

# LABFORUM

Nowe trendy w **diagnostyce**

nr **74**



Szanowni Państwo

Mam nadzieję, że czytając to wydanie LabForum Wy, Wasze rodziny, pracownicy i przyjaciele jesteście zdrowi pomimo pandemii COVID-19. Życzę Wam siły i wytrwałości w tym jakże bardzo trudnym okresie. Świat drastycznie się zmienił w ciągu zaledwie kilku tygodni.

Pisząc wprowadzenie do ostatniej edycji LabForum wspominałem o SARS-CoV-2, ale nie byłem świadomy ogromnego wpływu, jaki wywrze on na nas wszystkich. Najwyraźniej Europa nie doceniła koronawirusa i w połowie marca konieczne było nałożenie szczególnych ograniczeń w krajach całego kontynentu. Różne obostrzenia wprowadzone także w Polsce na szczęście pomogły ograniczyć liczbę ofiar śmiertelnych oraz pomogły uniknąć sytuacji, które miały miejsce we Włoszech i Hiszpanii.

Teraz rządy łagodzą bardzo restrykcyjne środki i Polska powoli powraca do pewnego stopnia normalności. Oczywiście musimy być czujni, ponieważ wirus jest daleki od pokonania. Dystans społeczny, częste mycie rąk i noszenie masek na twarzy pozostanie z nami przez tygodnie, a nawet i miesiące.

Ta niszczycielska pandemia uwypukliła znaczenie dostępności szybkich i niezawodnych testów oraz analizatorów diagnostycznych. Współpraca na linii rząd – laboratoria – firmy diagnostyczne musi sprawić, że Polska będzie miała odpowiednią infrastrukturę diagnostyczną. Bez odpowiednich możliwości testowania bardzo trudno jest podejmować właściwe decyzje i pomagać polskim obywatelom. Bardzo ważne jest, aby już DZIŚ, być przygotowanym na ewentualną kolejną pandemię.

Skupmy się teraz na artykułach w tym LabForum, które pomogą Państwu zarządzać laboratorium i być świadomym najnowszych trendów. Wiodącym tematem tego wydania jest COVID-19. W numerze znajdziecie Państwo bardzo interesujący artykuł Pani Profesor Jadwigi Nessler na temat SARS-CoV-2 i jego wpływu na pacjentów z chorobami układu krążenia. Wciąż uczymy się, w jaki sposób wirus zagraża pacjentom ze współistniejącymi chorobami, a pacjenci sercowo-naczyniowi mają (w niektórych przypadkach) wyższe ryzyko poważnych powikłań.

Ważne jest, aby przedstawiać fakty, mimo że wciąż istnieje wiele aspektów związanych z SARS-CoV-2, których wciąż w pełni nie rozumiemy. Zamieszczamy informacje o tym jak Roche wspiera walkę z COVID-19 oferując szeroką gamę testów, zarówno molekularnych, jak i serologicznych. Dodatkowo doktor Brygida Beck dzieli się z Państwem pierwszymi własnymi doświadczeniami i wynikami badań wykonanych testem Elecsys anti-SARS-CoV-2. Mamy nadzieję, że informacje te będą pomocne w podejmowaniu świadomych decyzji o doborze testów do aktualnych potrzeb diagnostycznych.

Poza tematem SARS-CoV-2 i COVID-19, Pan Dr Olszewski w interesujący sposób dzieli się z nami informacjami o potrójnie ujemnym raku piersi (TNBC) i o tym jak najlepiej ocenić status PD-L1 guzów raka piersi. Jestem pewien, że spodobają się Państwu zamieszczone w tym numerze artykuły. Jeśli macie Państwo jakieś uwagi, skontaktujcie się z nami.

Szanowni Państwo, życzymy Wam wszystkiego najlepszego na następne tygodnie i miesiące. Bądźcie bezpieczni, zdrowi i dbajcie o siebie i najbliższych. Podczas tej pandemii Wasza rola w laboratoriach diagnostycznych jest kluczowa! Wielki szacunek za Wasze zaangażowanie i poświęcenie!



Z poważaniem

**Ralf Halbach**

Dyrektor Generalny Roche Diagnostics Polska Sp. z o.o.

## Spis Treści

|                                                                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Pacjent z niewydolnością serca w czasie pandemii</i>                                                                                                                 | 4  |
| <i>Ocena PD-L1 przy pomocy testu VENTANA PD-L1 (SP142) w potrójnie ujemnych rakach piersi w celu klinicznego wyboru pacjentów do leczenia celowanego atezolizumabem</i> | 7  |
| <i>Rozporządzenie 2017/746/UE (IVDR) – zmiany w przepisach dotyczących wyrobów do diagnostyki in vitro</i>                                                              | 12 |
| <i>Elecsys® Anti-SARS-CoV-2. Test immunologiczny do oznaczania przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2</i>                                                                     | 16 |
| <i>Badanie przeciwciał: Kolejny krok w walce z COVID-19</i>                                                                                                             | 20 |
| <i>Przeciwciała anty-SARS-CoV-2 w czasie infekcji, w fazie odporności i rekonwalescencji podczas przebiegu COVID-19 - doświadczenia własne.</i>                         | 21 |

Piśmiennictwo dostępne w redakcji



Trzy miesiące temu świat się zatrzymał.  
Dla nas wszystkich.  
Czas jest niezwykle trudny.

Dla ludzi odizolowanych w swoich mieszkaniach,  
niepewnych swojej przyszłości, dla przedsiębiorców,  
ale przede wszystkim dla tych którzy byli i są na  
pierwszej linii frontu walki z wirusem.

### **Diagnostów Laboratoryjnych**

To Wam należy się największe podziękowanie i szacunek!  
Niech ich symbolicznym znakiem będą te słowa...

*Szanujemy  
Podziwiamy  
Dziękujemy*

# Pacjent z niewydolnością serca w czasie pandemii

*prof. dr hab. n. med Jadwiga Nessler, Katedra i Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu*

Niewydolność serca (NS) jest istotnym problemem zdrowotnym, społecznym i ekonomicznym. Wiąże się z wysoką chorobowością i śmiertelnością oraz częstymi hospitalizacjami. W 2017 roku Polska znalazła się na 5. miejscu wśród krajów Unii Europejskiej pod względem liczby chorych z niewydolnością serca (1 130 na 100 tys. ludności).

Przewiduje się, że w najbliższych latach liczba dotkniętych NS osób wzrośnie o blisko 25%, co spowoduje znaczne obciążenie społeczeństwa. Wydaje się, że w najbardziej pełny sposób, aktualną sytuację epidemiologiczną w Polsce przedstawia przygotowany przez Ministerstwo Zdrowia - Raport dotyczący niewydolności serca (w ramach projektu pt.: Mapy potrzeb zdrowotnych – Baza Analiz Systemowych i Wdrożeń), bazujący na danych Narodowego Funduszu Zdrowia (2009-2018), oraz Ministerstwa Cyfryzacji (2013-2018). W latach 2013-2018 chorobowość ulegała stopniowemu wzrostowi (11,6%) z 1 122 877 (2890 na 100 000 ludności) w 2013 do 1 242 129 (3233 na 100 000 ludności) w 2018 roku. Wzrost ten najbardziej widoczny był w grupie kobiet i chorych z etiologią niedokrwinną.

W polskim systemie ochrony zdrowia istnieje wiele nierozwiązanych problemów dotyczących tej grupy chorych. Najważniejszym z nich jest nieodpowiednio zorganizowana opieka ambulatoryjna. Problem ten skutkuje zarówno zbyt późnym rozpoznaniem choroby jak i brakiem odpowiedniego nadzoru nad optymalnym przebiegiem terapii w warunkach ambulatoryjnych, u chorych ze świeżo rozpoznaną NS oraz po wypisie ze szpitala. Ostatecznie prowadzi to do zaostrzenia choroby i konieczności leczenia szpitalnego. Niewydolność serca jest w Polsce najczęstszym powodem hospitalizacji osób po 65. roku życia.

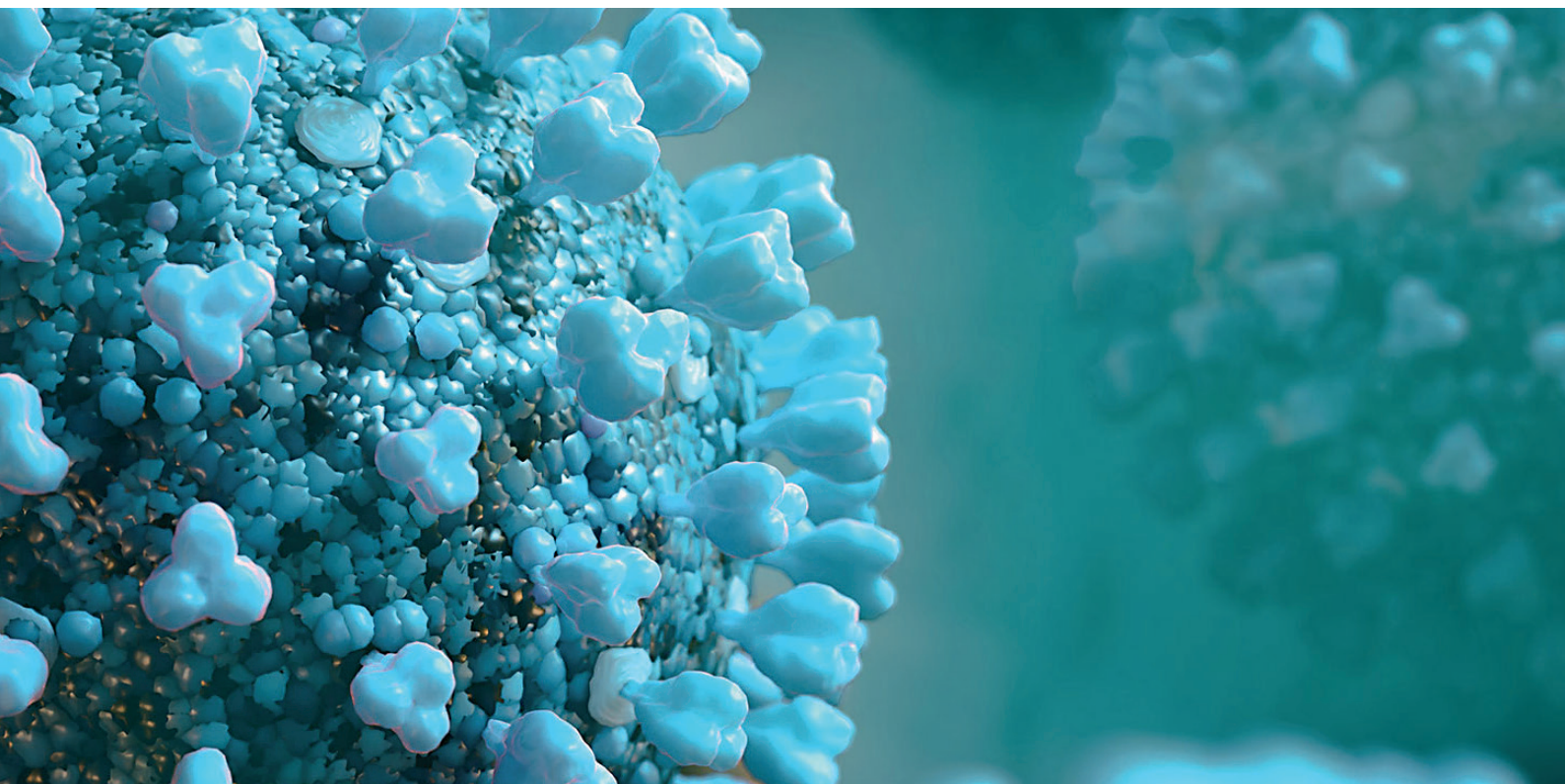
Sytuacja chorych z NS uległa dodatkowo pogorszeniu w związku z pandemią z jaką przyszło nam się mierzyć od kilku miesięcy. Pod koniec 2019 r. nowy wirus, nazwany koronawirusem 2 ciężkiej niewydolności oddechowej (SARS-CoV-2), spowodował epidemię ostrej choroby układu oddechowego w Wuhan w Chinach, którą Światowa Organizacja Zdrowia (WHO, ang. World

Health Organization) nazwała chorobą koronawirusową 2019 (COVID-19). W celu ograniczenia narastania epidemii wprowadzono w Polsce od 14 marca 2020 do odwołania, stan zagrożenia epidemicznego w związku z zakażeniami SARS-CoV-2, a od 20 marca 2020 - stan epidemii, który następnie WHO ogłosiło pandemią.

## **Infekcja SARS-CoV-2 zagrożeniem dla chorych z niewydolnością serca oraz przyczyną powstawania nowych przypadków uszkodzenia serca**

Z dotychczas dostępnych danych z Wuhan z Chin wynika, że różnego rodzaju choroby sercowo-naczyniowe były obecne w prawie 50 proc. przypadków pacjentów, u których doszło do infekcji SARS-CoV-2 (koronawirusem) i zachorowali na COVID-19. Aż 70% pacjentów, którzy zmarli z powodu infekcji SARS-CoV-2 miało jakieś schorzenie układu sercowo-naczyniowego. Nadciśnienie tętnicze stwierdzono u 30% wszystkich pacjentów, którzy zachorowali z powodu infekcji koronawirusem, natomiast aż u 48% pacjentów, którzy nie przeżyli. Obserwacje wskazują, że chorzy z chorobami sercowo-naczyniowymi: nadciśnieniem tętniczym, po przebytym zawale, czy z niewydolnością serca lub cukrzycą są bardziej narażeni na zgon w przebiegu infekcji koronawirusem niż pacjenci, którzy tych chorób nie mają. Wirus jest nie tylko niebezpieczny dla pacjentów z chorobami współistniejącymi. Może także nieodwracalnie uszkadzać serce u osób wcześniej zdrowych.

