za zdravljenje SVRB in covid-19

Konzilij revmatologov Univerzitetnega Kliničnega Centra Ljubljana je pripravil priporočila za zdravljenje kroničnih revmatičnih bolezni v času pojavljanja covid-19, ki so razdeljena glede na verjetnost stika z osebo, okuženo s covidom-19 (61). Pri tem je za bolnike, ki niso bili v stiku z bolnikom s covidom-19 predvideno nadaljevanje zdravljenja po predpisanem režimu. Za bolnike, ki so bili v tesnem stiku z osebo s potrjenim covidom-19, je za čas inkubacijske dobe (2 tedna) predvidena prekinitev zdravljenja s tarčnimi sinteznimi (tofacitinib, baricitinib, apremialst) ali biološkimi (adalimumab, certolizumab, golimumab, infliksimab, rituksimab, tocilizumab, sarilimumab, iksekizumab, sekukinumab, ustekinumab, anakinra) zdravili, oziroma nadaljevanje zdravljenja s konvencionalnimi sinteznimi imunomodulirajočimi zdravili (metotreksat, leflunomid, takrolimus, mikofenolat mofetil, azatiprin, sulfasalazin) ter klorokinom. Zaradi možnih zapletov morajo biti kakršnekoli spremembe v odmerkih glukokortikoidov (metilprednizolona, prednizolona) dogovorjene z revmatologom. V kolikor pri revmatičnem bolniku potrdijo okužbo s SARS-CoV-2 je svetovana prekinitev zdravljenja s tarčnimi sinteznimi in biološkimi zdravili, v primeru težjega poteka covid-19 tudi prekinitev jemanja konvencionalnih

sinteznih imunomodulirajočih zdravil. Navodila so v skladu s priporočili Ameriškega združenja za revmatologijo, ki jih glede na nova dognanja o učinku protirevmatičnih zdravil na potek covid-19 sproti dopolnjuje (62).

4 UPORABA ANTIREVMATIKOV ZA ZDRAVLJENJE COVIDA-19

Covid-19 je globalna zdravstvena grožnja, ki posebno nevarnost predstavlja starostnikom in osebam z nekaterimi specifičnimi kroničnimi boleznimi oziroma pridruženimi stanji. Povečana dovzetnost za okužbo in slabši začetni protivirusni imunski odziv so dejavniki, ki določajo ali okužba ostane asimptomatska ali pa se pojavi vročina, kašelj, težka sapa, glavobol, ter v resnejših primerih pljučnica in pretiran sistemski imunski odziv. Pretirani imunski odziv, ki je povezan z visoko stopnjo umrljivosti, je bil v preteklosti opisan tudi pri boleznih kot so španska gripa 1919, SARS in MERS. Gre za sindrom sproščanja citokinov, v hudih oblikah govorimo o citokinski nevihti, ki se kaže kot sindrom akutne dihalne stiske in več-organska odpoved in je opisan celo pri 5-20% bolnikov s SARS-CoV-2. Citokini povzročijo prehod imunskih celic v tkiva, destabilizacijo in apoptozo endotelija in epitelija, poškodbo kapilar in več-organsko odpoved (63). Pri covidu-19 so napovedni dejavniki hujšega poteka povišan CRP, IL-6, feritin in D-dimer, limfopenija, zmanjšano število monocitov in celic T. Izmerili so povečano izločanje IL-2, IL-7, IL-6, IL-10, G-CSF, IP10, MCP-1, MIP-1, TNF. Več poročil potrjuje, da povišane koncentracije omenjenih citokinov korelirajo z resnostjo bolezni covid-19 (64). Podrobna analiza 1484 bolnikov s covidom-19 je pokazala, da so nivoji TNF in IL-6, neodvisno od ostalih dejavnikov, povezani z izidom bolezni (65). Citokinska nevihta, z aktivacijo makrofagov, se lahko pojavi tudi po aplikaciji nekaterih bioloških zdravil, kot reakcija bolezni presadka proti gostitelju in ob zdravljenju z gensko spremenjenimi limfociti T s himernimi antigenskimi receptorji (CAR-T). Od tod izvirajo tudi izkušnje za zdravljenje ob trenutni epidemiji. Mnoga zdravila, ki se uporabljajo pri terapiji vnetnih revmatičnih bolezni so usmerjena neposredno ali posredno proti delovanju citokinov vpletenih v sindrom citokinskega sproščanja, zato se je pojavilo razmišljanje, da bi se zdravila za te bolezni lahko uporabila tudi pri zdravljenju covid-19. Zdravila, kot so tocilizumab, metotreksat, hidroksiklorokin, tofacitinib, sulfasalazin, so na biopsijah tkiv bolnikov z revmatoidnim artritisom, tkivih mišjih modelov in celičnih kulturah namreč pokazala, da zavirajo izločanje citokinov, ki so močno povišani tudi pri covidu-19 (66).

4.1 Tarčne proti-citokinske terapije nevtralizirajo posamezne mediatorje vnetja

IL-6 je pleiotropni citokin, ki igra ključno vlogo pri citokinski nevihti. Monoklonski protitelesi tocilizumab in sarilumab sta usmerjeni proti receptorju za IL-6 in odobreni za zdravljenje revmatoidnega artritisa, prvi pa tudi za gigantomalični artritis in za s CAR-T-celično terapijo povzročenega sindroma citokinskega sproščanja. Medtem, ko so poročila nakazovala uspešno uporabo anti-IL-6 zdravil za zdravljenje covid-19 (67), dve randomizirani študiji (ena s tocilizumabom in druga s sarilimumabom) nista uspeli dokazati pozitivnih učinkov omenjenega zdravljenja (68).

Anakinra je rekombinantni antagonist receptorja IL-1, ki se uporablja za zdravljenje nekaterih vnetnih avtoimunskih obolenj. Podatki faze III randomizirane

študije pri bolnikih s sepsa kažejo na boljše preživetje bolnikov s sindromom aktivacije makrofagov ob zdravljenju z anakinro (69).

Monoklonska protitelesa usmerjena proti TNF so najdlje uporabljana biološka zdravila pri zdravljenju SVRB. Ob razvijanju protitumorskih zdravil so namreč ugotovili, da zaviralci TNF uspešno zavrejo izražanje IL-6, GM-CSF in IL-1. Čeprav zaviralci TNF povečajo tveganje za virusne infekcije, pa študije pri SVRB ne kažejo na povečano število okuženih s covidom-19 med bolniki zdravljenimi z zaviralci TNF, nasprotno zaznali so celo zaščitne učinke (58).

4.2 Zdravila, ki zavrejo delovanje več citokinov

Zaviralci kinaz JAK so novejša sintezna tarčna imunomodulirajoča zdravila, ki zavirajo znotrajcelični prenos signala različnih vnetnih citokinov, med drugim tudi interferona tipa I, in IFN γ , in tako zavirajo primarni protivirusni odziv. Zavirajo pa tudi tirozinske kinaze, ki so vpletene v znotrajcelični virusni transport ter virusno endocitozo v epitelijske celice. Baricitinib in tofacitinib sta odobrena za zdravljenje revmatoidnega artritisa vendar imata oba FDA/EMA opozorilo za povečevanje možnosti trombotičnih zapletov (70). Kljub temu, da je hiperkoagulabilno stanje prisotno tudi pri covidu-19, je trenutno registriranih 37 kliničnih študij z zaviralci kinaz JAK v povezavi s SARS-CoV-2 (71).

4.3 Klorokin/Hidroksiklorokin

Obe zdravili za zdravljenje malarije se zaradi ugodnih imunomodulatornih učinkov uporabljata tudi pri zdravljenju različnih vnetnih revmatičnih bolezni. *In vitro* podatki so kazali na možno učinkovitost v terapiji covida-19, saj antimalarik spremeni endosomski pH, vpliva na transport SARS-CoV-2 v endolizosome, spremeni glikozilacijo receptorja za ACE2 in močno zavre replikacijo virusa (72). Po drugi strani pa so dokazali, da zniža interferone tipa I, ki so prva obrambna linija pri virusnih okužbah. Po začetnem navdušenju nad učinkovitostjo pri covidu-19 so nadaljnje študije okuženih s covidom-19 podale mešane zaključke o učinkovitosti klorokina (glede incidence okuženih, verjetnosti razvoja sindroma dihalne stiske ali smrti pri obolelih s covidom-19). Randomizirana študija je pokazala, da hidroksiklorokin ni preprečil covida-19, če je bil uporabljen do 4 dni po kontaktu z okuženo osebo (73). Prav tako pri bolnikih s SLE, ki so bili na terapiji s hidroksiklorokinom, antimalarik ni preprečil bolezni (60, 74). Res pa je, da so serumske koncentracije pri zdravljenju SLE okrog 0,5 mg/L, medtem ko je za protivirusno delovanje potrebna bistveno večja serumska koncentracija (4 mg/L) (75). Stranski učinki visokih odmerkov zdravila na srčno funkcijo, s podaljšanjem intervala QT, so dodatno obremenjujoči za bolnike. Trenutno kljub temu z antimalariki poteka več kot 100 registriranih kliničnih študij, katerih rezultati bodo morda omogočili realno oceno uporabnosti zdravila za terapijo covida-19 (71).