Oddziaływanie wirusa SARS-CoV-2 na organizm człowieka jest ściśle powiązane z receptorem błonowym – enzymem 2 konwertującym angiotensynę (ACE2, ang. angiotensin-converting enzy-



me 2) oraz układem renina-angiotensyna-aldosteron (RAA, ang. renin-angiotensin-aldosterone). W aktywnym wiązaniu białek otoczki wirusa z komórką gospodarza pomaga przezblonowa peptydaza serynowa typu 2. Największą ekspresję receptora ACE2 wykazano w obrębie pneumocytów. Dlatego płuca są głównymi wrotami wejścia dla SARS-CoV-2. Receptory błonowe ACE2 są obecne także w obrębie komórek mięśnia sercowego (kardiomiocytów), śródbłonna naczyniowego innych narządów w tym nerek, co zwiększa prawdopodobieństwo uszkodzenia wielonarządowego. Dokładny mechanizm uszkodzenia mięśnia sercowego i naczyń przez SARS-CoV-2 nie został w pełni poznany. Wydaje się, że wirus może uszkadzać serce bezpośrednio i lokalnie lub oddziaływać na układ krążenia pośrednio i systemowo w mechanizmie uogólnionej reakcji zapalnej tzw. burzy cytokinowej podczas której dochodzi do wysokiego stężenia interleukin - IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$  oraz nieprawidłowej odpowiedzi immunologicznej. Szybkie namnażanie się wirusa w organizmie prowadzi do różnego stopnia uszkodzenia serca, mózgu i innych narządów. Na szczególne ryzyko mogą być narażeni pacjenci ze współistniejącą chorobą niedokrwienną serca w związku z możliwością pęknięcia płytki miażdżycowej wtórnie do wywołanego przez infekcję wirusową zapalenia ogólnoustrojowego i zwiększonego ryzyka zakrzepowego. W płucach dochodzi do ostrej niewydolności oddechowej - ARDS (ang. acute respiratory distress syndrome). W pracy opublikowanej w czasopiśmie Lancet <[https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(20\)30566-3/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(20)30566-3/fulltext)> opisano losy 191 dorosłych, którzy pomiędzy 29 grudnia 2019 r. a 31 stycznia 2020 r. zostali przyjęci do dwóch szpitali w Wuhanie z laboratoryjnie potwierdzonym COVID-19. Spośród nich 137 zostało wypisanych po wyleczeniu, a 54 zmarło podczas pobytu w szpitalu. Autorzy pracy podkreślają, że najważniejszymi czynnikami ryzyka niepomyślnego przebiegu COVID-19 były: starszy wiek i podwyższone stężenie D-dimerów w momencie przyjęcia do szpitala. Natomiast najczęstszymi powikłaniami infekcji były: sepsa, niewydolność oddechowa, ARDS (zespół ostrej niewydolności oddechowej), niewydolność serca, zaburzenia krzepnięcia oraz ostre uszkodzenie serca. Ryzyko zgonu wyraźnie wzrastało w przypadku pacjentów w starszym wieku, pacjentów z cukrzycą, pacjentów z chorobą wieńcową, z nadciśnieniem tętniczym oraz pacjentów z sepsą. Zakażenie koronawirusem u pacjentów ze schorzeniami sercowo-naczyniowymi może wiązać się z ciężkim przebiegiem śródmiąższowego zapalenia płuc i koniecznością respiratoroterapii. Z drugiej strony niebezpieczne jest także bezpośrednie uszkodzenie mięśnia sercowego przez wirusa, szczególnie u pacjentów z chorobami układu krążenia, zwłaszcza w starszym wieku. Z obserwacji wynika, że śmiertelność u osób poniżej 50 roku życia z powodu infekcji koronawirusa wynosi ok. 1%, wzrasta do 3,6% u osób w wieku powyżej 60 lat sięgając aż 8% u osób powyżej 70 roku życia.

Infekcja SARS-CoV-2 może prowadzić do uszkodzenia serca i objawów niewydolności serca *de novo* już w trakcie trwania zakażenia SARS-CoV-2 lub wystąpienia niewydolności serca w okresie odległym od infekcji. Dane kliniczne dotyczące przebiegu niewydolności serca nowo rozpoznanej (*de novo*) w związku z COVID-19 są skąpe. Dotychczas opublikowane prace z badań populacji chińskiej wskazują na możliwość rozwoju niewydolności serca w okresie ostrym COVID-19 oraz wystąpienie niewydolności serca u ozdrowieńców. Opublikowane przez Wanga i wsp. w lutym br. wyniki obserwacji populacji pacjentów z COVID-19, wskazują że: ostre uszkodzenie serca występowało

u 7,2%, wstrząs u 8,7% i arytmia u 16,7% badanych. Z kolei Huang i wsp. stwierdzili, że u 12% chorych występuje ostre uszkodzenie mięśnia sercowego ze wzrostem stężenia wysokoczułej troponiny I (hsTnI) i nowymi zmianami w ocenie elektrokardiograficznej i echokardiografii. W innej publikacji, spośród 120 chorych z COVID-19, podwyższone stężenie NT-proBNP stwierdzono u 27,5%, a sercowej troponiny I u 10% pacjentów.

Do rozwoju NS *de novo*, zależnie od etiologii może dojść w różnym czasie trwania COVID-19. Najczęściej jednak w ostrej fazie powikłań narządowych, która jest zależna od nasilonych reakcji immunologicznych, z dominującą rolą interleukiny - 6 (IL-6). Niewydolność narządowa dotyka ok. 5% chorych z COVID-19. W publikacji Zhou i wsp. niewydolność serca jest wymieniona jako powikłanie u 23% pacjentów z COVID-19, częściej u chorych, którzy zmarli niż u tych, którzy przeżyli (51,9% vs. 11,7%). W ostrym okresie choroby z towarzyszącym zajęciem serca i objawami NS, dochodzi do wzrostu markerów uszkodzenia m. sercowego. Wyniki oznaczania biomarkerów: NT-proBNP i troponiny w okresie ostrym COVID-19 powinny być interpretowane łącznie z kliniczną oceną pacjenta oraz w połączeniu z oceną elektrokardiograficzną i echokardiograficzną. Podwyższone stężenia hsTn w okresie ostrym COVID-19 nie zawsze wskazują na ostry zespół wieńcowy. Jak dotąd nie ma obserwacji odległej populacji z COVID-19, ale można się spodziewać, że podobnie jak w przebiegu innych chorób wirusowych, u części ozdrowieńców dojdzie do rozwoju NS. Pomocne w identyfikacji tych chorych będą oznaczenia NT-proBNP oraz klasyczne metody obrazowe, jak echokardiografia oraz rezonans magnetyczny serca. U osób, które przebyły COVID-19 tzw. ozdrowieńców, w sytuacji gdy występują objawy kliniczne takie jak: duszność, pogorszenie tolerancji wysiłku, osłabienie, cechy przewodnienia w badaniu przedmiotowym, powinno oznaczyć się stężenie NT-proBNP oraz wykonać badania obrazowe - echokardiografię lub rezonans magnetyczny w celu identyfikacji niewydolności serca *de novo*. Jak wynika z wcześniejszych obserwacji dotyczących rokowania po przebytych pneumokokowym zapaleniu płuc (wzrost śmiertelności w okresie kolejnych 10 lat) monitorowanie stanu układu krążenia wydaje się być istotne w tej grupie chorych w okresie długoterminowym. Obecnie brak jednak danych, pozwalających na określenie czasu i częstotliwości z jaką należy prowadzić ocenę kardiologiczną w celu potwierdzenia obecności niewydolności serca jako powikłania narządowego w przebiegu COVID-19.

## Rozpoznanie zakażenia SARS-CoV-2

Rozpoznanie zakażenia opiera się na stwierdzeniu typowych dla SARS-CoV-2 objawów klinicznych, a więc ostrej infekcji dróg oddechowych o nagłym początku i przynajmniej jednym z objawów: gorączka, kaszel, duszność. W przypadku pacjentów z wywiadem niewydolności serca takie objawy mogą występować przy dekompensacji krążenia z towarzyszącym stanem zapalnym, dlatego w dobie pandemii należy być szczególnie czujnym i każde zaostrzenie NS przebiegające z gorączką traktować jak możliwą infekcję SARS-CoV-2. Zgodnie z wytycznymi zawartymi w Zaleceniach w COVID-1, Agencji Oceny Technologii Medycznych i Taryfikacji podstawową techniką rozpoznania zakażenia SARS-CoV-2, zgodnie z dowodami naukowymi, jest technika rRT-PCR (reverse-transcription real-time PCR). Metody izotermiczne amplifikacji mogą być atrakcyjną alternatywą. Wykrywanie obecności materiału genetycznego wirusa jest możliwe tylko

w aktywnej fazie choroby, gdy obecna jest replikacja w tkankach, z których materiał został pobrany. Zaletą testów molekularnych jest możliwość potwierdzenia zakażenia we wczesnej fazie, gdy jeszcze nie doszło do produkcji przeciwciał oraz możliwość wykluczenia aktywnej replikacji po przechorowaniu. Wśród ograniczeń wykorzystania technik molekularnych w diagnostyce zakażeń SARS-CoV-2 wymienia się czasochłonność i skomplikowaną procedurę. Szybkie testy molekularne są najczęściej oparte na technologiach kasetowych z zastosowaniem technologii rRT-PCR i izotermicznej i mogą być stosowane przy łóżku chorego.

## Leczenie farmakologiczne

Jak dotąd, nie ma przekonujących dowodów naukowych na skuteczność w COVID-19 jakiegokolwiek leku, poza hamującą tworzenie zakrzepów heparyną. Zalecenia wskazują na możliwość wdrożenia leczenia z zastosowaniem surowicy ozdrowieńców, tocilizumabu (blokuje receptor IL-6), remdesiwiru, lopinawiru /ritonawiru, fawipirawiru oraz chlorochiny lub hydrochlorochiny (niepotwierdzone w dużym badaniu obserwacyjnym – przypisek red. NEJM 7 maj, 2020). Ze względu na dotychczasowy brak wiarygodnego potwierdzenia ich wyższej skuteczności w stosunku do nie leczenia oraz niebezpieczne działania niepożądane, aktualnie uważa się, że można je stosować wyłącznie w szpitalu, w ramach badań klinicznych (Zalecenia w COVID-1. Agencja Oceny Technologii Medycznych i Taryfikacji)

## Zalecenia dla pacjentów z niewydolnością serca w dobie pandemii

Aktualnie nie ma swistego dla pacjentów z niewydolnością serca leczenia w sytuacji zakażenia koronawirusem. Przez jakiś czas pojawiały się informacje, że niebezpieczne może być stosowanie u pacjentów z niewydolnością serca lub nadciśnieniem tętniczym inhibitorów enzymu konwertującego angiotensynę (ACE), który jest homologiem receptora ACE2. Było to związane z pojawieniem się w publikacji Sommerstain i Grani hipotezy, że stosowanie leków z grupy ACE-I, może prowadzić do nadmiernej ekspresji ACE2 i w efekcie zwiększenia indywidualnej podatności na infekcję SARS-CoV-2. W rzeczywistości, ACE2 zidentyfikowano jako funkcjonalny receptor dla SARS-CoV-2 wykazując, że komórki posiadające na swojej powierzchni ACE2 są podatne na wnikanie wirusa. Jednak infekcja wirusowa jest również możliwa w przypadku komórek nie posiadających ACE2, co sugeruje, że może istnieć dodatkowa droga dla infekcji SARS-CoV-2.

W leczeniu NS inhibitory RAA pełnią kluczową rolę z uwagi na udowodnione korzystne działania na poziomie komórkowym. Efekty terapeutyczne są również istotne w leczeniu chorób płuc z uwagi na obecność w płucach receptorów AT1 i AT2, które są podatne na oddziaływanie Ang II i Ang (1-7). Biorąc pod uwagę wyżej dostępne dane, zgodnie z najnowszym stanowiskiem PTK oraz ESC / AHA / ACC, w chorobach sercowo-naczyniowych w tym niewydolności serca, terapia oparta o inhibitory RAA powinna być kontynuowana oraz planowo rozpoczynana u nowo zdiagnozowanych pacjentów. Ostatnie obserwacje nie potwierdzają zwiększonego ryzyka infekcji i powikłań związanych z COVID-19 (zob. NEJM, 1 maja 2020). Podczas pandemii u chorych z NS bardzo ważne jest zachowanie właściwej podaży płynów ustrojowych ponieważ zapewnia to odpowiednią perfuzję narządową. Nadmierna płynoterapia zaostrza hipoksemię u pacjentów

z COVID-19. Stąd też w celu zredukowania wysięku płucnego i poprawienia oksygenacji, należy prowadzić odpowiednio zbilansowaną płynoterapię, zapewniającą pacjentowi odpowiednią perfuzję tkankową. Bardzo ważne jest, aby chorzy przyjmowali zalecone leki oraz zwracali uwagę na stan swojego zdrowia. Umiejętność nadzorowania przebiegu swojej choroby tzw. samoopieka, a więc monitorowanie trzech podstawowych parametrów: wagi, częstości rytmu serca i ciśnienia tętniczego pozwala na uniknięcie zaostrzeń choroby. Wiedzę na ten temat pacjent może czerpać ze strony [www.slabeserce.pl](http://www.slabeserce.pl), gdzie znajdują się wszystkie informacje edukacyjne dla pacjentów. W czasie pandemii pacjenci z niewydolnością serca powinni stosować się do ogólnie obowiązujących zaleceń. Będąc w grupie osób szczególnie narażonych na zakażenie powinni unikać kontaktów z innymi osobami, także z dziećmi i wnukami. U osób młodych infekcja może przebiegać łagodnie lub bezobjawowo, dlatego tak ważna jest izolacja w domu, rezygnacja ze spotykania się z rodziną, z wizyt w przychodni, jeśli to nie jest konieczne. W przypadku pogorszenia stanu zdrowia konieczny jest kontakt telefoniczny z lekarzem prowadzącym. Przy zaostrzeniu choroby chorzy z NS nie powinni odwlekać wizyty u lekarza lub leczenia szpitalnego. Ważne jest także dbanie o higienę, restrykcyjne przestrzeganie tego, żeby nie dotykać przedmiotów w miejscach ogólnie dostępnych - mogą one być skażone wirusem. Pacjent z niewydolnością serca nie powinien wychodzić z domu w okresie epidemii, jeśli nie jest to uzasadnione, a jeśli jest to bezwzględnie konieczne to powinien mieć na sobie maseczkę i rękawiczki. Powinien pamiętać o przestrzeganiu 2 metrowego dystansu. Ważne jest dobre odżywianie uwzględniające zbilansowaną dietę oraz regularne, codzienne wykonywanie ćwiczeń, które mogą zapobiec powikłaniom zakrzepowo-zatorowym.

## Podsumowanie

Pacjent z niewydolnością serca w czasie pandemii SARS-CoV-2 jest w grupie znacznego ryzyka zarówno zakażenia, powikłań i ciężkiego przebiegu choroby jak i poinfekcyjnego uszkodzenia serca w okresie po zakończeniu choroby. Dlatego powinien przyjmować regularnie zalecone leki, monitorować stan swojego zdrowia w oparciu o podstawowe parametry życiowe (ciśnienie tętnicze, waga ciała, częstość rytmu serca) oraz stosować się do zaleceń dietetycznych. Postępowanie z pacjentami z niewydolnością serca w dobie pandemii SARS-CoV-2 powinno opierać się na utrzymaniu dotychczasowej farmakoterapii zgodnie z obowiązującymi wytycznymi ESC/PTK. Szczegółowe informacje zawarte zostały w dokumencie **Pacjent z niewydolnością serca w obliczu pandemii COVID-19 – stanowisko Sekcji Niewydolności Serca Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego (Kardiologia Polska w druku).**

Wskazania do planowych zabiegów interwencyjnych (rewaskularyzacja, elektroterapia, zabiegi zastawkowe i inne) powinny być ocenione indywidualnie i w miarę możliwości odroczone. Wobec ograniczonego kontaktu z lekarzem nadzorującym leczenie szczególnego znaczenia nabiera teleporada i samokontrola pacjenta (<http://www.slabeserce.pl>).

# Ocena PD-L1 przy pomocy testu VENTANA PD-L1 (SP142) w potrójnie ujemnych rakach piersi w celu klinicznego wyboru pacjentów do leczenia celowanego atezolizumabem

*dr n.med Wojciech P. Olszewski, Zakład Patologii i Diagnostyki Laboratoryjnej, Narodowy Instytut Onkologii PIB im Marii Skłodowskiej Curie w Warszawie*

Zainteresowanie rakami należącymi do podtypu potrójnie ujemnego w ostatnich latach wynika głównie z dwóch przyczyn. Pierwsza to wyniki badań Niemieckiej Grupy Badania Raka Piersi opublikowane w 2012 roku. Wykazano w nich, że w 2 podtypach biologicznych raka piersi, potrójnie ujemnym i HER2 dodatnim, uzyskanie całkowitej odpowiedzi patomorfologicznej (pCR) po leczeniu neoadjuwantowym koreluje z odległymi parametrami odpowiedzi na leczenie (PFS, OS). Tym samym dążenie do uzyskania całkowitej odpowiedzi patomorfologicznej w tych podtypach jest istotne i korzystne dla pacjenta. Patomorfologiczna całkowita odpowiedź staje się surogatowym punktem końcowym badań klinicznych.

Choć nie wszyscy onkolodzy są przekonani do wartości tak określonego punktu końcowego badań klinicznych, to badania nowych leków w tej populacji pacjentów dają już efekty. Drugą przyczyną są nowe leki i nowe sposoby leczenia, których zastosowanie w najgorzej rokującym podtypie raka piersi ma szczególne znaczenie. Zaowocowało to modyfikacjami w tradycyjnym leczeniu systemowym pacjentów z takimi rakami (np. *dose dense*). W przypadku nowych leków istotna jest selekcja pacjentek, które mogą potencjalnie skorzystać z ich zastosowania. Wartość wcześniejszych badań w tym kierunku, które wyróżniły kilka kategorii w obrębie podtypu potrójnie ujemnego, jest weryfikowana w kontekście nowych leków celowanych (np. raki immunomodulacyjne i raki PD-L1 dodatnie w immunoterapii atezolizumabem). Wydaje się, że zgodnie z wcześniejszymi kryteriami wyróżniania podtypów raka piersi, w których sposób leczenia odgrywał istotną rolę również wśród raków potrójnie ujemnych nowe leki celowane pozwolą wprowadzić wartościowy klinicznie podział tej grupy nowotworów.

Celem poniższego artykułu jest sposób oceny statusu PD-L1 w rakach piersi.

Ze względu na fakt, że wiarygodne wyniki korelacji statusu PD-L1 z korzyścią terapeutyczną, zostały przedstawione w badaniu klinicznym IMpassion130, kryteria dotyczą przeciwciała użytego w tym właśnie badaniu: VENTANA PD-L1 (SP142).

Badanie IMpassion130 zostało zaprojektowane do oceny efektów leczenia potrójnie ujemnego raka piersi (TNBC, ang. triple negative breast carcinoma) z zastosowaniem leku celowanego atezolizumabu dodanego do jednego ze sposobów leczenia systemowego. Wyniki badania wskazały, że w grupie pacjentów, u których stwierdzono dodatni status PD-L1 i zastosowano atezolizumab jako uzupełnienie leczenia systemowego, obserwowana była istotna korzyść terapeutyczna.

Z punktu widzenia patomorfologa, którego zadaniem jest wskazanie pacjentek, które potencjalnie mogą odnieść korzyść z zastosowania atezolizumabu, najważniejsza różnica w stosunku do oceny innych czynników predykcyjnych w raku piersi polega na ocenie parametru mikrośrodowiska, a nie komórek raka. W przypadku badania immunopatologicznego PD-L1 (SP142) w raku piersi, reakcję barwną oceniamy w komórkach immunologicznych (limfocytach, granulocytach, makrofagach i komórkach

dendrytycznych) znajdujących się w zrębie tkaniny raka. Jest tak dlatego, że interpretacja wyników badania IMpassion130 wykazała, że korelacja między podaniem atezolizumabu a korzyścią terapeutyczną była największa w takiej grupie przypadków.

Inny w stosunku do rutynowo ocenianych czynników predykcyjnych jest również sposób oceny PD-L1 (SP142). Wynik to odsetek obszaru zachowanego tkaniny guza (bez wliczania martwicy i włókien) zajętego przez wybarwione komórki immunologiczne.

Te dwie istotne różnice w ocenie immunopatologicznej w stosunku do oceny receptorów steroidowych (estrogenowego (ER) i progesteronowego (PgR)) i receptora HER2, wymagają dokładniejszego postępowania.

## Określenie potrójnie ujemnego podtypu biologicznego

W pierwszym etapie określenia statusu PD-L1 (SP142) w rakach piersi należy wskazać raki potrójnie ujemne.

Potrójnie ujemny rak piersi (TNBC) to nowotwór, który nie wykazuje obecności receptorów steroidowych i nadekspresji białka HER2 w ocenie immunohistochemicznej. W części przypadków raka piersi określonych jako graniczne, wykonuje się dodatkową ocenę HER2 metodami biologii molekularnej. W rakach potrójnie ujemnych nie stwierdza się amplifikacji genu HER2.

Ujemne wyniki oceny tych parametrów oznaczają, że powiększanie się tego nowotworu i jego progresja nie jest stymulowana przez receptory dla estrogeny i progesteronu ani poprzez receptor HER2. W konsekwencji tego potrójnie ujemny rak piersi nie reaguje na terapię hormonalną, ani na leki ukierunkowane na blokowanie receptora HER2. Te dwie grupy leków w ostatnich dwóch dekadach w sposób istotny poprawiły efekty leczenia, a nie mogą być stosowane w podtypie potrójnie ujemnym. Do niedawna leczenie potrójnie ujemnego raka piersi polegało wyłącznie na leczeniu chirurgicznym i stosowaniu tzw. tradycyjnej chemioterapii.

Raki potrójnie ujemne stanowią około 10-20% raków piersi. Ten stosunkowo duży rozrzut w odsetku tego podtypu raka wiąże się z cechami populacji – z danych ze Stanów Zjednoczonych wynika, iż wyższy odsetek spowodowany jest m.in. wliczeniem w nie kobiet o pochodzeniu afroamerykańskim i latynoskim, jak i udział

i typ mutacji BRCA 1 w populacji – ok. 70% raków związanych z tą mutacją jest potrójnie ujemnych. Na przestrzeni ostatnich dekad zmianie ulegały również progi dla dodatniego odczynu immunohistochemicznego przy ocenie receptorów steroidowych – były one konsekwentnie obniżane. Wskutek tego, biorąc pod uwagę definicję, zmniejszył się odsetek potrójnie ujemnych raków piersi w stosunku do pozostałych podtypów raka piersi. Należy również pamiętać, że udział raków potrójnie ujemnych wśród rozsia-nych nowotworów piersi jest wyższy niż w guzach pierwotnych. W Polsce w zestawieniu danych z obecnego Narodowego Instytutu Onkologii w Warszawie w latach 2016-2018 pierwotnych raków potrójnie ujemnych było 9,6%, a wśród rozsia-nych – 17,9%. U pacjentek z TNBC z przerzutami obserwuje się niekorzystne wyniki kliniczne, zwykle z szybką progresją i medianą przeżycia całkowitego (OS) poniżej 1 roku.

Pojęcie raka potrójnie ujemnego powstało w momencie, kiedy rutynowo zaczęto oznaczać obecność receptorów steroidowych wraz z receptorem HER2, czyli około 2000 roku. Od początku tę grupę raków wiązano z gorszym rokowaniem. Dekadę później doświadczenie kliniczno-patologiczne zostało skodyfikowane w nowej klasyfikacji raków piersi zaproponowanej w St. Gallen. Zaproponowany nowy podział uwzględnia większą liczbę podtypów i podobne, ale zmienione częściowo nazewnictwo. Według Konsensusu Międzynarodowych Ekspertów z St. Gallen z 2011 roku wszystkie naciekające raki piersi mogą być podzielone na 7 grup:

- luminalne A,
- luminalne B (HER2 ujemne),
- luminalne B (HER2 dodatnie),
- HER2 dodatnie (neluminalne),
- potrójnie ujemne przewodowe,
- STH hormonozależne (STH – specjalny typ histologiczny),
- STH hormononiezależne.

Ustalenie podtypu biologicznego polega na stwierdzeniu odpowiedniej kombinacji ER, PgR, HER2 i Ki67 i typu histologicznego. Każdy z podtypów wiąże się z zalecanym schematem leczenia.

Określenie typu histologicznego pozwala wyselekcjonować raki przewodu bez innego określenia (wg Klasyfikacji ŚOZ – Nowotwory Piersi – V edycja, 2019) i zrazikowe, stanowiące łącznie około 90% naciekających raków piersi, w których określone mogą być podtypy biologiczne. Pozostałe przypadki należą tradycyjnie do kategorii specjalnych typów histologicznych: hormonalnie zależne (cewkowy, sitowaty i śluzowy) lub niezależne (rdzeniasty, gruczolowato-torbielowaty, metaplastyczny, wydzielniczy).

Od roku 2009 za raki steroidoujemne uznawane są wszystkie, w których nie stwierdzono immunopatologicznie dodatniej reakcji barwnej ER lub PgR w jakimkolwiek odsetku jąder naciekającego komponentu raka (w praktyce poniżej 1%).

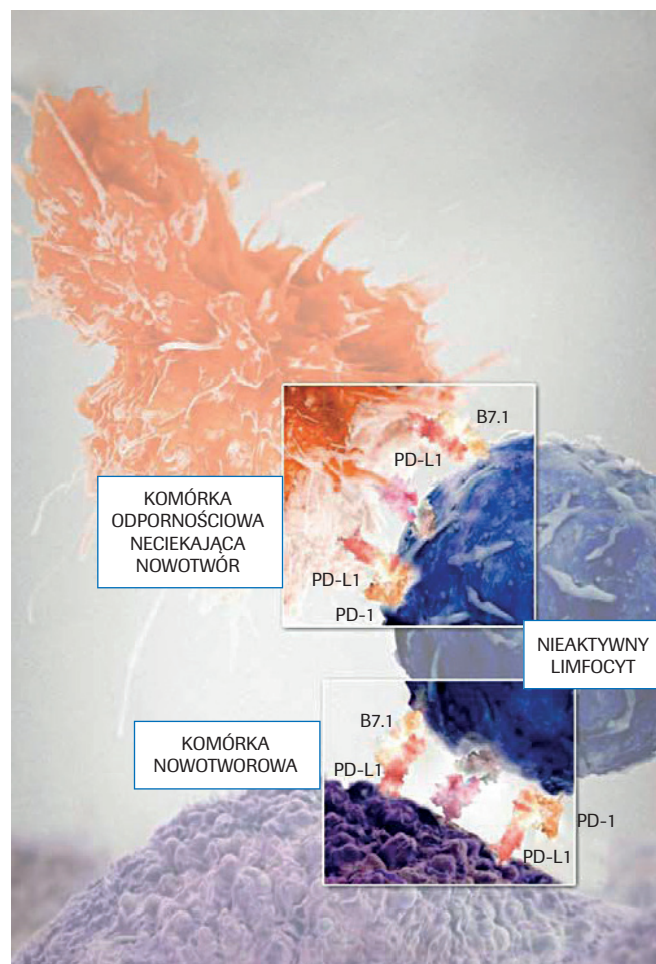
Przypadki o ujemnym statusie HER2 to takie, w których nie wykazano immunopatologicznie reakcji barwnej określanej na 3+

(wg ASCO/CAP) lub nie stwierdzono amplifikacji genu HER2 jedną z metod ISH (np. SISH).

Tak więc ocena PD-L1 musi być poprzedzona rutynową diagnostyką materiału (biopsji gruboigłowej lub materiału pooperacyjnego) wraz z oznaczeniem wymaganych czynników predykcyjnych.

#### Schemat 1.

Ścieżka PD-L1



#### Rola PD-L1

PD-L1 jest białkiem transbłonowym, które reguluje odpowiedź immunologiczną poprzez wiązanie z dwoma receptorami programowanej śmierci 1 (PD-1) i B7.1. PD-1 to receptor hamujący, ulegający ekspresji na limfocytach T po ich aktywacji, która jest podtrzymywana w stanach długotrwałej stymulacji, np. podczas przewlekłego zakażenia lub w przebiegu raka.

Ligacja PD-L1 z PD-1 hamuje proliferację limfocytów T, wytwarzanie cytokin oraz aktywność cytolityczną, prowadząc do funkcjonalnej inaktywacji limfocytów T lub wprowadzenia ich w stan wyczerpania (ang. exhaustion). B7.1 to cząsteczka, która ulega ekspresji na powierzchni komórek prezentujących antygen i aktywowanych limfocytach T. Wiązanie PD-L1 z B7.1 na powierzchni komórek T oraz z komórkami prezentującymi antygen może prowadzić do obniżenia odpowiedzi immunologicznej, w tym do inhibicji aktywacji limfocytów T i wytwarzania cytokin. Ekspresję PD-L1 obserwowano w komórkach układu odpornościowego

i komórkach nowotworowych. Stwierdzono, że nieprawidłowa ekspresja PD-L1 na powierzchni komórek guza zmniejsza odporność przeciwnowotworową, prowadząc do upośledzenia odpowiedzi immunologicznej. W związku z tym przerwanie ścieżki PD-L1/PD-1 stanowi potencjalnie korzystną strategię wzmocnienia swoistej dla guza odporności limfocytów T, która jest tłumiona przez ekspresję PD-L1 w mikrośrodowisku tego guza. Stwierdzono, że atezolizumab, którego działanie jest ukierunkowane na ścieżkę PD-L1, wykazuje aktywność u pacjentek z zaawansowanymi nowotworami, u których standardowe postępowanie nie było skuteczne, w tym u pacjentek z potrójnie ujemnym rakiem piersi.

## Ocena PD-L1

Test VENTANA PD-L1 (SP142) jest testem immunohistochemicznym wykorzystującym pierwotne, królicze przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko PD-L1, co umożliwia stwierdzenie obecności białka PD-L1. Test ten został opracowany przez Roche/Ventana Medical Systems, Inc. (Ventana) i Roche/Genentech w celu identyfikacji pacjentów z miejscowo zaawansowanym lub przerzutowym TNBC, u których najprawdopodobniej wystąpi odpowiedź na leczenie atezolizumabem. Test VENTANA PD-L1 (SP142) wybarwia niejednorodną populację komórek odpornościowych. Większość z nich wykazuje cechy budowy morfologicznej limfocytów, makrofagów, komórek dendrytycznych i granulocytów.