4.4 Glukokortikoidi

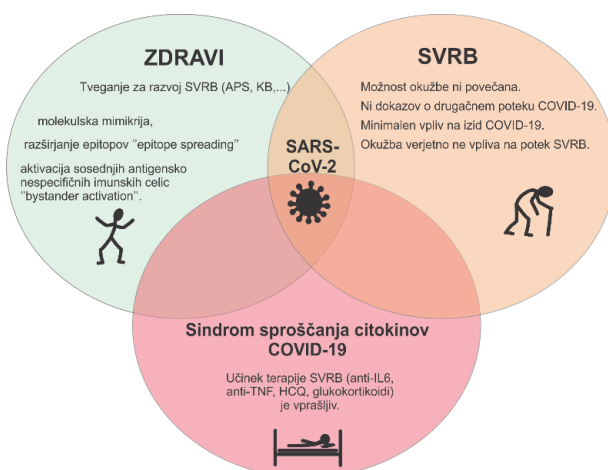
Glukokortikoidi zavirajo vnetje in delujejo imunosupresivno z direktnim delovanjem na izražanje vnetnih citokinov, kar bi lahko bilo ugodno ob citokinski nevihti. Hkrati glukokortikoidi zmanjšujejo proliferacijo in diferenciacijo celic T in

makrofagov, kar lahko poveča dovzetnost za covid-19. Pri bolnikih s SARS in MERS so jih uporabljali za preprečevanje razvoja in zdravljenje sindroma akutne dihalne stiske, vendar so ugotovili, da niso zmanjšali smrtnosti, so pa upočasnili očiščenje virusa in imeli nekatere druge neželene učinke (76). Tudi randomizirana študija uporabe pri sindromu akutne dihalne stiske pri covidu-19 je dala mešane rezultate glede na to, v kakšnem stanju so bili bolniki ob uporabi terapije (77). Na splošno je le malo dokazov za ugoden učinek glukokortikoidov, posebej, če so ti predpisani v visokih odmerkih pri sindromu akutne dihalne stiske (78), zato trenutna navodila SZO odsvetujejo njihovo rutinsko uporabo (79).

5 SKLEP

Okužbe so zunanji dejavnik, ki lahko preko različnih mehanizmov sprožijo nastanek avtoimunskih obolenj in tudi pri okužbi s SARS-CoV-2 so dokazali pojav nekaterih avtoprotiteles (aPL, ANA), pri čemer pa zanesljivih dokazov o njihovi morebitni patogenosti še ni. Tveganje za okužbo s SARS-CoV-2 pri bolnikih s SVRB ni večje kot v splošni populaciji s podobnimi pridruženimi boleznimi. Potek bolezni (hospitalizacija, sprejem na intenzivni oddelek, smrt) ni različen od splošne populacije, pri čemer manjkajo primerjalne študije z večjim številom bolnikov. Zaenkrat študije ne poročajo o poslabšanju SVRB ob okužbi s SARS-CoV-2. Daljnosežna posledica epidemije in naša nova realnost je otežen neposredni stik z bolnikom. Obravnava bolnikov na daljavo, t.i. telemedicina, je nekaj časa enostavna pri bolnikih z obstoječo kronično avtoimunsko boleznijo, vendar je pri poslabšanjih bolezni in pri postavljanju diagnoze neustrezna. Nepredvidljive dolgoročne posledice lahko predstavlja tudi izogibanje oziroma odlašanje obiska zdravnika zaradi strahu pred okužbo, kar pa se bo morebiti pokazalo v prihodnje.

Glede na literaturo trenutno tudi ni dokazov, da bi katerokoli imunomodulirajoče zdravilo (konvencionalno, tarčno sintezno ali biološko), ki se uporablja za zdravljenje SVRB, varovalo pred težjim potekom covid-19. Izkušnje z uporabo teh zdravil pri zdravljenju citokinske nevihte se še zbirajo.



Slika 2. Grafični povzetek okužbe z SARS-CoV-2 in avtoimunske bolezni. APS, antifosfolipidni sindrom; KD, Kawasakijska bolezen, SVRB, sistemske avtoimunske revmatične bolezni, SARS CoV-2, Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; covid-19, koronavirusna bolezen 2019.

6 LITERATURA

1. Galeotti C, Bayry J. Autoimmune and inflammatory diseases following COVID-19. *Nature reviews Rheumatology*. 2020;16(8):413-4.
2. Benucci M, Damiani A, Infantino M, Manfredi M, Quartuccio L. Old and new antirheumatic drugs for the treatment of COVID-19. *Joint bone spine*. 2020;87(3):195-7.
3. Ehrenfeld M, Tincani A, Andreoli L, Cattalini M, Greenbaum A, Kanduc D, et al. Covid-19 and autoimmunity. *Autoimmunity reviews*. 2020;19(8):102597.
4. Pacheco Y, Acosta-Ampudia Y, Monsalve DM, Chang C, Gershwin ME, Anaya JM. Bystander activation and autoimmunity. *J Autoimmun*. 2019;103:102301.
5. Kanduc D, Shoenfeld Y. On the molecular determinants of the SARS-CoV-2 attack. *Clin Immunol*. 2020;215:108426.
6. Ercolini AM, Miller SD. The role of infections in autoimmune disease. *Clin Exp Immunol*. 2009;155(1):1-15.
7. Gagiannis D, Steinestel J, Hackenbroch C, Hannemann M, Umathum VG, Gebauer N, et al. COVID-19-induced acute respiratory failure: an exacerbation of organ-specific autoimmunity? *medRxiv*. 2020:2020.04.27.20077180.
8. Zhou Y, Han T, Chen J, Hou C, Hua L, He S, et al. Clinical and Autoimmune Characteristics of Severe and Critical Cases of COVID-19. *Clin Transl Sci*. 2020.
9. Vlachoyiannopoulos PG, Magira E, Alexopoulos H, Jahaj E, Theophilopoulou K, Kotanidou A, et al. Autoantibodies related to systemic autoimmune rheumatic diseases in severely ill patients with COVID-19. *Annals of the rheumatic diseases*. 2020.
10. Cervera R, Asherson RA, Acevedo ML, Gomez-Puerta JA, Espinosa G, De La Red G, et al. Antiphospholipid syndrome associated with infections: clinical and microbiological characteristics of 100 patients. *Annals of the rheumatic diseases*. 2004;63(10):1312-7.
11. Cavalli E, Bramanti A, Ciurleo R, Tchorbanov AI, Giordano A, Fagone P, et al. Entangling COVID-19 associated thrombosis into a secondary antiphospholipid antibody syndrome: Diagnostic and therapeutic perspectives (Review). *International journal of molecular medicine*. 2020;46(3):903-12.
12. Marietta M, Coluccio V, Luppi M. COVID-19, coagulopathy and venous thromboembolism: more questions than answers. *Internal and emergency medicine*. 2020:1-13.
13. Espinosa G, Cervera R. Antiphospholipid syndrome. *Arthritis research & therapy*. 2008;10(6):230.
14. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2006;4(2):295-306.
15. Vega-Ostertag M, Liu X, Kwan-Ki H, Chen P, Pierangeli S. A human monoclonal antiprothrombin antibody is thrombogenic in vivo and upregulates expression of tissue factor and E-selectin on endothelial cells. *BrJHaematol*. 2006;135(2):214-9.
16. Oku K, Amengual O, Zigon P, Horita T, Yasuda S, Atsumi T. Essential role of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in tissue factor gene expression mediated by the phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibody. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2013;52(10):1775-84.
17. Cifù A, Domenis R, Pistis C, Curcio F, Fabris M. Anti- β 2-glycoprotein I and anti-phosphatidylserine/prothrombin antibodies exert similar pro-thrombotic effects in peripheral blood monocytes and endothelial cells. *Autoimmunity Highlights*. 2019;10(1):3.
18. Cárdenas Suri H, Jimomila Bening D. Catastrophic antiphospholipid antibody syndrome and multiple organ dysfunctions in critically ill patients with COVID-19. *Expert review of respiratory medicine*. 2020:1-2.
19. Gkrouzman E, Barbhaiya M, Erkan D, Lockshin MD. A Reality Check on Antiphospholipid Antibodies in COVID-19-Associated Coagulopathy. *Arthritis & Rheumatology*. n/a(n/a).
20. Devreese KMJ, Linskens EA, Benoit D, Peperstraete H. Antiphospholipid antibodies in patients with COVID-19: A relevant observation? *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. n/a(n/a).
21. Gatto M, Perricone C, Tonello M, Bistoni O, Cattelan AM, Bursi R, et al. Frequency and clinical correlates of antiphospholipid antibodies arising in patients with SARS-CoV-2 infection: findings from a multicentre study on 122 cases. *Clinical and experimental rheumatology*. 2020;38(4):754-9.