Do oceny może być kwalifikowany materiał tkankowy zawierający utkanie raka naciekającego piersi o podtypie biologicznym (ang. intrinsic type) TNBC uzyskany z resekcji lub w wyniku biopsji gruczołowej guza pierwotnego lub z przerzutów. Materiał cytologiczny oraz materiał po odwapnianiu (np. z przerzutów do kości) nie nadaje się do oceny z powodu braku badań walidacyjnych. Tkanka zawierająca histologicznie utkanie raka potrójnie ujemnego nadaje się do oceny testem VENTANA PD-L1 (SP142), jeżeli zawiera co najmniej 50 zachowanych komórek nowotworowych wraz ze zrębem.

Istotną rolę odgrywa wpływ warunków przedanalizy w wyniku testu VENTANA PD-L1 (SP142). Zaleca się utrwalanie preparatu w 10% NBF przez 6-72 godzin.

## Przygotowanie preparatów

Należy wybarwić trzy wycinki z każdego przypadku, tj. jeden seryjny skrawek tkanki metodą barwienia hematoksyliną i eozyną (HE), drugi seryjny skrawek tkanki przy użyciu króliczego przeciwciała monoklonalnego, a trzeci seryjny skrawek tkanki barwiony testem VENTANA PD-L1 (SP142).

Jeżeli po barwieniu H&E okaże się, że materiał pacjenta nie jest odpowiedni, należy uzyskać nowy bloczek parafinowy, wykonać ponownie preparaty i zabarwić testem VENTANA PD-L1 (SP142).

Należy odpowiednio wybarwić tkankę z odczynowym migdałkiem i ocenić ją zgodnie z kryteriami akceptacji dla tego typu materiału podczas każdej serii testu, aby została ona uznana za ważną. Wykonywane jest tylko jedno dla całej serii barwień IHC PD-L1.

Szkiełka z preparatem wybarwionym w kierunku PD-L1 powinny być oceniane przez przeszkolonego lekarza patomorfologa. Je-

żeli tkanka kontrolna barwiona w kierunku PD-L1 bądź preparat barwiony NRC (ang. negative reagent control, pol. negatywna kontrola odczynnika) nie są dopuszczalnej jakości, należy ponownie zabarwić materiał pacjenta.

## Kontrola ujemna

W przypadku każdego preparatu należy wykonać odpowiednią kontrolę ujemną, aby ocenić nieswoiste barwienie oraz ułatwić interpretację wyników.

Każdy materiał jest barwiony przy użyciu VENTANA PD-L1 (SP142) i odpowiedniej kontroli ujemnej, czyli króliczego przeciwciała monoklonalnego. Komórki odpornościowe naciekające guz (infiltrating cells, IC) są oceniane pod kątem obecności sygnału DAB (3,3'Diaminobenzidyna). Odpowiedni preparat histologiczny barwiony NRC jest wykorzystywany w celu oceny nieswoistego barwienia tła oraz stopnia wybarwienia tła. Podczas barwienia testem VENTANA PD-L1 (SP142) zaleca się korzystanie z zestawu OptiView DAB IHC Detection Kit i OptiView Amplification Kit.

## Szczegółowa metoda interpretacji

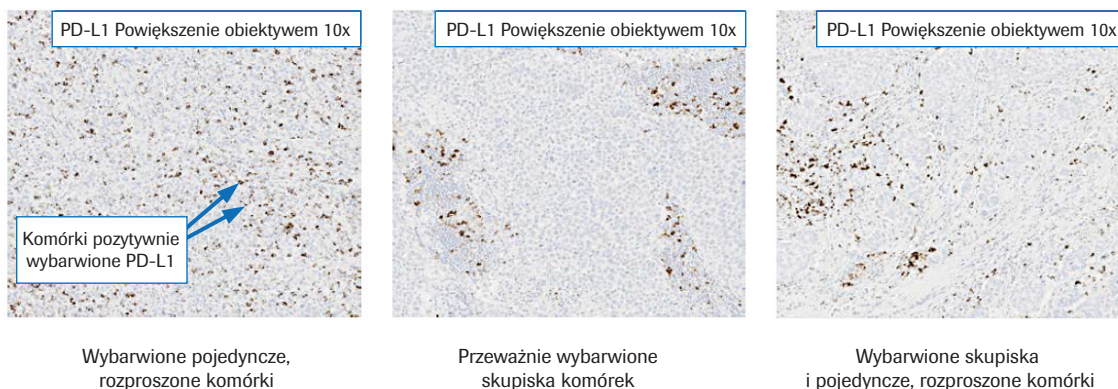
Barwienie komórek IC przy pomocy testu VENTANA PD-L1 (SP142) ocenia się jako odsetek powierzchni guza zajmowany przez komórki odpornościowe o widocznym barwieniu PD-L1, o każdej intensywności. Komórki odpornościowe naciekające guz to limfocyty, makrofagi i komórki morfologii dendrytycznej lub siateczkowej. Obszar guza jest obszarem zajmowanym przez komórki nowotworowe oraz zręb wewnątrzguzowy i okołoguzowy. Biorąc pod uwagę, że komórki odpornościowe występują nie tylko w obrębie zrębu, ale także jako pojedyncze lub rozproszone komórki wśród komórek guza, powierzchnia guza została wybrana jako element wspólny.

Dokonując oceny PD-L1 należy oszacować odsetek komórek IC wybarwionych testem VENTANA PD-L1 (SP142) w małym powiększeniu (2x lub 4x) po ocenie całkowitej powierzchni guza w dużym powiększeniu. Wzrokowo ocenić powierzchnię dodatkowych komórek IC i oszacować, jaką są częścią całkowitej powierzchni guza. W fazie uczenia pomocne mogą być zdjęcia referencyjne przedstawiające różne odsetki wybarwionych komórek IC dostępne w materiałach szkoleniowych testu VENTANA PD-L1 (SP142).

Komórki odpornościowe naciekające guz (IC) ocenia się jako odsetek powierzchni guza zajmowany przez PD-L1 - dodatnie komórki IC o każdej intensywności. Próbkę uznaje się za PD-L1 - dodatnią, jeżeli w preparacie obserwuje się  $\geq 1\%$  IC. Jeżeli komórki IC barwione PD-L1 o każdej intensywności zajmują  $\geq 1\%$  obszaru guza, przypadkowi zostanie przypisany poziom ekspresji  $\geq 1\%$  IC (tabela 1). Komórki odpornościowe naciekające guz to komórki odpornościowe występujące w zrębie wewnątrzguzowym i okołoguzowym.

## Schemat 2.

Ekspresja PD-L1  $\geq 1\%$  komórek odpornościowych (IC).



## Tabela 1.

Algorytm interpretacji wyników testu VENTANA PD-L1 (SP142) u pacjentów z potrójnie ujemnym rakiem piersi.

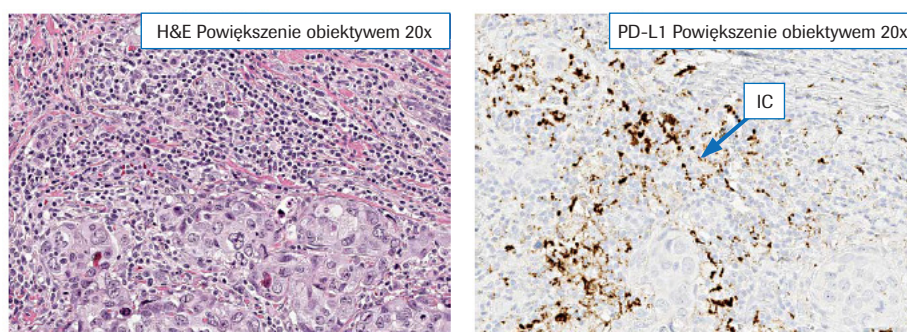
| Kryteria                                                                                                                                                                                                                                                 | Ekspresja PD-L1       | Status PD-L1 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|--------------|
| Brak dostrzegalnego barwienia PD-L1 lub dostrzegalne barwienie PD-L1 o dowolnej intensywności w komórkach odpornościowych naciekających guz pokrywające $< 1\%$ powierzchni guza zajmowanej przez komórki nowotworowe, zrąb wewnątrzguzowy i okologuzowy | $< 1\% \text{ IC}$    | Ujemny       |
| Dostrzegalne barwienie PD-L1 o dowolnej intensywności w komórkach odpornościowych naciekających guz pokrywające $\geq 1\%$ powierzchni guza zajmowanej przez komórki nowotworowe, zrąb wewnątrzguzowy i okologuzowy.                                     | $\geq 1\% \text{ IC}$ | Dodatni      |

Fakt, że przy określeniu statusu PD-L1 oceniamy różne typy komórek, wpływa istotnie na obraz mikroskopowy wybarwianych komórek. W rzadkich przypadkach może się wybarwiać punktowo błona komórek IC oraz ziarnistość neutrofilów w sposób rozproszony. W interpretacji wyników należy uwzględnić wyłącznie

neutrofile występujące w zrębie. Nie należy brać pod uwagę barwienia neutrofilów występujących we krwi i surowicy lub w naczyniach krwionośnych, a także pozostałości neutrofilowych i nekrotycznych, które mogą wykazywać barwienie PD-L1.

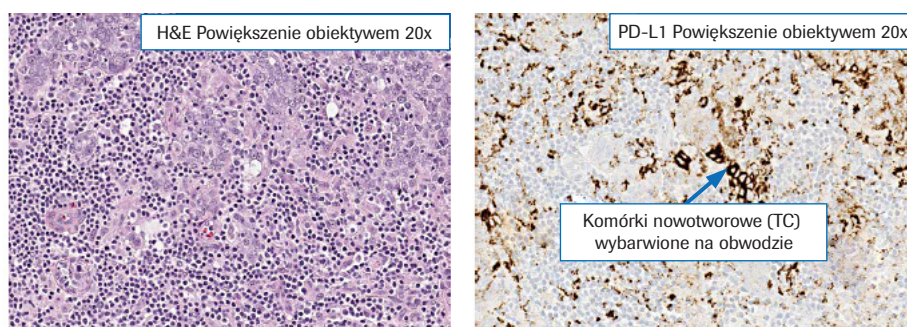
## Schemat 3.

Tkanka TNBC z punktowym i liniowym wybarwieniem komórek odpornościowych (IC) na kolor ciemnobrązowy.



## Schemat 4.

Tkanka TNBC z umiarkowanym lub mocno wybarwionym obwodem komórek nowotworowych (TC).



W części przypadków dochodzi do barwienia komórek TC u pacjentów z potrójnie ujemnym rakiem piersi. Wraz z barwieniem komórek TC mogą wybarwiać się też komórki IC. Jednak jeżeli do tego dojdzie, interpretacja może być utrudniona. Jeżeli dojdzie do barwienia komórek TC, to aby je odróżnić od komórek IC należy przeprowadzić barwienie hematoksyliną i eozyną w celu oceny występowania i liczby komórek IC. Konieczna jest ocena preparatów barwionych PD-L1 przy użyciu dużego powiększenia służącego do różnicowania tych typów komórek.

Komórki immunologiczne, które ulegają wybarwieniu, mogą występować w grupach, jak też leżeć w rozproszeniu. W części przypadków możemy spotkać oba wymienione schematy wybarwienia (zgrupowane i rozproszone) w jednym materiale. W stosunku do oceny wybarwienia innych czynników predykcyjnych problemem może być duże zróżnicowanie wielkości wybarwionych PD-L1 struktur. W obrębie neutrofilii punktowe obszary wybarwienia mogą być widoczne dopiero przy dużym powiększeniu, a także prezentować kształty nietypowe dla komórek. Z drugiej strony wybarwione makrofagi są na tyle duże, że wymagają różnicowania z komórkami raka.

### Tkanka kontrolna

Poza preparatem z kontrolą ujemną w tkance guza stosowany jest także preparat zawierający tkankę kontrolną (odczynowy migdałek ludzki). Tkanki kontrolne są stosowane wyłącznie w celu monitorowania prawidłowej jakości badanych tkanek oraz odczynników i aparatury stosowanych w teście, a nie jako materiał pomocniczy w celu ustalania wyniku dla materiałów pobranych od pacjentów. Zaleca się stosowanie jednej tkanki kontrolnej dla każdego zestawu podczas każdego barwienia.

Migdałek ludzki jest idealną tkanką kontrolną, ponieważ zawiera zarówno pozytywnie, jak i negatywnie zabarwione elementy i może służyć jako dodatnia i ujemna tkanka kontrolna przy barwieniu testem VENTANA PD-L1 (SP142). Podczas barwienia tkanki migdałka testem VENTANA PD-L1 (SP142) stwierdza się wybarwienie limfocytów i makrofagów w ośrodkach rozmnażania oraz rozproszone wybarwienie komórek IC w komórkach PD-L1-ujemnych w regionach międzyośrodkowych. Obserwuje się również rozproszone wybarwienie komórek nabłonka zachyłków, przy braku barwienia powierzchniowych komórek nabłonka płaskiego.

Dodatnie barwienie limfocytów i makrofagów w ośrodkach rozmnażania oraz rozproszone barwienie komórek nabłonka zachyłków i brak barwienia powierzchniowych komórek nabłonka płaskiego preparatu z tkanki odczynowego migdałka, potwierdza, że test VENTANA PD-L1 (SP142) i aparatura działają prawidłowo.

### Artefakty podczas barwienia

Artefakty mogą występować w przypadkach barwionych odczynnikami do kontroli ujemnej oraz testem VENTANA PD-L1 (SP142). W związku z ich występowaniem może być konieczne ponowne barwienie, jeżeli będą zakłócać interpretację wyników testu VENTANA PD-L1 (SP142). Należy zawsze ocenić odpowiadający preparat barwiony przy użyciu odczynnika do kontroli ujemnej, aby upewnić się, że nieswoiste barwienie tła nie jest zbyt intensywne.

### Podsumowanie

Tkanka potrójnie ujemnego raka piersi wybarwiona przy pomocy testu VENTANA PD-L1 (SP142) jest oceniana pod kątem wybarwienia komórek odpornościowych naciekających guz. Zalicza się do nich komórki układu immunologicznego występujące w zrębie wewnątrznowotworowym i okołonowotworowym (leżące w bezpośrednim kontakcie (do 1mm) wokół zachowanego utkania nowotworu), które obejmują limfocyty, makrofagi, komórki dendrytyczne oraz granulocyty. Komórki odpornościowe ocenia się jako odsetek powierzchni nowotworu zajmowany przez dodatnio wybarwione testem PD-L1 komórki odpornościowe o każdej intensywności.

Komórki odpornościowe często wykazują ciemnobrązowe punktowe lub liniowe wybarwienie, które jest dominującym wzorem barwienia komórek odpornościowych obserwowanym w większości tkanek. Sporadycznie obserwowane jest barwienie obwodu (błony komórkowej) komórek odpornościowych, w szczególności w komórkach, które wykazują cechy budowy morfologicznej makrofagów i komórek dendrytycznych. Wybarwieniu ulegają niekiedy również komórki raka. Wybarwienie ma wtedy najczęściej charakter błonowy (podobnie jak np. w makrofagach). Co jest istotne podkreślenia, reakcja barwna w komórkach nowotworu nie jest brana pod uwagę w ocenie PD-L1 przy pomocy testu VENTANA PD-L1 (SP142) w potrójnie ujemnych rakach piersi.

Prawidłowa zalecana ocena statusu PD-L1 wymaga oceny trzech preparatów zawierających ten sam materiał histologiczny pochodzący z raka piersi:

1. Preparatu barwionego hematoksyliną i eozyną do określenia obszaru zachowanego utkania raka. Na tym etapie określamy obecność raka naciekającego w obrębie guza. Barwienie HE pozwala łatwiej znaleźć obszary martwicy, włóknienia, utkania in situ, które są wyłączone z powierzchni guza, która podlega ocenie.
2. Preparatu kontrolnego – kontroli negatywnej – wybarwionego bez użycia przeciwciała PD-L1 (SP142). Do interpretacji tła w badanych próbkach i określenia wyjściowej intensywności barwienia stosuje się ujemne królicze przeciwciało monoklonalne, które jest kontrolą izotypową. Ocena takiego preparatu pozwala diagnoście wychwycić komórki lub obszary wykazujące brązowe lub zbliżone do brązowego koloru, które nie są wynikiem reakcji barwnej dla przeciwciała PD-L1 (SP142). Najczęściej będzie to hemosyderyna.
3. Właściwego preparatu wybarwionego przy użyciu PD-L1 (SP142). Rola oceniającego polega na znalezieniu wszystkich wybarwionych komórek w obszarze ustalonym przy pomocy preparatu wybarwionego HE, wyłączeniu tej części reakcji barwnych, które są nieswoiste (preparat kontrolny), a także wyłączeniu wybarwionych komórek raka naciekającego. Tak wyselekcjonowane komórki z reakcją barwną PD-L1 są oceniane pod kątem obszaru jaki zajmują w stosunku do zakwalifikowanej do oceny części guza. O ile odsetek tej powierzchni wynosi 1% lub więcej status PD-L1 w ocenianym raku jest dodany. Dla wartości poniżej 1% – ujemny.

# Rozporządzenie 2017/746/UE (IVDR) – zmiany w przepisach dotyczących wyrobów do diagnostyki *in vitro*

dr Marcin Hołysz, Katedra i Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

Parlament Europejski i Rada Unii Europejskiej w maju 2017 roku opublikowały dwa nowe rozporządzenia dotyczące wyrobów medycznych (2017/745/UE) (MDR) oraz wyrobów medycznych do diagnostyki *in vitro* (2017/746/UE) (IVDR). Rozporządzenie 2017/746/UE (IVDR) zastępuje obowiązującą do tej pory dyrektywę 98/79/WE w sprawie wyrobów medycznych używanych do diagnostyki *in vitro* (IVDD), którą przyjęto w 1998 r.

W porównaniu z dyrektywą IVDD, rozporządzenie IVDR jest aktem prawnym zawierającym znacznie więcej zapisów, o większym poziomie szczegółowości. Świadczyć o tym może fakt, iż tekst rozporządzenia IVDR jest przeszło czterokrotnie dłuższy niż tekst dyrektywy (odpowiednio 157 stron vs. 37 stron). Z założenia dyrektywa miała stanowić unijne ramy prawne, które umożliwiłyby harmonizację przepisów obowiązujących w poszczególnych krajach członkowskich, dotyczących wyrobów medycznych używanych do diagnostyki *in vitro* oraz określiłyby wymogi konieczne dla zapewnienia najwyższego poziomu bezpieczeństwa, ochrony zdrowia, działania, właściwości i procedur zatwierdzania tych wyrobów, a jednocześnie by nie utrudniały swobodnego przepływu towarów, osób, usług oraz kapitału w ramach Wspólnoty Europejskiej.

Należy podkreślić, iż zgodnie z założeniami do rozporządzenia IVDR (ust. 7) zakres stosowania tego rozporządzenia powinien być wyraźnie oddzielony od pozostałego prawodawstwa dotyczącego wyrobów medycznych. Rozporządzenie IVDR nie stosuje się do: produktów laboratoryjnych ogólnego zastosowania lub produktów przeznaczonych wyłącznie do badań, produktów do pobierania próbek lub produktów stosowanych bezpośrednio na ludzkim ciele w celu pobrania próbek, materiałów odniesienia posiadających międzynarodowe certyfikaty oraz materiałów używanych w systemach zewnętrznej oceny jakości (art. 1). Podjęcie decyzji, czy dany produkt jest objęty zakresem stosowania rozporządzenia IVDR każdorazowo pozostawia się w gestii poszczególnych państw członkowskich. W związku z powyższym, w celu zapewnienia spójności decyzji w tym względzie we wszystkich państwach członkowskich, szczególnie w odniesieniu do przypadków granicznych, Komisja UE, działając z własnej inicjatywy lub na wniosek państwa członkowskiego, po konsultacji z Grupą Koordynacyjną ds. Wyrobów Medycznych (MDCG), zastrzega sobie prawo do podejmowania własnych decyzji czy określony produkt, kategoria lub grupa produktów wchodzi w zakres stosowania rozporządzenia IVDR (ust. 8).

## Definicje

Dyrektywa IVDD zawiera 10 definicji (art. 1, definicje a-j), w rozporządzeniu IVDR liczba definicji zwiększyła się do 74 (art. 2, definicje 1-74).

Rozporządzenie IVDR w art. 2, ust. 2 rozszerza przede wszystkim definicję „wyrobu medycznego do diagnostyki *in vitro*” zawartą we wcześniejszej dyrektywie IVDD. Dodatkowe cele, które mają m.in. spełniać wyroby medyczne do diagnostyki *in vitro* to: informowanie o predyspozycjach do schorzenia lub choroby oraz

umożliwienie przewidywania odpowiedzi lub reakcji na leczenie (art. 2, ust.2, pkt c i e). Rozszerzeniu uległa również definicja „wyposażenia wyrobu medycznego do diagnostyki *in vitro*”. Identyfikacja nie jak w dyrektywie IVDD, „pojemniki na próbki” są uważane za wyroby medyczne do diagnostyki *in vitro*.

Rozporządzenie IVDR wprowadza nowe definicje wyrobów, a mianowicie: „wyrób do badań przyłóżkowych” (definicja nr 6) i „wyrób do diagnostyki w terapii celowanej” (definicja nr 7). Zgodnie z definicją „wyrób do badań przyłóżkowych” oznacza wyrób nieprzeznaczony do samokontroli, ale przeznaczony do przeprowadzania kontroli poza środowiskiem laboratoryjnym, zasadniczo w pobliżu pacjenta lub bezpośrednio przy nim przez pracownika służby zdrowia, natomiast „wyrób do diagnostyki w terapii celowanej” oznacza wyrób, który jest niezbędny dla bezpiecznego i skutecznego stosowania powiązanego z nim produktu leczniczego w celu identyfikacji (przed leczeniem lub w jego trakcie): pacjentów, którzy najprawdopodobniej odniosą korzyści z danego produktu leczniczego lub pacjentów, którzy mogą być w większym stopniu narażeni na poważne działania niepożądane w wyniku leczenia danym produktem leczniczym.

## Okres przejściowy

Wraz z publikacją rozporządzenia IVDR rozpoczął się pięcioletni okres przechodzenia od dyrektywy w sprawie wyrobów medycznych używanych do diagnostyki *in vitro* (98/79/WE) (IVDD) do nowego rozporządzenia. Rozporządzenie IVDR będzie obowiązywało od daty rozpoczęcia stosowania, czyli od 26 maja 2022 r., przy czym niektóre przepisy, dotyczące m.in. jednostek notyfikowanych i Grupy Koordynacyjnej ds. Wyrobów Medycznych, wejdą w życie wcześniej. Do daty rozpoczęcia stosowania rozporządzenia IVDR w dalszym ciągu będą miały zastosowanie przepisy ustawowe i wykonawcze przyjęte przez państwa członkowskie zgodnie z dyrektywą IVDD.

Na mocy art. 22 dyrektywy IVDD z 1998 r. państwa członkowskie zostały zobligowane do przygotowania i wprowadzenia krajowych przepisów ustawowych, wykonawczych i administracyjnych niezbędnych do wykonania tej dyrektywy, najpóźniej do 7 grudnia 1999 r. (IVDD). Przepisy dyrektywy miały być stosowane z mocą od dnia 7 czerwca 2000 r. Ponieważ w poszczególnych krajach zapisy dyrektywy mogły być interpretowane w różny sposób, możliwe było istnienie różnic w przepisach krajowych.

W przypadku rozporządzeń UE zawarte w nich przepisy nie muszą być przenoszone i dostosowywane do prawa krajowego. Rozpo-

rozporządzenie IVDR „wiąże w całości i jest bezpośrednio stosowane we wszystkich państwach członkowskich”. Ogranicza to ryzyko wystąpienia rozbieżności w interpretowaniu przepisów na rynku UE.

Dyrektywa IVDD zezwalała państwom członkowskim na wprowadzanie do obrotu wyrobów, które spełniały wymogi przepisów obowiązujących w dniu wejścia w życie dyrektywy, przez okres pięciu lat, z dodatkowymi dwoma latami kiedy wyroby te mogły być oddawane do użytku. Rozporządzenie IVDR podobnie wprowadza pięcioletni okres przejściowy między wejściem w życie a datą rozpoczęcia stosowania, czyli 26 maja 2022, z kilkoma odstępstwami określonymi w art. 113, ust. 3.

W art. 110 IVDR, zebrano przepisy przejściowe, które mają za zadanie zapewnić płynne przejście od dyrektywy do rozporządzenia IVDR. Warto podkreślić, iż certyfikaty wydane na mocy dyrektywy IVDD (przed 25 maja 2017 r.) pozostają ważne do końca okresu wskazanego w certyfikacie, jednak nie dłużej niż do 27 maja 2024 r. Najpóźniej w dniu 27 maja 2024 r. tracą także ważność certyfikaty wydane przez jednostki notyfikowane (zgodnie z dyrektywą IVDD) po dniu 25 maja 2017 r. Wyroby medyczne wprowadzone do obrotu na podstawie dyrektywy IVDD przed dniem 26 maja 2022 r. będą mogły być w dalszym ciągu udostępniane na rynku lub wprowadzane do używania do dnia 27 maja 2025 r. Wynika z tego, iż w okresie przejściowym na rynku będą dostępne zarówno wyroby posiadające „stare” jak i „nowe” certyfikaty, na równorzędnych zasadach. Warto podkreślić, iż producenci mogą wprowadzać swoje produkty do obrotu na podstawie przepisów zawartych w rozporządzeniu IVDR jeszcze przed datą rozpoczęcia stosowania, pod warunkiem, że produkty te spełniają wymagania określone w rozporządzeniu IVDR.

Nowe rozporządzenie IVDR pozostawia w mocy wszystkie wymagania stawiane wyrobom medycznym do diagnostyki *in vitro* w dyrektywie IVDD, dodatkowo wprowadza szereg nowych wymogów.

### Jednostki notyfikowane

Dyrektywa IVDD, w art. 15 wprowadza instytucję jednostek notyfikowanych, czyli organów których zadaniem jest ocena zgodności wyrobu medycznego z obowiązującymi normami i wymaganiami stawianymi tym wyrobom. Zgodnie z dyrektywą państwa członkowskie powołują własne jednostki notyfikowane i zgłaszają je do Komisji UE, która przypisuje im numery identyfikacyjne i prowadzi wykaz tych jednostek. Kryteria, jakimi powinny kierować się państwa członkowskie przy wyznaczaniu jednostek notyfikowanych zostały określone w siedmiu punktach załącznika IX dyrektywy IVDD.

Rozporządzenie IVDR znacznie rozszerza zakres przepisów regulujących sprawy związane z wyznaczaniem, funkcjonowaniem i kontrolą działania jednostek notyfikowanych. Jednostkom notyfikowanym poświęcony jest Rozdział IV rozporządzenia IVDR. Na mocy art. 31 rozporządzenia każde z państw członkowskich powołuje „organ odpowiedzialny za jednostki notyfikowane”, który odpowiada za ustanawianie i przeprowadzanie procedur koniecznych do oceny i wyznaczania jednostek notyfikowanych oraz ich monitorowania, wraz z ich podwykonawcami i jednostkami zależnymi. Zapisy artykułów od 32 do 46 w Rozdziale IV rozporządzenia IVDR niezwykle precyzyjnie określają wymagania stawiane jednostkom notyfikowanym, ich podwykonawcom i jednostkom zależnym oraz

regulują wszelkie sprawy związane z ich wyznaczaniem, identyfikacją, funkcjonowaniem, nadzorem i koordynowaniem współpracy między jednostkami notyfikowanymi. Jednostki notyfikowane muszą także przestrzegać wymagań określonych w załączniku VII „Wymogi, jakie muszą spełniać jednostki notyfikowane”, w szczególności wymogów dotyczących statusu prawnego i struktury organizacyjnej, systemu zarządzania jakością i jego audytu, posiadanych zasobów (m.in. wiedzy i kwalifikacji personelu, sprzętu, pomieszczeń i kompetencji) oraz posiadanych procedur stosowanych w procesie weryfikacji produktu, analizy oceny działania, wydawania decyzji i certyfikowania i późniejszej kontroli wyrobu a także odnawiania certyfikatów.

Wykaz jednostek notyfikowanych będzie dostępny w bazie danych (NANDO), dostępnej na stronie Komisji Europejskiej <https://ec.europa.eu/growth/tools-databases/nando/>. Zapisy art. 31–46 i art. 96 stosuje się od dnia 26 listopada 2017 r. Z uwagi na długi czas wyznaczania jednostek notyfikowanych, który może trwać 12 miesięcy lub dłużej od złożenia wniosku przez jednostkę notyfikowaną, aktualna baza NANDO jest jeszcze w fazie przygotowywania.

### Klasyfikacja wyrobów

Najbardziej istotną zmianą w przepisach wprowadzanych w rozporządzeniu IVDR w porównaniu z dyrektywą IVDD są reguły klasyfikacji wyrobów do diagnostyki *in vitro*, w tym ich wyposażenia, oprogramowania sterującego wyrobem, kalibratorów czy materiałów kontrolnych, w oparciu o przeznaczenie wyrobu i ocenę ryzyka związanego z wykorzystywaniem tych wyrobów w diagnostyce *in vitro*.