22. Riphagen S, Gomez X, Gonzalez-Martinez C, Wilkinson N, Theocharis P. Hyperinflammatory shock in children during COVID-19 pandemic. *Lancet* (London, England). 2020;395(10237):1607-8.
23. Waltuch T, Gill P, Zinns LE, Whitney R, Tokarski J, Tsung JW, et al. Features of COVID-19 post-infectious cytokine release syndrome in children presenting to the emergency department. *The American journal of emergency medicine*. 2020.
24. Yasuhara J, Kuno T, Takagi H, Sumitomo N. Clinical characteristics of COVID-19 in children: A systematic review. *Pediatric pulmonology*. 2020.
25. WHO. Multisystem inflammatory syndrome in children and adolescents with COVID-19:[1 p.]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/multisystem-inflammatory-syndrome-in-children-and-adolescents-with-covid-19>.
26. Abrams JY, Godfred-Cato SE, Oster ME, Chow EJ, Koumans EH, Bryant B, et al. Multisystem Inflammatory Syndrome in Children (MIS-C) Associated with SARS-CoV-2: A Systematic Review. *The Journal of pediatrics*. 2020.
27. Loke YH, Berul CI, Harahsheh AS. Multisystem inflammatory syndrome in children: Is there a linkage to Kawasaki disease? *Trends in cardiovascular medicine*. 2020.
28. Kawasaki T. [Acute febrile mucocutaneous syndrome with lymphoid involvement with specific desquamation of the fingers and toes in children]. *Arerugi* = [Allergy]. 1967;16(3):178-222.
29. Kawasaki T. Kawasaki disease. *Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and biological sciences*. 2006;82(2):59-71.
30. Sperotto F, Friedman KG, Son MBF, VanderPluym CJ, Newburger JW, Dionne A. Cardiac manifestations in SARS-CoV-2-associated multisystem inflammatory syndrome in children: a comprehensive review and proposed clinical approach. *European journal of pediatrics*. 2020:1-16.
31. Ouldali N, Pouletty M, Mariani P, Beyler C, Blachier A, Bonacorsi S, et al. Emergence of Kawasaki disease related to SARS-CoV-2 infection in an epicentre of the French COVID-19 epidemic: a time-series analysis. *The Lancet Child & adolescent health*. 2020;4(9):662-8.
32. Verdoni L, Mazza A, Gervasoni A, Martelli L, Ruggeri M, Ciuffreda M, et al. An outbreak of severe Kawasaki-like disease at the Italian epicentre of the SARS-CoV-2 epidemic: an observational cohort study. *Lancet* (London, England). 2020;395(10239):1771-8.
33. Rinaldi M, Perricone C, Ortega-Hernandez OD, Perricone R, Shoenfeld Y. Immune thrombocytopenic purpura: an autoimmune cross-link between infections and vaccines. *Lupus*. 2014;23(6):554-67.
34. Elalfy MS, Nugent D. Viruses, anti-viral therapy, and viral vaccines in children with immune thrombocytopenia. *Semin Hematol*. 2016;53 Suppl 1:S70-2.
35. Zulfiqar AA, Lorenzo-Villalba N, Hassler P, Andr  s E. Immune Thrombocytopenic Purpura in a Patient with Covid-19. *The New England journal of medicine*. 2020;382(18):e43.
36. Tsao HS, Chason HM, Fearon DM. Immune Thrombocytopenia (ITP) in a Pediatric Patient Positive for SARS-CoV-2. *Pediatrics*. 2020;146(2).
37. Bomhof G, Mutsaers P, Leebeek FWG, Te Boekhorst PAW, Hofland J, Croles FN, et al. COVID-19-associated immune thrombocytopenia. *Br J Haematol*. 2020;190(2):e61-e4.
38. Sedaghat Z, Karimi N. Guillain Barre syndrome associated with COVID-19 infection: A case report. *J Clin Neurosci*. 2020;76:233-5.
39. Toscano G, Palmerini F, Ravaglia S, Ruiz L, Invernizzi P, Cuzzoni MG, et al. Guillain-Barre Syndrome Associated with SARS-CoV-2. *The New England journal of medicine*. 2020;382(26):2574-6.
40. Atzeni F, Bendtzen K, Bobbio-Pallavicini F, Conti F, Cutolo M, Montecucco C, et al. Infections and treatment of patients with rheumatic diseases. *Clinical and experimental rheumatology*. 2008;26(1 Suppl 48):S67-73.
41. Kilian A, Chock YP, Huang IJ, Graef ER, Upton LA, Khilnani A, et al. Acute respiratory viral adverse events during use of antirheumatic disease therapies: a scoping review. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 2020.
42. Emmi G, Bettiol A, Mattioli I, Silvestri E, Di Scala G, Urban ML, et al. SARS-CoV-2 infection among patients with systemic autoimmune diseases. *Autoimmunity reviews*. 2020;19(7):102575.
43. Zen M, Fuzzi E, Astorri D, Saccon F, Padoan R, Ienna L, et al. SARS-CoV-2 infection in patients with autoimmune rheumatic diseases in northeast Italy: A cross-sectional study on 916 patients. *J Autoimmun*. 2020;112:102502.