W dotychczas obowiązującej dyrektywie IVDD, wyroby medyczne o szczególnym znaczeniu diagnostycznym klasyfikowano zgodnie z wykazem zawartym w Załączniku II („Wykaz wyrobów określonych w art. 9 ust. 2 i 3”). Wyroby wymienione w tym załączniku podzielono na dwa wykazy. Wykaz A zawiera wyroby służące do określania grup krwi oraz wykrywania, potwierdzania i kwantyfikacji markerów zakażenia wirusami: HIV, HTLV oraz zapalenia wątroby typu B, C i D. W wykazie B znalazły się wyroby do: oznaczania antygenów Duffy, Kidd i przeciwciał antyerytrocytarnych, wykrywania i kwantyfikacji infekcji: różyczki, toksoplazmozy, cytomegalii, chlamydii, diagnozowania fenylketonurii, wykrywania grup tkanek HLA i markera nowotworowego PSA, a także wyroby służące do oceny ryzyka trisomii chromosomu 21 (zespołu Downa) oraz mierzenia zawartości cukru we krwi. W odniesieniu do wszystkich wyrobów, których nie wymieniono w załączniku II producent poza odpowiednim oznakowaniem CE zobowiązany jest do sporządzenia deklaracji zgodności WE, zgodnie z procedurą określoną w Załączniku III IVDD. W przypadku wyrobów umieszczonych w wykazie A lub B producent zobowiązany jest do postępowania zgodnie z procedurami wymienionymi w załącznikach IV, V, VI i VII, w celu zapewnienia wyższego poziomu bezpieczeństwa tych wyrobów.

Rozporządzenie IVDR wprowadza zupełnie nowe zasady klasyfikowania wyrobów do diagnostyki *in vitro* określone w Rozdziale V, Sekcji 1, art. 47 „Klasyfikacja wyrobów”. Wskazany w art. 47 rozporządzenia Załącznik VIII, zamiast wykazu produktów, zawiera siedem reguł jakimi należy kierować się w klasyfikacji wyrobów do jednej z czterech klas:

- a. niskie ryzyko indywidualne oraz niskie ryzyko dla zdrowia publicznego
- b. umiarkowane ryzyko indywidualne lub niskie ryzyko dla zdrowia publicznego
- c. wysokie ryzyko indywidualne lub umiarkowane ryzyko dla zdrowia publicznego
- d. wysokie ryzyko indywidualne i wysokie ryzyko dla zdrowia publicznego

Wszelkie spory zaistniałe między producentem a daną jednostką notyfikowaną, wynikające ze stosowania załącznika VIII, mają być rozstrzygane przez właściwy organ w państwie członkowskim, w którym producent ma zarejestrowane miejsce prowadzenia działalności (art. 47, ust.2). Organ wydający decyzję jest zobowiązany do powiadomienia o swojej decyzji Grupę Koordynacyjną ds. Wyrobów Medycznych (MDCG) oraz Komisję UE.

Konsekwencją przyporządkowania wyrobu do jednej z czterech klas jest konieczność przeprowadzenia procedury oceny zgodności wyrobu według zasad określonych w załącznikach IX, X i XI. Zakres przeprowadzanej przez producenta procedury zgodności dla poszczególnych klas wyrobów, udział jednostek notyfikowanych w tych procedurach, mechanizmy kontroli oceny zgodności oraz certyfikacji zgodności precyzyjnie określają zapisy art. 48-55 zawarte w Sekcji 2 Rozdziału V.

W klasie A, wyrobów najmniejszego ryzyka, znalazły się: produkty laboratoryjne ogólnego zastosowania, wyposażenie nie mające krytycznego wpływu na proces diagnostyczny, roztwory buforowe, roztwory myjące, pożywki i barwniki histologiczne, pojemniki na próbki i przyrządy przeznaczone specjalnie do diagnostyki *in vitro*.

Do klasy D, najwyższego ryzyka, zaklasyfikowano wyroby służące do wykrywania we krwi, w komórkach i w tkankach (i ich pochodnych) przeznaczonych do przeszczepienia, transfuzji lub podania - wykrywania obecności czynników pasażowalnych o wysokim ryzyku rozprzestrzeniania się, wywołujących choroby zagrażające życiu, a także oznaczania stężenia czynnika zakaźnego wywołującego chorobę zagrażającą życiu, w przypadku gdy monitorowanie ma podstawowe znaczenie w procesie opieki nad pacjentem.

### Laboratorium referencyjne

Z uwagi na najwyższy poziom ryzyka, w przypadku oceny zgodności wyrobów klasy D wymagany jest nie tylko udział odpowiedniej jednostki notyfikowanej ale także laboratorium referencyjnego UE. Zadaniem laboratorium referencyjnego UE jest między innymi weryfikacja działania wyrobu deklarowana przez producenta oraz ocena zgodności wyrobu z mającymi zastosowanie wspólnymi specyfikacjami (art. 48 ust. 5). Innowacyjne wyroby klasy D, dla których nie ustalono jeszcze wspólnej specyfikacji, ocenia niezależny panel ekspertów, który musi przedstawić swoją opinię na temat sprawozdania z oceny działania sporządzonego przez producenta (art. 48 ust. 6). Jeżeli wyrób jest przeznaczony do diagnostyki w terapii celowanej, przed wydaniem certyfikatu oceny dokumentacji technicznej UE, jednostki notyfikowane są zobligowane do zwrócenia się o opinię naukową do jednego z właściwych organów ds. produktów leczniczych wyznaczonych przez państwa

członkowskie lub do Europejskiej Agencji Leków (EMA) (art. 48).

Komisja Europejska może wyznaczyć, na wniosek państw członkowskich lub Wspólnego Centrum Badawczego Komisji, w drodze aktów wykonawczych, jedno laboratorium referencyjne UE lub większą ich liczbę. Kryteria jakie muszą spełniać laboratoria referencyjne UE, zadania stawiane tym laboratoriom oraz zasady ich funkcjonowania i sprawowania nad nimi kontroli zostały zawarte w art. 100 rozporządzenia IVDR.

### Dowody kliniczne, ocena działania i badanie działania

Rozporządzenie IVDR bardzo rygorystycznie podchodzi do dowodów klinicznych, niezbędnych do wykazania zgodności wyrobu z odpowiednimi ogólnymi wymogami dotyczącymi bezpieczeństwa i działania. Potwierdzenia zgodności dokonuje się na podstawie znaczenia naukowego oraz danych dotyczących skuteczności analitycznej i klinicznej (art. 56). Dowody kliniczne mają naukowo wykazywać, odnosząc się do aktualnego stanu wiedzy medycznej, że zostaną osiągnięte przewidziane korzyści kliniczne i że wyrób jest bezpieczny. Oczywiście poziom dowodów klinicznych musi być stosowny ze względu na właściwości wyrobu i jego przewidziane zastosowanie. Szczegółowe wytyczne w jaki sposób prowadzić ocenę działania i badania skuteczności działania znajdziemy w załączniku XIII w części A.

Rozporządzenie IVDR wprowadza wymóg prowadzenia obserwacji działania wyrobu także po jego wprowadzeniu do obrotu. Producent ma obowiązek gromadzić i oceniać dane dotyczące działania wyrobu oraz dane naukowe uzyskane w trakcie użytkowania wyrobu. Celem tych działań ma być zapewnienie odpowiedniego poziomu bezpieczeństwa zarówno w momencie wprowadzania wyrobu do obrotu, jak i w oczekiwanym okresie używania wyrobu. Przepisy dotyczące obserwacji działania po wprowadzeniu do obrotu, w tym sposobu ich prowadzenia, znajdują się w załączniku XIII w części B.

### Baza danych o wyrobach medycznych – EUDAMED. System kodów – UDI.

W celu ułatwienia funkcjonowania europejskiej bazy danych o wyrobach medycznych (EUDAMED) i zwiększenia przejrzystości informacji o wyrobach do diagnostyki *in vitro*, właściwa nomenklatura wyrobów medycznych (uznana międzynarodowo) ma być dostępna bezpłatnie dla producentów oraz innych osób fizycznych, które są zobowiązane na podstawie rozporządzenia IVDR do posługiwania się tą nomenklaturą (art. 23). Na mocy art. 24 rozporządzenia IVDR wprowadza system niepowtarzalnych kodów identyfikacyjnych wyrobów (UDI), opisany w załączniku VI część C. System UDI umożliwia identyfikację i ułatwia identyfikowalność wyrobów (innych niż wyroby do badania działania). Komisja UE wyznacza podmioty, które będą prowadziły system nadawania kodów UDI. Podmioty te muszą oczywiście spełniać określone kryteria. Komisja, po konsultacji z Grupą Koordynacyjną ds. Wyrobów Medycznych (MDCG) ustanawia bazę danych kodów UDI i nią zarządza (art. 25). Rozporządzenie IVDR określa dokładnie procedurę rejestracji wyrobów przez producenta oraz tryb nadawania wyrobom kodu UDI. Producent jest także zobowiązany do umieszczenia odpowiednich informacji o wyrobie w bazie EUDAMED przed wprowadzeniem tego wyrobu do obrotu (art. 26).

Rejestracji podlegają także sami producenci, upoważnieni przedstawiciele i importerzy. W tym celu Komisja po konsultacji z MDCG wprowadza system elektroniczny, który będzie generował niepowtarzalny numer rejestracyjny, o którym mowa w art. 28 ust. 2, i umożliwi gromadzenie i przetwarzanie informacji, które są konieczne i proporcjonalne do identyfikacji producenta, a także upoważnionego przedstawiciela i importera (art. 27). W odniesieniu do dystrybutorów wyrobów, poszczególne państwa członkowskie mogą utrzymywać lub wprowadzać krajowe przepisy dotyczące rejestracji dystrybutorów, którzy wprowadzają do obrotu wyroby na ich terytorium (art. 27).

### Obowiązki producentów

Rozporządzenie IVDR precyzyjnie określa nie tylko obowiązki producentów wyrobów medycznych do diagnostyki *in vitro* (art. 10), a także obowiązki upoważnionych przedstawicieli (art. 11), importerów (art. 13) oraz dystrybutorów (art. 14).

Zgodnie z zapisami art. 10 „Ogólne obowiązki producentów” producenci muszą między innymi: zapewnić zgodność ich wyrobów z wymogami rozporządzenia IVDR (ust. 1), posiadać systemy zarządzania ryzykiem (ust. 2), prowadzić ocenę działania (ust. 3), sporządzać i na bieżąco aktualizować dokumentację techniczną (ust. 4), sporządzić deklarację zgodności UE i odpowiednio oznakować produkt znakiem CE (ust. 5), zarejestrować produkt w systemie UDI (ust. 6), przechowywać całą dokumentację przez okres minimum 10 lat (ust. 7) i posiadać system zarządzania jakością (ust. 8). Producenci ponoszą także odpowiedzialność za swoje wyroby po ich wprowadzeniu do obrotu. W szczególności, producenci zobowiązani są do: wdrożenia systemu nadzoru nad pro-

duktem (ust. 9), zapewnienia, by wyrobowi towarzyszyły niezbędne informacje (ust. 10), podjęcia niezbędnych działań korygujących w celu zapewnienia zgodności wyrobu, wycofania go z obrotu lub wycofania z używania (ust. 11), posiadania systemu rejestrowania i zgłaszania incydentów (ust. 12) współpracy z właściwymi organami państwa (ust. 13) oraz muszą posiadać środki mające zapewnić wystarczające zabezpieczenie finansowe na wypadek ich ewentualnej odpowiedzialności, proporcjonalnie do klasy ryzyka, rodzaju wyrobu i wielkości przedsiębiorstwa (ust. 15). Każdy producent musi dysponować co najmniej jedną osobą odpowiedzialną za zgodność regulacyjną, dysponującą wymaganą wiedzą fachową i kwalifikacjami w dziedzinie wyrobów medycznych do diagnostyki *in vitro*. (art. 15).

W rozporządzeniu IVDR opisano również dokładnie obowiązki upoważnionych przedstawicieli (art. 11), importerów (art. 13) oraz dystrybutorów (art. 14).

Z uwagi na fakt, iż jesteśmy obecnie w okresie przejściowym producenci mogą sami zdecydować, kiedy przejść na wymagania rozporządzenia IVDR. Ponieważ nie wszystkie elementy rozporządzenia niezbędne do uzyskania certyfikatów IVDR są na obecną chwilę w pełni operatywne, w przypadku niektórych wyrobów (np. należących do klasy D) producenci będą musieli poczekać na powołanie odpowiednich paneli ekspertów oraz wyznaczenie jednostek notyfikowanych i laboratoriów referencyjnych. Należy mieć na uwadze, że od 26 maja 2022 r. wszystkie nowe certyfikaty będzie trzeba dostarczać zgodnie z rozporządzeniem IVDR, natomiast certyfikaty wydane na podstawie dyrektywy IVDD mogą zachować ważność najpóźniej do 27 maja 2024 r.



# Elecsys® Anti-SARS-CoV-2

## Test immunologiczny do jakościowego oznaczania przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 (ang. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) jest otoczkowym wirusem, posiadającym pojedynczą nić RNA, który należy do rodziny Coronaviridae. Koronawirusy charakteryzują się podobną budową i posiadają 16 białek niestrukturalnych oraz 4 białka strukturalne: białko fuzyjne S (ang. spike), białko płaszcza E (ang. envelope), białko błonowe M (ang. membrane) oraz białko nukleokapsydu N (ang. nucleocapsid). Wirusy te wywołują choroby o różnym nasileniu, od łagodnych np. przeziębienie, do cięższych, np. COVID-19 wywołany przez SARS-CoV-2.

SARS-CoV-2 jest przenoszony z osoby na osobę przede wszystkim drogą kropelkową z dróg oddechowych, ale możliwe jest także przeniesienie pośrednie za pośrednictwem zanieczyszczonych powierzchni. Wnika on do komórek gospodarza, wykorzystując enzym konwertazę angiotensyny 2 (ACE2), który w największej ilości znajduje się w płucach.