44. Michelena X, Borrell H, Lopez-Corbeto M, Lopez-Lasanta M, Moreno E, Pascual-Pastor M, et al. Incidence of COVID-19 in a cohort of adult and paediatric patients with rheumatic diseases treated with targeted biologic and synthetic disease-modifying anti-rheumatic drugs. *Semin Arthritis Rheum.* 2020;50(4):564-70.
45. Favalli EG, Monti S, Ingegnoli F, Balduzzi S, Caporali R, Montecucco C. Incidence of COVID-19 in patients with rheumatic diseases treated with targeted immunosuppressive drugs: what can we learn from observational data? *Arthritis Rheumatol.* 2020.
46. Quartuccio L, Valent F, Pasut E, Tascini C, De Vita S. Prevalence of COVID-19 among patients with chronic inflammatory rheumatic diseases treated with biologic agents or small molecules: A population-based study in the first two months of COVID-19 outbreak in Italy. *Joint bone spine.* 2020.
47. Pene F, Merlat A, Vabret A, Rozenberg F, Buzyn A, Dreyfus F, et al. Coronavirus 229E-related pneumonia in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis.* 2003;37(7):929-32.
48. Favalli EG, Ingegnoli F, Cimaz R, Caporali R. What is the true incidence of COVID-19 in patients with rheumatic diseases? *Annals of the rheumatic diseases.* 2020.
49. Monti S, Balduzzi S, Delvino P, Bellis E, Quadrelli VS, Montecucco C. Clinical course of COVID-19 in a series of patients with chronic arthritis treated with immunosuppressive targeted therapies. *Annals of the rheumatic diseases.* 2020;79(5):667-8.
50. Conticini E, Bargagli E, Bardelli M, Rana GD, Baldi C, Cameli P, et al. COVID-19 pneumonia in a large cohort of patients treated with biological and targeted synthetic antirheumatic drugs. *Annals of the rheumatic diseases.* 2020.
51. Jovani V, Calabuig I, Peral-Garrido ML, Tovar-Sugranes E, Lopez-Gonzalez MD, Bernabeu P, et al. Incidence of severe COVID-19 in a Spanish cohort of 1037 patients with rheumatic diseases treated with biologics and JAK-inhibitors. *Annals of the rheumatic diseases.* 2020.
52. D'Silva KM, Serling-Boyd N, Wallwork R, Hsu T, Fu X, Gravallese EM, et al. Clinical characteristics and outcomes of patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) and rheumatic disease: a comparative cohort study from a US 'hot spot'. *Annals of the rheumatic diseases.* 2020.
53. Pablos JL, Galindo M, Carmona L, Lledo A, Retuerto M, Blanco R, et al. Clinical outcomes of hospitalised patients with COVID-19 and chronic inflammatory and autoimmune rheumatic diseases: a multicentric matched cohort study. *Annals of the rheumatic diseases.* 2020.
54. Ansarin K, Taghizadieh A, Safiri S, Malek Mahdavi A, Ranjbar S, Teymouri S, et al. COVID-19 outcomes in patients with systemic autoimmune diseases treated with immunomodulatory drugs. *Annals of the rheumatic diseases.* 2020.
55. Santos CS, Morales CM, Alvarez ED, Castro CA, Robles AL, Sandoval TP. Determinants of COVID-19 disease severity in patients with underlying rheumatic disease. *Clinical rheumatology.* 2020;39(9):2789-96.
56. Haberman RH, Castillo R, Chen A, Yan D, Ramirez D, Sekar V, et al. COVID-19 in Patients with Inflammatory Arthritis: A Prospective Study on the Effects of Comorbidities and DMARDs on Clinical Outcomes. *Arthritis Rheumatol.* 2020.
57. Williamson E, Walker AJ, Bhaskaran KJ, Bacon S, Bates C, Morton CE, et al. OpenSAFELY: factors associated with COVID-19-related hospital death in the linked electronic health records of 17 million adult NHS patients. *medRxiv.* 2020:2020.05.06.20092999.
58. Gianfrancesco M, Hyrich KL, Al-Adely S, Carmona L, Danila MI, Gossec L, et al. Characteristics associated with hospitalisation for COVID-19 in people with rheumatic disease: data from the COVID-19 Global Rheumatology Alliance physician-reported registry. *Annals of the rheumatic diseases.* 2020;79(7):859-66.
59. Haberman RH, Castillo R, Chen A, Yan D, Ramirez D, Sekar V, et al. COVID-19 in Patients with Inflammatory Arthritis: A Prospective Study on the Effects of Comorbidities and DMARDs on Clinical Outcomes. *Arthritis & Rheumatology.* n/a(n/a).
60. Mathian A, Mahevas M, Rohmer J, Roumier M, Cohen-Aubart F, Amador-Borrero B, et al. Clinical course of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in a series of 17 patients with systemic lupus erythematosus under long-term treatment with hydroxychloroquine. *Annals of the rheumatic diseases.* 2020;79(6):837-9.
61. Rotar Ž. Zdravljenje kroničnih revmatičnih bolezni v času pojavljanja bolezni COVID-19 2020. Available from: <https://www.revmatiki.si/wp-content/uploads/2020/03/20200309-Zdravljenje-kroni%C4%8Dnih-revmatskih-bolezni-COVID-19-final.pdf>.

62. Mikuls TR, Johnson SR, Fraenkel L, Arasaratnam RJ, Baden LR, Bermas BL, et al. American College of Rheumatology Guidance for the Management of Rheumatic Disease in Adult Patients During the COVID-19 Pandemic: Version 2. *Arthritis & Rheumatology*.n/a(n/a).
63. Ragab D, Salah Eldin H, Taeimah M, Khattab R, Salem R. The COVID-19 Cytokine Storm; What We Know So Far. *Front Immunol*. 2020;11:1446.
64. Ouedraogo DD, Tiendrebeogo WJS, Kabore F, Ntsiba H. COVID-19, chronic inflammatory rheumatic disease and anti-rheumatic treatments. *Clinical rheumatology*. 2020;39(7):2069-75.
65. Del Valle DM, Kim-Schulze S, Hsin-Hui H, Beckmann ND, Nirenberg S, Wang B, et al. An inflammatory cytokine signature helps predict COVID-19 severity and death. *medRxiv*. 2020.
66. Lu C, Li S, Liu Y. Role of immunosuppressive therapy in rheumatic diseases concurrent with COVID-19. *Annals of the rheumatic diseases*. 2020;79(6):737-9.
67. Xu X, Han M, Li T, Sun W, Wang D, Fu B, et al. Effective treatment of severe COVID-19 patients with tocilizumab. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(20):10970-5.
68. Gianfrancesco M, Hyrich KL, Yazdany J, Machado PM, Robinson PC. COVID-19 Global Rheumatology Alliance Registry, anti-IL-6 therapy, shared decision-making and patient outcomes. Response to: 'Correspondence on 'Characteristics associated with hospitalisation for COVID-19 in people with rheumatic disease: data from the COVID-19 Global Rheumatology Alliance physician-reported registry' by Gianfrancesco et al. Compassionate use of tocilizumab in severe COVID-19 with hyperinflammation prior to advent of clinical trials - a real-world district general hospital experience' by Khan et al, 'Comment on 'Characteristics associated with hospitalisation for COVID-19 in people with rheumatic disease: data from the COVID-19 global rheumatology alliance physician-reported registry' by Gianfrancesco M et al' by Andreica et al and 'COVID-19 outcomes in patients with systemic autoimmune diseases treated with immunomodulatory drugs' by Ansarin et al. *Annals of the rheumatic diseases*. 2020.
69. Shakoory B, Carcillo JA, Chatham WW, Amdur RL, Zhao H, Dinarello CA, et al. Interleukin-1 Receptor Blockade Is Associated With Reduced Mortality in Sepsis Patients With Features of Macrophage Activation Syndrome: Reanalysis of a Prior Phase III Trial. *Crit Care Med*. 2016;44(2):275-81.
70. Mehta P, Ciurtin C, Scully M, Levi M, Chambers RC. JAK inhibitors in COVID-19: need for vigilance regarding increased inherent thrombotic risk. *Eur Respir J*. 2020.
71. Gremese E, Ferraccioli ES, Alivernini S, Tolusso B, Ferraccioli G. Basic immunology may lead to translational therapeutic rationale: SARS-CoV-2 and rheumatic diseases. *Eur J Clin Invest*. 2020;50(9):e13342.
72. Wang M, Cao R, Zhang L, Yang X, Liu J, Xu M, et al. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Res*. 2020;30(3):269-71.
73. Boulware DR, Pullen MF, Bangdiwala AS, Pastick KA, Lofgren SM, Okafor EC, et al. A Randomized Trial of Hydroxychloroquine as Postexposure Prophylaxis for Covid-19. *The New England journal of medicine*. 2020;383(6):517-25.
74. Wallace B, Washer L, Marder W, Kahlenberg JM. Patients with lupus with COVID-19: University of Michigan experience. *Annals of the rheumatic diseases*. 2020.
75. Balevic SJ, Hornik CP, Green TP, Clowse MEB, Gonzalez D, Maharaj AR, et al. Hydroxychloroquine in Patients with Rheumatic Disease Complicated by COVID-19: Clarifying Target Exposures and the Need for Clinical Trials. *J Rheumatol*. 2020.
76. Russell CD, Millar JE, Baillie JK. Clinical evidence does not support corticosteroid treatment for 2019-nCoV lung injury. *Lancet (London, England)*. 2020;395(10223):473-5.
77. Winthrop KL, Mariette X. To immunosuppress: whom, when and how? That is the question with COVID-19. *Annals of the rheumatic diseases*. 2020;79(9):1129-31.
78. Hough CL. Steroids for acute respiratory distress syndrome? *Clinics in chest medicine*. 2014;35(4):781-95.
79. WHO. Clinical management of COVID-19, interim guidance. [Internet]. 2020. Available from: [https://www.who.int/publications/i/item/clinical-management-of-severe-acute-respiratory-infection-when-novel-coronavirus-\(ncov\)-infection-is-suspected](https://www.who.int/publications/i/item/clinical-management-of-severe-acute-respiratory-infection-when-novel-coronavirus-(ncov)-infection-is-suspected).

POVEZOVANJE KVALITATIVNIH IN KVANTITATIVNIH PRISTOPOV ZA ISKANJE NOVIH REŠITEV NA PODROČJU OBVLADOVANJA PANDEMIJE COVID-19

Doc. dr. Dan Podjed, univ. dipl. etnol. in kult. antrop.

Znanstvenoraziskovalni center SAZU, Inštitut za slovensko narodopisje, Novi trg 2, 1000 Ljubljana, dan.podjed@gmail.com

POVZETEK

Prispevek predstavi možnosti povezovanja kvalitativnih in kvantitativnih pristopov za obvladovanje pandemije covid-19. Posebej poudari prednosti zbiranja t. i. bogatih podatkov s kvalitativnimi (etnografskimi) pristopi in opiše metode, s katerimi lahko pridobimo bolj celovito sliko o tem, zakaj in kako se okužbe širijo med ljudmi in kako na to vplivajo družbeno-kulturni dejavniki. Izpostavi še možnosti za uporabo kombiniranih pristopov, ki presegajo zgolj merljive podatke, pri oblikovanju strategij in politik ter razvoju rešitev za obvladovanje pandemije, ki so ukrojene po meri ljudi.

VSEBINA

1 UVOD

2 PRIDOBIVANJE BOGATIH PODATKOV

2.1 Etnografija

2.2 Intervjuji

2.3 Fokusne skupine

2.4 Hitra ocena stanja

2.5 Video-etnografija

2.6 Terenski obiski

2.7 Senčenje

3 RAZISKOVALNA ETIKA

4 KOMBINIRANJE PRISTOPOV ZA RAZVOJ NOVIH REŠITEV

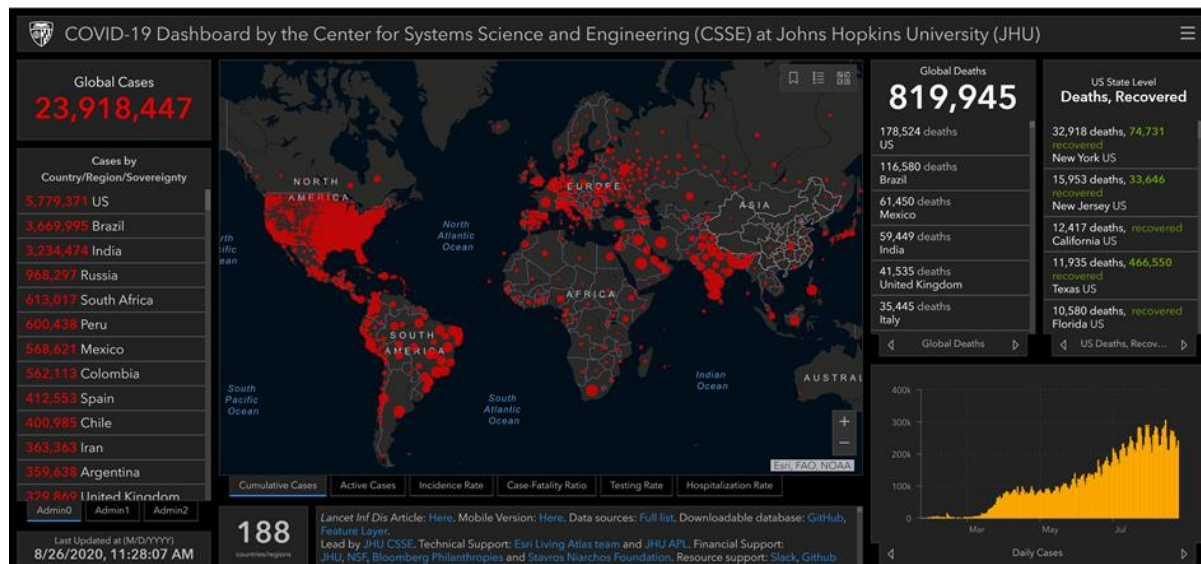
4.1 Oblikovanje strategij in politik

5 SKLEP

6 LITERATURA

1 UVOD

Spletna stran Središča za sistemsko znanost in inženirstvo Univerze Johns Hopkins je postala v prvi polovici leta 2020 izjemno priljubljena in obiskana. Na tej strani so namreč na voljo podatki o številu primerov obolelih s covidom-19, in sicer tako na globalni ravni kot tudi po državah. Na strani redno posodablja podatke o novih primerih, smrtih zaradi bolezni in ozdravelih ljudeh, na karti pa vizualizirajo, kako se virus SARS-CoV-2 širi po svetu in katere države so najbolj ogrožene (1).



Slika 1. Spletna stran Univerze Johns Hopkins ponuja kvantitativni pregled stanja in trendov pri spremljanju pandemije covid-19.

Ta spletna stran, ki jo uporabljajo in navajajo številni mediji, posredno opozarja, kako smo v sodobnem svetu, ki ga obvladujejo informacije in komunikacijske tehnologije, začeli poudarjati vrednost kvantitativnih podatkov pri snovanju politik, strategij in ukrepov za boj proti pandemiji, pozabljati pa smo začeli na kvalitativne podatke, s katerimi lahko bolj celovito razumemo delovanje skupnosti in družbe. Pričujoči prispevek skuša pojasniti, kako lahko kvantitativne pristope nadgradimo in jih povežemo s kvalitativnimi pristopi in na ta način pridobimo širšo podobo družbenega sveta ter začnemo snovati rešitve za zajezitev širjenja okužbe, ki bodo zasnovane po meri ljudi.

2 PRIDOBIVANJE BOGATIH PODATKOV

V devetdesetih letih 20. stoletja se je začel naprej v znanstvenem, kasneje pa tudi v splošnem diskurzu uveljavljati izraz veliki podatki (*angl. big data*), ki opisuje podatkovne nize, ki so preobsežni ali prekompleksni, da bi jih lahko procesirali z običajnimi računskimi pristopi. Za analizo takšnih podatkovnih naborov zato potrebujemo posebno strojno in programsko opremo. Izraz se je iz računalniškega okolja postopno prenesel v vsakdanji jezik in postal modna sintagma, s katero opisujemo svet, utemeljen na informacijskih in komunikacijskih tehnologijah, ki ga ustvarjamo in tolmačimo s pomočjo orodij za podatkovno analizo. Skratka, družbeni svet sooblikujejo tehnologije, kot so pametni telefoni in prenosni računalniki, hkrati pa

te tehnologije omogočajo, da dogajanje v družbi s tovrstnimi napravami spremljamo, analiziramo in interpretiramo.

V času, ko prevladuje zamisel, da lahko s tehnologijami rešimo večino družbenih in okoljskih problemov, smo začeli potiskati ob stran drug(ačn)e načine razumevanja sveta in družbe ter pozabljati, da poleg velikih podatkov poznamo še bogate podatke (*angl. thick data*), ki jih pridobivamo s kvalitativnimi pristopi, denimo z etnografijo, ki je temeljna raziskovalna metoda antropološkega raziskovanja (2). Bogatih podatkov ne pridobivamo z analizo podatkov, ki jih zberemo od tisočev ali milijonov ljudi. Ravno nasprotno: vzorci so v antropologiji in nekaterih drugih vedah, ki uporabljajo etnografijo za spoznavanje družbenega sveta (npr. psihologija, sociologija, etnologija), bistveno manjši. Povsem relevantno je, denimo, raziskovanje v skupini nekaj desetih ljudi, katerih navade in načine življenja skušamo razumeti s poglobljenimi pogovori, predvsem pa živeti z njimi in s t. i. opazovanjem z udeležbo razumeti, zakaj sledijo določenim praksam in navadam (*Preglednica 1*).

Preglednica 1. Primerjava med velikimi in bogatimi podatki.

Veliki podatki	Bogati podatki
Kaj, kje, kdaj, kako, kdo	Kdo, kako, zakaj
Podatkovna analiza	Metode in pristopi, usmerjeni k ljudem
Veliko ljudi	Malo ljudi
Podatke zbirajo in analizirajo z napravami	Podatke zbirajo in interpretirajo ljudje
Obsežni	Poglobljeni
Analiza s statističnimi oz. računskimi metodami	Analiza s kodiranjem in povzemanjem

2.1 Etnografija

Za zbiranje bogatih podatkov lahko uporabimo različne metode (3), med katerimi je vse bolj uveljavljena etnografija, ki je postala »zaščitni znak« antropologije. Njen glavni sestavni del je opazovanje z udeležbo, pri čemer raziskovalec sodeluje pri vsakodnevnih dejavnostih, ritualih, interakcijah in dogodkih skupine ljudi in skuša razumeti eksplicitne in prikriti vidiki vsakdanjih dejavnosti v neki skupnosti (4). Izpostavimo lahko naslednje prednosti etnografskih raziskovalnih pristopov za poslovne in razvojne namene: (i) raziskovalec se zanese na vse svoje čute in je dejansko sam tudi temeljno orodje za pridobivanje podatkov; (ii) sodeluje v najrazličnejših rutinskih dejavnostih in izjemnih situacijah, in sicer to počne skupaj z ljudmi, ki so udeleženci v raziskavi; (iii) uči se načina sporazumevanje z ljudmi v njihovem vsakdanjem jeziku ali narečju; (iv) izvaja neformalno opazovanje med pritožbami in dejavnostmi, kar včasih imenujejo tudi »poglobljeno druženje«; (v) podatke pridobiva tudi med nestrukturiranimi in spontanimi debatami; (vi) opažanja in misli sproti beleži in interpretira, običajno kronološko, s čimer že na terenu analizira in interpretira informacije, (vii) perspektive ljudi skuša razumeti v vsakdanjem okolju, npr. doma ali na delovnem mestu (5).