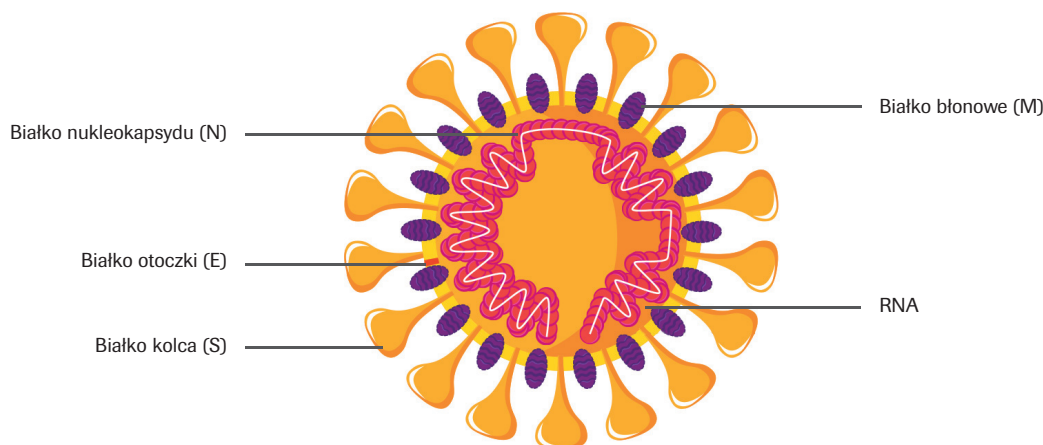
Okres inkubacji COVID-19 wynosi od 2 do 14 dni po ekspozycji, a objawy u większości pacjentów pojawiają się około 4-5 dni po ekspozycji. Spektrum objawów zakażenia jest szerokie, od łagodnych (gorączka, kaszel, zmęczenie, utrata powonienia, duszności), nawet po krytyczne prowadzące do śmierci. Choć u większości pacjentów z objawami przebieg choroby nie jest ciężki, to u osób w podeszłym wieku lub z chorobami współistniejącymi może przybrać ciężką postać i prowadzić do hospitalizacji na oddziale inten-

sywnej terapii. Głównym powikłaniem u pacjentów z chorobą ciężką jest zespół ostrej niewydolności oddechowej (ARDS). Z kolei u pacjentów w stanie krytycznym dochodzi m. in. do niewydolności oddechowej, wstrząsu i (lub) niewydolności wielonarządowej.

Ostateczne rozpoznanie COVID-19 wymaga bezpośredniego wykrycia obecności SARS-CoV-2 za pomocą technologii amplifikacji kwasu nukleinowego (NAAT). Testy serologiczne mogą przyczynić się do identyfikacji osób narażonych na ekspozycję na wirusa i pomóc w ocenie stopnia narażenia populacji, a tym samym mogą być przydatne podczas podejmowania decyzji dotyczących zastosowania, egzekwowania lub złagodzenia środków bezpieczeństwa.

### Schemat 1.

Budowa SARS-CoV-2.



W zależności od zastosowanej metody, serokonwersję obserwuje się średnio w okresie 10-13 dni dla IgM i 12-14 dni dla IgG po wystąpieniu objawów. Zgodnie z obecną wiedzą maksymalna serokonwersja zachodzi po 2-3 tygodniach w przypadku IgM, 3-6 tygodniach w przypadku IgG oraz po 2 tygodniach w przypadku przeciwciał całkowitych. Przypuszcza się że przeciwciała IgM zanikają około 6-7 tygodnia, w tym czasie obserwuje się wysoką seropozytywność IgG. Stężenia i kolejność pojawiania się przeciwciał IgM i IgG są bardzo zmienne, co potwierdza możliwość ich wykrywania w tym samym czasie. Przeciwciała neutralizujące skierowane przeciwko białkom fuzyjnym i nukleokapsydu powstają już w 9

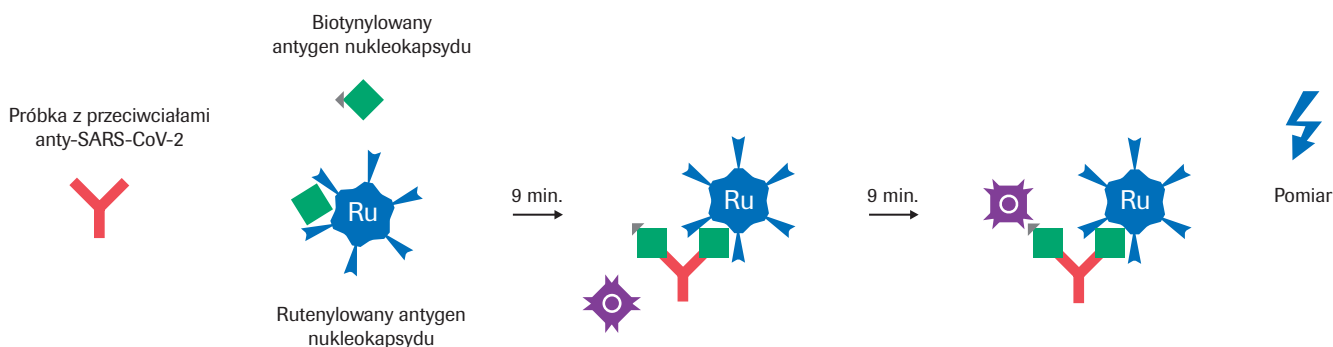
dniu, warunkując silną neutralizującą odpowiedź immunologiczną, tym samym serokonwersja może zapewniać ochronę przynajmniej przez ograniczony czas.

Test Elecsys® Anti-SARS-CoV-2 to test immunologiczny do jakościowego wykrywania in vitro przeciwciał (w tym IgG) przeciwko SARS-CoV-2 w ludzkiej surowicy i osoczu. Do ich oznaczania w teście wykorzystuje się rekombinowane białko reprezentujące antygen nukleokapsydu (N). Zadaniem testu jest pomoc w określeniu reakcji immunologicznej na SARS-CoV-2.

## Schemat 2.

Test immunologiczny  
oparty na metodzie  
elektrochemiluminescencji  
(ECLIA)

Zasada testu: jednostopniowy test kanapkowy  
z dwoma antygenami (DAGS, ang. double antigen  
sandwich format) czas oznaczenia: 18 minut



### 9 minut

20 µl\*/12 µl\*\* próbki pacjenta inkubuje się z mieszaniną biotynylowanych i rutenylowanych antygenów nukleokapsydu (N). W obecności odpowiednich przeciwciał powstają kompleksy z których każdy składa się z przeciwciała i dwóch antygenów (kompleksy DAGS).

\* analizatory **cobas e 411** i **cobas e 601/602**  
\*\* analizator **cobas e 801**

### 9 minut

Po dodaniu mikrocząstek opłaszczonych streptawidyną kompleks DAGS wiąże się z fazą stałą dzięki powinowactwu biotyny i streptawidyny.

### Pomiar

Mieszanina reakcyjna przenoszona jest do komory pomiarowej, gdzie mikrocząstki przyciągane są do powierzchni elektrody. Niezwiązane cząsteczki są usuwane. Przyłożone napięcie indukuje reakcję elektrochemiluminescencji, która jest mierzona za pomocą fotopowielacza. Wielkość sygnału zależy od miana przeciwciał.

Tabela 1.

Charakterystyka testu  
Elecsys®  
Anti-SARS-CoV-2.

| Systemy              | Analizatory <b>cobas e 411</b><br><b>cobas e 601 / cobas e 602</b>                                                         | Analizator <b>cobas e 801</b> |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Czas trwania testu   | 18 minut                                                                                                                   |                               |
| Kalibracja           | Dwupunktowa                                                                                                                |                               |
| Interpretacja wyniku | COI* < 1,0 = próbka niereaktywna<br>COI ≥ 1,0 = próbka reaktywna                                                           |                               |
| Badany materiał      | Surowica pobrana przy użyciu standardowych próbek.<br>Osocze z heparyną litową, K <sub>2</sub> EDTA i K <sub>3</sub> EDTA. |                               |
| Objętość próbki      | 20 µl                                                                                                                      | 12 µl                         |

\* wskaźnik odcięcia cutoff

## Czułość kliniczna

Za pomocą testu Elecsys® Anti-SARS-CoV-2 zbadano ogółem 204 próbki pochodzące od 69 pacjentów z objawowym zakażeniem SARS-CoV-2 potwierdzonym badaniem PCR. Od tych pacjentów pobrano kolejno jedną lub więcej próbek w różnych odstępach czasu po uzyskaniu potwierdzenia rozpoznania metodą PCR.



Tabela 2.

Czułość kliniczna.

| Dni po potwierdzeniu zakażenia met. PCR | N   | Czułość (95% CI)*    |
|-----------------------------------------|-----|----------------------|
| 0 - 6 dni                               | 116 | 65,5% (56,1 - 74,1%) |
| 7 - 13 dni                              | 59  | 88,1% (77,1 - 95,1%) |
| 88,1% (77,1 - 95,1%)                    | 29  | 100% (88,1 - 100%)   |

\* przedział ufności

### Swoistość kliniczna

Za pomocą testu Elecsys® Anti-SARS-CoV-2 zbadano ogółem 5 272 próbek uzyskanych przed grudniem 2019 r. (w ramach badań rutynowych, od dawców krwi, panel próbek od pacjentów z przeziębieniem i panel próbek od pacjentów zakażonych innymi koronawirusami).\*



Tabela 3.

Swoistość kliniczna.

| Kohorta                        | N            | Reaktywne | Swoistość % (95% CI)         |
|--------------------------------|--------------|-----------|------------------------------|
| Badania rutynowe               | 3 420        | 7         | 99,80% (99,58-99,92%)        |
| Dawcy krwi                     | 1 772        | 3         | 99,83% (99,51-99,97%)        |
| Panel od osób z przeziębieniem | 40           | 0         | 100% (91,19-100%)            |
| Panel koronawirusa*            | 40           | 0         | 100% (91,19-100%)            |
| <b>Łącznie</b>                 | <b>5 272</b> | <b>10</b> | <b>99,81% (99,65-99,91%)</b> |

\* 40 próbek potencjalnie reaktywnych krzyżowo, pochodzących od osób zakażonych w przeszłości koronawirusami HKU1, NL63, 229E lub OC43, potwierdzonych badaniem PCR

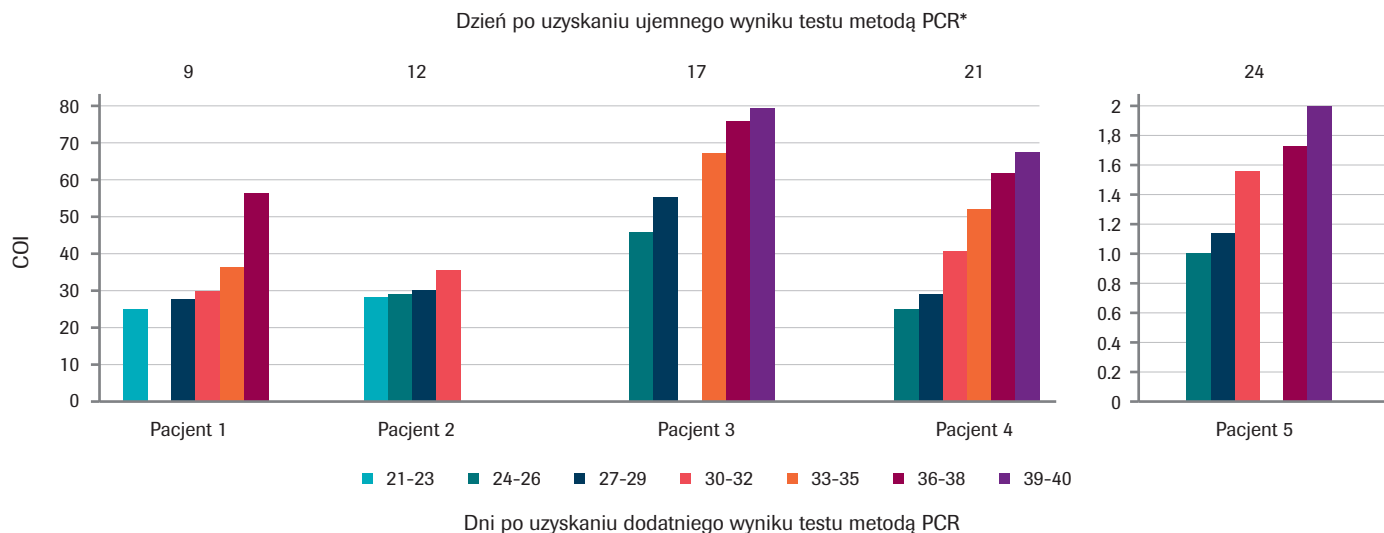


### Schemat 3.

Czułość serokonwersji.

#### Czułość serokonwersji

Po ustąpieniu zakażenia (potwierdzenie: ujemny wynik testu metodą PCR) 26 próbek kolejno pobranych od 5 osób przebadano za pomocą testu Elecsys® Anti-SARS-CoV-2.



\* Dzień 0 odzwierciedla początkowy, dodatni wynik testu metodą PCR.

### Schemat 4.

Schemat ilustrujący pojawianie się markerów w przebiegu zakażenia SARS-CoV-2.

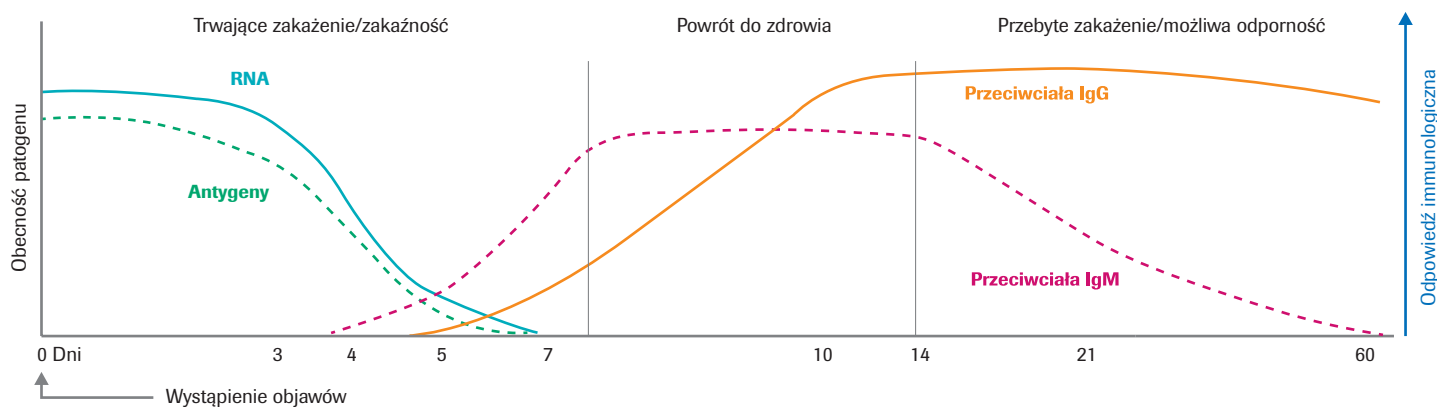


Tabela 4.