V najbolj tradicionalni obliki trajajo etnografske raziskave od 12 do 18 mesecev. Če jih uporabimo v akademskem ali poslovnem oziroma industrijskem kontekstu, so lahko izjemno pomembne, saj ponudijo poglobljen vpogled v ozadje vedenjskih vzorcev, ki jih s kvantitativnimi pristopi ne bi mogli zaznati. Čeprav so te raziskave dolgotrajne in zajamejo razmeroma malo ljudi, lahko prav na področju razumevanja pandemije, kakršna je covid-19, z njimi bolje spoznamo globlje vzroke, da se ljudje družijo, čeprav se ne bi smeli, in kršijo predpise – ali pa jih tudi upoštevajo in celo oblikujejo lastne norme in vedenjske vzorce. S takšnim pristopom lahko tudi primerjamo različna družbeno-kulturna okolja in spoznamo navade ljudi, ki vplivajo na vsakdanje odločitve in dejanja.

2.2 Intervjuji

Intervjuji so pogovori ali razprave o določeni temi, ki običajno potekajo iz oči v oči in osebno, čeprav sodobne komunikacijske tehnologije, kot sta Skype ali Zoom, omogočajo, da pogovori potekajo na daljavo. Intervjuji so pogosto posneti in kasneje prepisani ali vsaj interpretirani, kar omogoča naknadno primerjavo in analizo izjav različnih ljudi. Obstajajo različne vrste intervjujev, od strukturiranih do odprtih. Pogosta vrsta je polstrukturiran intervju, pri katerem raziskovalec pripravi in uporabi seznam vprašanj in tem, ki jim sledi med pogovorom. Nato raziskovalec in intervjuvanec (sogovornik) sledita protokolu, a se lahko tudi oddaljita od prvotne strukture vprašanj in odpreta nove teme. Pri izvedbi intervjujev je priporočljivo, da so raziskovalci pripravljeni na improvizacijo in spreminjanje prvotnega protokola. Pri vsakem intervjuju je treba namreč upoštevati možnost, da se lahko v debati razkrije nekaj novega in nepričakovanega, posebej takrat, ko razprava vodi na neraziskano področje (6, 7).

Pri raziskavah o covidu-19 lahko z intervjuji dobimo pomembne informacije o tem, kaj so ljudje počeli med pandemijo, kako so upoštevali zaščitne ukrepe, kaj jih pri državnih strategijah in politikah moti in kako v ekstremni situaciji, v kakršni se je znašla globalna skupnost, ravnaajo ljudje, ki jih dobro poznajo, npr. sorodniki, prijatelji in sodelavci.

2.3 Fokusne skupine

Podatke lahko zbiramo tudi med skupinskimi razpravami oziroma fokusnimi skupinami, med katerimi pridobimo poglobljena in večplastna spoznanja o določeni temi, hkrati pa spoznamo še, kakšna je skupinska dinamika. Ta raziskovalna metoda ima nekaj prednosti pred intervjuji, saj lahko z njim hitro pridobimo veliko informacij, hkrati pa prihranimo čas in sredstva za izvedbo posameznih pogovorov. Poleg tega omogočajo fokusne skupine opazovanje neverbalne komunikacije med člani, njihov odprt format pa dopušča poglobljeno analizo določene teme. Pomembni so še sinergijski učinki, ki jih dosežemo pri pogovoru s skupino in jih ne bi mogli razkriti s posamičnimi intervjuji.

Čeprav gre za pomembno kvalitativno raziskovalno metodo, imajo fokusne skupine nekatere omejitve kot orodje za razvoj in oblikovanje novih rešitev. Z njimi namreč raziskujemo, kaj ljudje mislijo, verjamejo, dojemajo ali čutijo, ni pa nujno, da

nam povedo, kaj dejansko počnejo (8). Obstaja namreč pomembna razlika med tem, kaj ljudje pravijo, da počnejo, in kar dejansko storijo v vsakdanjih situacijah.

Fokusne skupine so lahko pomembne za snovanje novih rešitev zgodaj v raziskovalno-razvojnem procesu, ko želijo raziskovalci spoznati začetne misli in zaznave v določeni skupnosti, da bi v sodelovanju z ljudmi razvili ideje in spodbudili razpravo ali izmenjavo mnenj (9). Pri pandemiji covid-19 lahko z njimi skušamo razumeti, denimo, kako bi se ljudje v nekem družbeno-kulturnem okolju odzvali na nove razmere; s skupinskim pogovorom lahko bolje kot z intervjuji spoznamo tudi, kakšne so glavne prepreke za uvajanje specifičnih zaščitnih ukrepov v skupnosti.

2.4 Hitra etnografija

Ta vrsta etnografske raziskave je prilagojene časovnim zahtevam podjetij in industrije. Metoda vključuje številne pristope, vključno s terenskim delom (opazovanje z udeležbo), video-etnografijo in senčenjem (spremljanje in opazovanje posameznikov skozi krajši čas). Takšno obliko etnografije akademska antropologija pogosto zavrača kot neresno in jo opisuje kot »etnografijo z reaktivca« (10), tj. kot manj dragoceno od tradicionalne etnografije, ki traja več mesecev ali celo let. Nekateri pa pristop vseeno zagovarjajo in pojasnjujejo, da lahko z njim raziskovalno-razvojni projekt usmerimo stran od neproduktivne smeri in se hitro preusmerimo k reševanju konkretnega problema ter naglo prepoznamo specifične težave ali vzorce v skupnosti, ki bi sicer ostali skriti (11). S pristopom lahko pomagam snovati tudi ukrepe, povezane s pandemijo covid-19; hitra etnografija namreč omogoči sočasno zbiranje kvalitativnih podatkov o navadah in praksah ljudi na več lokacijah. Zbrane podatke lahko potem primerjamo in ukrepe prilagodimo različnim situacijam in okoljem.

2.5 Video-etnografija

Cilj te metode je zabeležiti dejavnosti, prakse, vedenja in navade s pomočjo kamere. Pristop je podoben fotografiranju, ki je pogosto sestavni del etnografije, vendar lahko z njim zajamemo daljša časovna obdobja in zabeležimo pogovore z ljudmi. Pristop je koristen za snemanje procesov ali dinamičnih situacij; vendar pa je za analizo videoposnetkov potrebnega več časa kot za analizo fotografskega gradiva (12). Poleg tega lahko kamero ljudje dojamejo kot vsiljiv pripomoček, ki poseže v njihovo zasebnost in celo vpliva na zabeleženo vedenje. Video-etnografija običajno vključuje naslednje korake: (i) določitev lokacije in posameznikov oziroma družbene skupine, (ii) pridobivanje dovoljenj za snemanje, (iii) priprava videoposnetkov in izdelava dnevnika, (iv) analiza in interpretacija podatkov. Pogosto se metoda uporablja v kombinaciji z drugimi raziskovalnimi metodami in pristopi.

2.6 Terenski obiski

Terenski obisk je odlično sredstvo za spoznavanje vsakdanjega življenja in krepitev empatije, ki raziskovalcem pomaga razumeti navade in prakse v specifičnem okolju in spoznati, kaj ljudje želijo in kaj jih motivira. Za razliko od intervjujev ali fokusnih skupin, kjer vprašanja raziskovalcev narekujejo pogovor, terenski obisk poudarja opazovanje in poizvedovanje o tem, kar lahko zaznamo in opazimo. Pristop je koristen za nepristransko in neobremenjeno spoznavanje ljudi in skupnosti in

pogosto vključuje nenavadne dogodke ali implicitna in presenetljiva spoznanja (12). Terenski obisk načeloma sledi naslednjim korakom: (i) načrtovanje protokola (časovni okvir, udeleženci, teme itd.), (ii) priprava orodij in materialov (zvezki, kamere, snemalniki, dokumenti, soglasja itd.), (iii) izvajanje terenske študije (priprava poročila, pisanje dokumentov, opazovanja itd.), (iv) analiza opazanj, (v) pogovor z ekipo. Pristop je podoben opazovanju z udeležbo, a se nekoliko bolj osredotoča na opazovanje in manj na udeležbo. Lahko je koristen za razumevanje družbene dinamike, povezane s pandemijo covid-19, saj raziskovalci na lastne oči vidijo in spoznajo, kako ljudje ravna v določenih situacijah, in na podlagi tega pripravijo primerne ukrepe.

2.7 Senčenje

Senčenje je kvalitativna metoda, ki omogoča spremljanje udeležencev raziskave, ko ti opravljajo svoje vsakodnevne naloge. V izbranem časovnem obdobju, in sicer od nekaj ur do nekaj dni ali tednov, deluje raziskovalec kot opazovalec, ki ne posega v dejavnosti udeležencev raziskave med njihovim vsakdanjim življenjem. V raziskovalnem procesu senčenje pogosto kombiniramo z drugimi metodami (fokusne skupine pred senčenjem, intervjuji po senčenju itd.), saj tako pridobimo bolj celovito analizo zbranih podatkov. Raziskovalni proces se začne z iskanjem kraja in sodelujočih v raziskavi, zagotavljanjem dostopa in vzpostavitvijo zaupanja, nadaljuje se s senčenjem in morebitnim snemanjem situacij oziroma zapisovanjem dogodkov, konča pa z analizo podatkov (13). Metoda je lahko koristna tudi za razumevanje vsakdanjega življenja ljudi, ki skušajo ponotranjiti ukrepe, povezane s pandemijo covid-19. Pri njeni uporabi je treba posebej poudariti raziskovalno etiko in zagotoviti ustrezno varstvo podatkov.

3 RAZISKOVALNA ETIKA

Kvalitativno raziskovanje temelji na raziskovanju ljudi in tudi na odnosih, ki jih raziskovalci vzpostavljajo z ljudmi na terenu. Ne glede na to, ali so raziskave akademske ali aplikativne, so raziskovalci med interakcijami s sogovorniki in pri kasnejših analizah in interpretacijah podatkov zavezani etičnim standardom. Nekatera antropološka društva navajajo tri osnovna etična načela etnografskih oziroma kvalitativnih raziskav: 1. ne delajte škode, 2. bodite odkriti in pošteni, 3. vnaprej pridobite soglasje za raziskave med ljudmi. Čeprav se ta tri načela morda zdijo samoumevna in neproblematična, lahko služijo kot smernice, ko gre za izvajanje kvalitativnih raziskav, ki pogosto vključujejo spremljanje in opazovanje intimnih vidikov življenja.

Raziskovalci, ki delajo za stranko ali naročnika (npr. za podjetje ali državno ustanovo), se ukvarjajo z drugačnim naborom vprašanj kot običajni raziskovalci v akademski sferi. Najpomembneje je, da se v vsakem primeru raziskovalec dosledno drži etičnih načel in standardov. Pri tem je posebej pomembno, da ostanejo anonimni podatki, ki jih posredujejo osebe, ki so sodelovale v raziskavi.

4 KOMBINIRANJE PRISTOPOV ZA RAZVOJ NOVIH REŠITEV

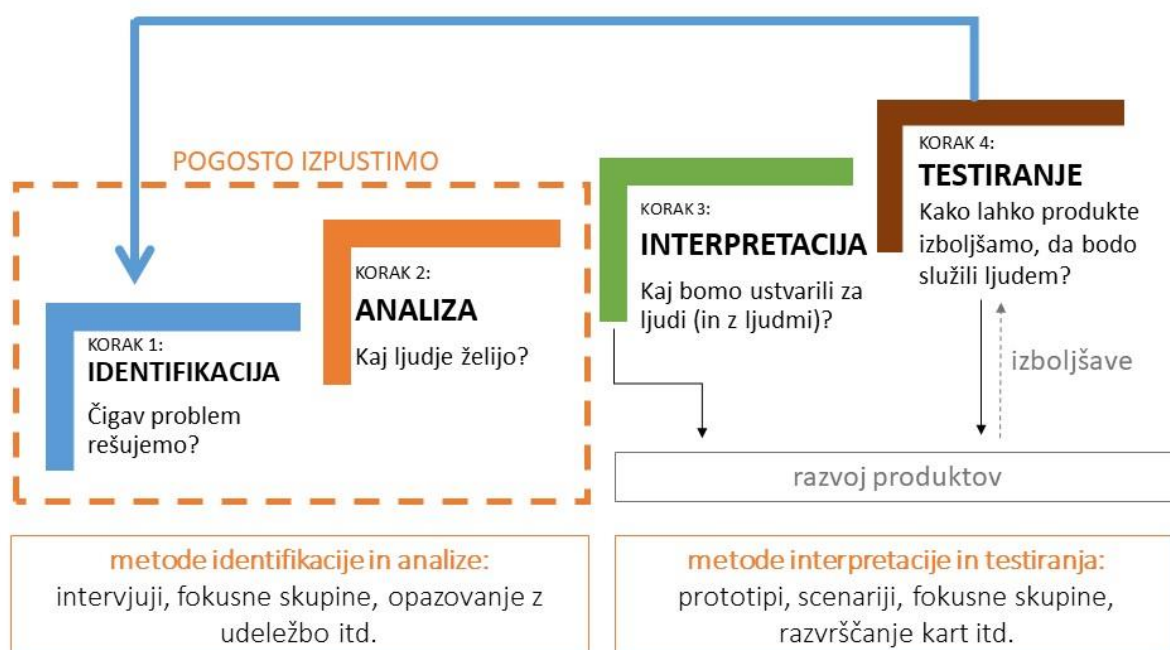
Kvalitativne pristope, predstavljeni v tem prispevku, lahko uspešno kombiniramo s kvantitativnimi pristopi in tako pridobimo bolj celovito sliko fenomena, ki ga proučujemo, denimo širjenja okužbe s covidom-19. Ko zaznamo trende, ki se kažejo s povečanim številom okužb, lahko izvedemo terensko raziskavo in uporabimo intervjuje ali fokusne skupine ter druge metode, da skušamo razumeti, kako se s situacijo soočajo določene družbene skupine. Na podlagi ugotovitev, ki jih zberemo na več mikro-lokacijah, lahko potem razvijamo rešitve, ki so prilagojene ljudem ozirom skupnostim in njihovim specifičnim potrebam, ljudje, ki jih pogosto pasiviziramo z izrazi »uporabniki«, »pacienti« in »stranke«, pa postanejo v tem procesu bolj dejavno vključeni v razvoj in izboljšanje izdelkov in storitev. Tak pristop se sicer zdi samoumeven in intuitiven, a ga javne institucije in slovensko gospodarstvo še ne uporabljajo prav pogosto, uspešno pa so ga preizkusili v številnih multinacionalnih podjetjih. Med začetniki je bil Xerox, kjer v sedemdesetih letih prejšnjega stoletja napravili fotokopirni stroj, ki je bil po koncu inovacijskega procesa ljudem precej bolj prijazen kot prvotna inženirska zasnova. V devetdesetih letih so si pri razvoju inovativnih produktov s pristopom, usmerjenim k ljudem, pomagali v podjetjih Boeing in Microsoft, danes pa ga uporabljajo Intel, Google, General Mills, Nissan, Volvo in številna druga vodilna podjetja (3).

Družboslovni in humanistični metodološki pristopi, s katerimi nadgradimo (so)delovanje drugih področij in ved, so lahko ključni tudi za razvoj rešitev, povezanih z zaježitvijo epidemij in pandemij. Kot pojasnita Emilie Venables in Umberto Pellecchia (14), je bilo povezovanje pristopov izjemno pomembno med izbruhom ebole v Zahodni Afriki v letih 2014 in 2015. Med izbruhom v Liberiji, Gvineji in Sierra Leone so angažirali antropologe in druge strokovnjake s področja družboslovja in humanistike iz različnih organizacij. Ti so s kvalitativnimi pristopi omogočili hiter in neposreden vpogled v stanje na terenu ter razkrili, kako delujejo zdravstveni ukrepi med ljudmi. Njihovi izsledki so vplivali na nadaljnje ukrepe za zaježitev epidemije, ki so bili povezani med drugim z varnimi in dostojanstvenimi pokopi, ustreznim komuniciranjem z lokalnimi skupnostmi ter oblikovanjem gradiv za promocijo higiene in zdravja, ki so bila razumljiva in učinkovita. S takšnim pristopom se je poglobilo razumevanje navad in praks, ki vplivajo na javno zdravje, izboljšale pa so se tudi interakcije lokalnega prebivalstva z zdravstvenimi institucijami.

Tudi med pandemijo covid-19 so se v pripravo ukrepov in razvoj rešitev za zaježitev širjenja bolezni vključili številni antropologi. Poleg specifičnih rešitev, pomembnih za lokalno prebivalstvo na različnih delih sveta in v različnih družbeno-kulturnih okoljih, so pomagali oblikovati nekatere splošne predloge, priporočila in opozorila. Med slednjimi je posebej pomembno, da moramo na globalni ravni v zvezi s pandemijo prenehati uporabljati metafore, povezane z vojno, saj je takšna dikcija napačna in pogosto nevarna. »Za razliko od vojne, ki ločuje ljudi, je za zaježitev pandemije potreben osredotočen, usklajen in kolektiven odziv,« razloži Saiba Varma (15) v svojem odzivu na pandemijo covid-19. S takšnim izhodiščem v mislih lahko potem nastajajo ustrezne strategije in politike po meri ljudi, ki poudarjajo sodelovanje in solidarnost namesto »vojne in boja« za zdravje.

4.1 Oblikovanje strategij, ukrepov in rešitev po meri ljudi

Pristop, s katerim izvedemo premik od ekspertnega razvoja k razvoju po meri ljudi, pionirsko uvajajo tudi nekatere državne ustanove za izboljšanje delovanja javnih zavodov in javne uprave, lahko pa bi ga uporabili tudi pri snovanju strategij in politik, povezanih s pandemijo covid-19. S kvantitativnimi pristopi lahko pridobimo širši vpogled v dogajanje v družbi, s kvantitativnimi (etnografskimi) pristopi pa lahko, kot pojasnjuje ta prispevek, oblikujemo in preizkusimo specifične rešitve, ki delujejo v določenem družbeno-kulturnem okolju ali ožji družbeni skupini. Na ta način lahko oblikujemo tudi strategije, ukrepe in rešitve, s katerimi naslavljamo bodisi širšo javnost bodisi prilagodimo ukrepe točno določenim skupinam ali celo posameznikom. Če želimo takšne prilagoditve storiti, moramo seveda spoznati specifične želje, potrebe in motive teh ljudi ter šele potem pripraviti ustrezne ukrepe. Pri tem lahko sledimo štirim korakom razvoja po meri ljudi (*Slika 2*). Prvi korak je identifikacija, pri čemer skušamo prepoznati in spoznati ljudi, ki bodo neko rešitev uporabljali. Drugi korak je analiza; z njim skušamo razumeti navade, želje, potrebe in pričakovanja ljudi, pri čemer lahko uporabimo različne pristope in metode – od kvalitativnih do kvantitativnih. Tretji korak je interpretacija, pri čemer povabimo ljudi, identificirane s prvim korakom, naj se pridružijo snovanju produktov, torej izdelkov in storitev, ki jih bodo uporabljali. Četrty korak je testiranje; z njim v sodelovanju razvojne skupine in bodočih uporabnikov preizkusimo možnosti za implementacijo produkta. Če je potrebno, se po tej fazi vrnemo na začetek in produkt v več iteracijah bodisi popravimo z novo skupino ljudi bodisi ga zavržemo in pričnemo pripravljati novo storitev ali rešitev. Bistvo pristopa je, da tako nastajajo bolj smiselni in dolgoročno uporabni ukrepi, ki ne nastanejo zgolj za ljudi, temveč jih po načelu soustvarjanja razvijemo v sodelovanju z njimi (16).



Slika 2. Štirje koraki razvoja, usmerjenega k ljudem.

5 SKLEP

Kombiniranje kvalitativnih in kvantitativnih pristopov se kaže kot pomembno za razvoj rešitev, ki lahko pomagajo zajezi pandemijo covid-19. Specifične pristope, ki jih uporabljajo posamezne vede in področja znanosti, bo potrebno v bodoče še bolj povezati in uporabiti tudi t. i. krožne mešane metode, pri katerih ves čas prehajamo med pristopi (17). Da bi dosegli uspešno kombiniranje pristopov, je najbolj smiselno raziskovalno-razvojne postopke vnaprej zasnovati v inter- ali transdisciplinarnih skupinah. Več različnih perspektiv, ki jih ponujajo vede, namreč zagotovi bolj celovit pogled na pandemijo covid-19 in omogoči razvoj inovativnih rešitev po meri ljudi.

Osrednje sporočilo tega prispevka torej je, da moramo pristope in spoznanja različnih ved in znanstvenih področij nujno začeti kombinirati, če želimo ublažiti posledice sedanje zdravstvene krize in se bolje pripraviti na podobne dogodke v prihodnosti. Antropologi, epidemiologi, psihologi, sociolog in drugi strokovnjaki, ki razumejo delovanje družbe in poznajo načine širjenja bolezni, morajo torej začeti sodelovati v večdisciplinarnih ekipah, v katerih bodo vključeni tudi zdravniki, farmacevti, inženirji in drugi poznavalci, ki lahko vplivajo na razvoj novih rešitev. Za vzpostavitev tovrstnega sodelovanja pa je ključno medsebojno poznavanje in priznavanje različnih pristopov za zbiranje in interpretiranje podatkov ter razvoj rešitev.

6 LITERATURA

1. Johns Hopkins University, Center for Systems Science and Engineering. Covid-19 Dashboard. Datum dostopa: 26. 8. 2020. <https://gisanddata.maps.arcgis.com/apps/opsdashboard/index.html#/bda7594740fd40299423467b48e9ecf6>
2. Wang T. Big Data Needs Thick Data. *Ethnography Matters*, 2013. Datum dostopa: 26. 8. 2020. <http://ethnographymatters.net/blog/2013/05/13/big-data-needs-thick-data/>
3. Podjed D, Arko S, Bajuk Senčar T. Four Steps for the People: People-Centred Development Toolkit. PEOPLE, 2017. http://people-project.net/wp-content/uploads/2019/12/M2.4_Toolkit.pdf
4. DeWalt KM, DeWalt BR. Participant Observation. V: *Handbook of Methods in Cultural Anthropology*, Bernard HR (ur.). Altamira Press, 2000; 259–299.
5. Gluesing J. Being There: The Power of Conventional Ethnographic Methods. V: Jordan B (ur.), *Advancing Ethnography in Corporate Environments: Challenges and Emerging Opportunities*, Left Coast Press, 2013; 23–37.
6. Hazan H, Hertzog E. Serendipity in Anthropological Research. Ashgate, 2012.
7. Rivoal I, Salazar NB. Contemporary Ethnographic Practice and the Value of Serendipity. *Social Anthropology* 2013; 21 (2): 178–185.
8. Mehus S. Should You Use a Focus Group for Product Design Research? 2015. Datum dostopa: 26. 8. 2020. <https://blinkux.com/blog/focus-groups/>
9. Goodman E, Kuniavsky M, Moed A. *Observing the User Experience: A Practitioner's Guide to User Research*. Elsevier, 2012.
10. Bate P. Whatever Happened to Organizational Anthropology? A Review of the Field of Organizational Ethnography and Anthropological Studies. *Human Relations* 1997; 50 (9): 1147–1175.
11. Isaacs E. The Value of Rapid Ethnography. V: Brigitte J (ur.), *Advancing Ethnography in Corporate Environments: Challenges and Emerging Opportunities*, Left Coast Press, 2013; 92–107.
12. Kumar V. *101 Design Methods: A Structured Approach for Driving Innovation in Your Organization*. John Wiley & Sons, 2013.

13. Czarniawska B. Shadowing: And Other Techniques for Doing Fieldwork in Modern Societies. Copenhagen Business School Press, 2007.
14. Venables E, Pellecchia U. Engaging Anthropology in an Ebola Outbreak: Case Studies from West Africa. *Anthropology in Action* 2017; 24 (2): 1–8.
15. Varma S. A Pandemic Is Not a War: COVID-19 Urgent Anthropological Reflections. *Social Anthropology* 2020; 28 (2): 376–378.
16. Podjed D. Snovanje prihodnosti antropologije. *Etnolog* 2019; 29: 15–33.
17. Pretnar A, Podjed D. Data Mining Workspace Sensors: A New Approach to Anthropology. V: Fišer D, Pančur A (ur.), *Jezikovne tehnologije in digitalna humanistika*. Znanstvena založba Filozofske fakultete, 2018; 227–233.