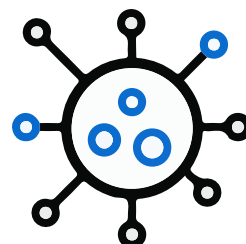
Informacje logistyczne.

| Nazwa produktu                | Opis produktu               | Zawartość opakowania | Numer katalogowy |
|-------------------------------|-----------------------------|----------------------|------------------|
| Elecsys® Anti-SARS-CoV2*      | Anti-SARS-CoV2 Elecsys      | 200 testów           | 09 203 095 190   |
| Elecsys® Anti-SARS-CoV2**     | Anti-SARS-CoV-2 Elecsys E2G | 300 testów           | 09 203 079 190   |
| Preci Control Anti-SARS-CoV-2 | Kontrola                    | 2 x 2 x 1 ml         | 09 216 928 190   |

\* cobas e 411, cobas e 601, cobas e 602

\*\* cobas e 801

#### Elecsys® Anti-SARS-CoV-2 test



# Badanie przeciwciał: Kolejny krok w walce z COVID-19

Laura Parnas, starszy kierownik ds. Naukowych w Roche Diagnostics, odpowiada na pytania dotyczące testu Elecsys Anti-SARS-CoV2. Test serologiczny jest najnowszym narzędziem firmy Roche, które wspomaga diagnostykę COVID-19.

## Jaki jest cel oznaczania przeciwciał anty-SARS-CoV-2?

Dr Laura Parnas (LP): Wykrywanie przeciwciał pomaga ustalić, czy w badanej populacji ktoś był narażony na kontakt z wirusem w następstwie którego organizm uruchomił odpowiedź immunologiczną.

## Czy po zakażeniu SARS-CoV-2 dochodzi do klasycznej odpowiedzi immunologicznej, w której przeciwciała IgM pojawiają się przed przeciwciałami IgG?

Dr LP: Wszyscy uczymy się tego nowego koronawirusa, który został po raz pierwszy zidentyfikowany pół roku temu. Nauka ewoluuje w kierunku zrozumienia przez nas odpowiedzi immunologicznej organizmu jaką ten wirus generuje.

Typowo rozwój przeciwciał po ekspozycji na czynnik zakaźny odbywa się przewidywalną ścieżką, w której najpierw pojawiają się IgM, a następnie IgG. Jednak w przypadku infekcji SARS-CoV-2 opublikowane do tej pory w literaturze dane wskazują, że w większości przypadków pojawianie się IgM i IgG pokrywa się. W niektórych raportach wykazano nawet, że IgG pojawiają się wcześniej niż IgM.

## Dlaczego Roche zdecydował się opracować test wykrywający dojrzałe przeciwciała IgM i IgG o wysokim powinowactwie?

Dr LP: Zaprojektowaliśmy test, który dostarcza następujące informacje kliniczne:

1. Dokładnie identyfikuje pacjentów, którzy byli narażeni na SARS-CoV-2
2. Wykryje pacjentów narażonych tylko na SARS-CoV-2 (a nie na inne koronawirusy)

Cele te możemy osiągnąć dzięki zaproponowanej konstrukcji testu i wykrywaniu dojrzałych przeciwciał IgM i IgG o wysokim powinowactwie.

## Format testu jaki stosuje Roche to jednostopniowy test kanapkowy z podwójnym wiązaniem antygeny. Czy potrafisz dokładnie wyjaśnić, jaka jest zasada stosowania testu?

Dr LP: Jest to jednoetapowy test immunologiczny, w którym dwa antygeny (jeden znakowany biotyną, drugi znakowany rutenem) znajdujące się w roztworze w kasecie odczynnika wiążą się - z dużym powinowactwem - z przeciwciałem w próbce badanej, tworząc silnie związany kompleks immunologiczny. Konstrukcja testu powoduje, że w reakcji biorą udział przeciwciała o wysokim powinowactwie, które wiążą te dwa antygeny. Do tak powstałych kompleksów dodana jest faza stała w postaci mikrocząstek opłaszczonych streptawidyną. Powinowactwo biotyny do streptawidyny powoduje powstanie silnie połączonych kompleksów kanapkowych, które następnie biorą udział w generowaniu sygnału elektrochemiluminescencyjnego.

## Jaka jest różnica między przeciwciałami o wysokim powinowactwie lub „dojrzałymi” a przeciwciałami o niskim powinowactwie?

Dr LP: W odpowiedzi na jakikolwiek kontakt z czynnikiem zakaźnym, organizm produkuje przeciwciała, które z czasem ewoluują. W odpowiedzi na pierwszy kontakt z wirusem generowane są przeciwciała o niskim powinowactwie do wirusa. Niskie powinowactwo oznacza, że te wczesne przeciwciała nie są w stanie skutecznie wiązać się z wirusem i go wyeliminować.

W miarę ewoluowania odpowiedzi immunologicznej wytwarzane są przeciwciała o wysokim powinowactwie (dojrzałe), które wiążą się z wirusem i neutralizują go. Te przeciwciała o wysokim powinowactwie pojawiają się później w trakcie infekcji i są to właśnie te przeciwciała, które próbujemy wykryć za pomocą naszego testu.

## Z tego co dotychczas wiemy o COVID-19, przeciwciała IgG mogą pojawić się wcześniej niż podczas zakażeń innymi wirusami, w rzeczywistości istnieje więc szansa, że w próbkach będą zarówno IgG jak i IgM o niskim i wysokim powinowactwie, prawda?

Dr LP: Zgadza się. W naszym teście, te dwa antygeny zwiążą się z przeciwciałami o wysokim powinowactwie, a te przeciwciała o niskim powinowactwie zostaną wypłukane i nie będą brały udziału w generowaniu sygnału. Dzięki temu zredukowane jest ryzyko słabej reaktywności krzyżowej i uzyskania wyników fałszywie dodatnich.

## Czym różni się projekt testu Roche'a od metody testów pośrednich?

Dr LP: W testach pośrednich antygen związany jest z fazą stałą w sposób statyczny. Z antygenem wiążą się zarówno przeciwciała o wysokim powinowactwie oraz przeciwciała o niższym powinowactwie, stwarzając ryzyko reaktywności krzyżowej także z przeciwciałami skierowanymi do innych czynników zakaźnych. Taka reaktywność krzyżowa może prowadzić do uzyskania fałszywie dodatnich wyników, tzn. możemy otrzymać wynik dodatni u pacjenta, który nie miał nigdy kontaktu z nowym koronawirusem.

## Jakie białko docelowe zastosowano w teście Roche?

Dr LP: W naszym teście stosujemy białko nukleokapsydu. Na etapie opracowywania testu przeprowadziliśmy badania prototypów wykorzystując także inne antygeny. W połączeniu ze sprawdzonym formatem testu kanapkowego, antygeny nukleokapsydowe dały nam maksymalną pożądaną swoistość.

## Czy Roche pracuje nad testem neutralizacji przeciwciał?

Dr LP: Obecnie społeczność kliniczna pracuje nad lepszym zrozumieniem odpowiedzi immunologicznej na tego nowego wirusa. Próbowujemy zrozumieć, czy wytworzone do tej pory przeciwciała w rzeczywistości są przeciwciałami neutralizującymi. W miarę jak zrozumienie choroby będzie ewoluowało w nadchodzących tygodniach i miesiącach, będziemy podążać wszystkimi nowymi ścieżkami nauki. Będziemy informować na bieżąco o naszych wysiłkach związanych z dalszymi badaniami i rozwojem.

# Przeciwciała anty-SARS-CoV-2 w czasie infekcji, w fazie odporności i rekonwalescencji podczas przebiegu COVID-19 – doświadczenia własne.

Dr Brygida Beck<sup>1,2</sup>, Anna Żyła<sup>1</sup>, Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej, Mazowiecki Szpital Specjalistyczny Sp. z o.o.<sup>1</sup>, Radom, Medyczne Centrum Naukowo-Diagnostyczne BB-Med, Ruda Śląska<sup>2</sup>

W przypadku infekcji wirusami powodującymi zakażenia układu oddechowego (m.in. wirus grypy, RSV – respiratory syncytia virus) obraz choroby ma różny przebieg w zależności od stanu organizmu gospodarza, począwszy od objawów łagodnych poprzez ciężkie, łącznie z przypadkami śmiertelnymi. Tak jest też w przypadku koronawirusów.

SARS-CoV-2 – wirus z rodziny Coronaviridae z rodzaju Betacoronavirus, otoczony jest osłonką i posiada jednociowy RNA. Wszystkie koronawirusy wykazują podobieństwo organizacji i ekspresji ich genomu, który koduje 16 białek niestrukturalnych i 4 białka strukturalne: szczytowe (S), otoczki (E), błonowe (M) i nukleokapsydu (N). Wirusy tej rodziny są pochodzenia odzwierzęcego. Powodują choroby o objawach od łagodnego przeziębienia do poważniejszych, takich jak zespół ciężkiej i ostrej niewydolności oddechowej (SARS), bliskowschodni zespół niewydolności oddechowej (MERS) i COVID-19 (ang. Coronavirus Disease).

SARS-CoV-2 przenoszony jest między ludźmi głównie drogą kropelkową, ale możliwe jest także przenoszenie pośrednie poprzez zanieczyszczone powierzchnie. SARS-CoV-2 można izolować z próbek z górnych dróg oddechowych, uzyskanych za pomocą wymazów z jamy nosowo-gardłowej, gardła lub z płwociny. Wirus uzyskuje dostęp do komórek gospodarza za pośrednictwem enzymu konwertującego angiotensynę 2 (ACE2), który najbardziej rozpowszechniony jest w płucach. Uważa się, że okres inkubacji wirusa wynosi od 2-14 dni po ekspozycji, przy czym większość pacjentów wykazuje objawy około 4-5 dni po ekspozycji. Okres czasu, w którym chory z COVID-19 zakaża, nie został jeszcze dokładnie ustalony.

Podstawową techniką rozpoznania zakażenia SARS-CoV-2, zgodnie z aktualnymi dowodami naukowymi, jest technika RT-PCR. Wykrywanie obecności materiału genetycznego wirusa jest możliwe tylko w aktywnej fazie choroby, gdy obecna jest replikacja w tkankach, z których materiał został pobrany. Zaletą testów molekularnych jest możliwość potwierdzenia zakażenia we wczesnej fazie, gdy jeszcze nie doszło do produkcji przeciwciał oraz możliwość wykluczenia aktywnej replikacji po przechorowaniu.

Podstawowym mechanizmem zwalczania infekcji SARS-CoV-2 przez układ odpornościowy jest wytwarzanie specyficznych przeciwciał rozpoznających wirusa. Podczas takiej infekcji organizm może wytwarzać przeciwciała rozpoznające wiele epitopów znajdujących się na różnych białkach wirusa. Badania przeciwciał anty-SARS-CoV-2 mogą przyczynić się do identyfikacji osób, które miały kontakt z wirusem i tym samym mogą być pomocne w ocenie stopnia narażenia populacji, ponadto mogą pomóc w podjęciu decyzji o zastosowaniu, egzekwowaniu lub złagodzeniu środków ograniczających rozprzestrzenianie się wirusa.

Skierowane przeciwko białkom szczytowym i białkom nukleokapsydu przeciwciała neutralizujące powstają już w 9 dniu infekcji, wykazując silną odpowiedź neutralizującą.

Serokonwersję w przypadku IgM zaobserwowano już w ciągu 5 dni od wystąpienia pierwszych objawów, a IgG w ciągu 5-7 dni. Na podstawie wciąż nielicznych danych wydaje się, że IgA anty-SARS-CoV-2 pojawiają się około 3-6 dni po wystąpieniu pierwszych objawów. W zależności od zastosowanej metody, serokonwersję można zaobserwować po czasie, którego mediana wynosi 10-13 dni od wystąpienia pierwszych objawów w przypadku IgM i 12-14 dni w przypadku IgG. Maksymalnie serokonwersja zachodzi w czasie 2-3 tygodni w przypadku IgM, 3-6 tygodni dla IgG i w czasie 2 tygodni dla wszystkich przeciwciał. Podczas gdy IgM wydają się zanikać w okolicy 6-7 tygodnia, w tym samym czasie obserwuje się wysoką seropozytywność IgG. Poziomy i chronologiczny kolejność pojawiania się przeciwciał IgM i IgG są wysoce zmienne, co daje podstawy i uzasadnia równoległe wykrywanie obu tych przeciwciał (testy "Total").

Dane z najnowszych publikacji wykazały, że czułość wykrywania przeciwciał "Total" była wyższa niż w przypadku oddzielnych oznaczeń dla IgM i IgG ( $p < 0,001$ ), podczas gdy swoistości były ogólnie porównywalne, gdy stosowano te same metody badań (ELISA, CLMA lub LFIA). Powinno się również podkreślić, że poziom przeciwciał nie jest bezpośrednio skorelowany z ciężkością zakażenia.

Należy pamiętać, że ujemny wynik testu anty-SARS-CoV-2 nie wyklucza całkowicie możliwości zakażenia wirusem. Próbkę surowicy z bardzo wczesnej fazy choroby (przed serokonwersją) mogą dawać wyniki ujemne. Badanie przeciwciał anty-SARS-CoV-2 powinno być interpretowane razem z wynikiem badania RT-PCR (wymaz z gardła/nosogardzieli) – Tabela 1.

Testu tego nie można używać do diagnozowania ostrej infekcji. Należy również pamiętać, że z biegiem czasu miano przeciwciał może się obniżyć i ostatecznie wynik będzie ujemny. Na pytanie jak długo utrzymują się przeciwciała w organizmie i na jakim poziomie będą się kształtować, będziemy mogli odpowiedzieć dopiero po upływie dłuższego czasu.

Tabela 1.

Interpretacja  
wyników RT-PCR  
/Anty-SARS-CoV-2.

|                                         |                                                                                                                              |
|-----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| RT-PCR ujemny/anty-SARS-CoV-2 ujemne    | pacjent nie jest zakażony wirusem lub przebył zakażenie w przeszłości, a miano przeciwciał obniżyło się i jest nieoznaczalne |
| RT-PCR dodatni/anty-SARS-CoV-2 ujemne   | pacjent zakażony w tzw „okienku serologicznym” (nie wytworzył jeszcze przeciwciał)                                           |
| RT-PCR dodatni/anty-SARS-CoV-2 dodatnie | pacjent w ostrej fazie infekcji                                                                                              |
| RT-PCR ujemny/anty-SARS-CoV-2 dodatnie  | pacjent przebył zakażenie w przeszłości                                                                                      |

W Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej Mazowieckiego Szpitala Specjalistycznego w Radomiu przebadano szereg próbek surowic krwi osób, u których wcześniej potwierdzono infekcje przy pomocy testu RT-PCR. Zaobserwowano jednocześnie obecność przeciwciał u osób, u których nie uzyskano nigdy dodatnich wyników RT-PCR. Badania wykonano przy pomocy testu Elecsys Anti-SARS-CoV-2 firmy Roche Diagnostics na analizatorze cobas 6000. W formacie wykorzystanego do badań testu, wysoką swoistość wykazują przeciwciała anty-nukleokapsydowe, które korelują z neutralizacją i nabytą domniamaną odpornością kliniczną.

Test został tak skonstruowany, by wykrywać przeciwciała o wysokim powinowactwie. Musimy pamiętać, że w odpowiedzi na każdy czynnik zakaźny w organizmie, przeciwciała ewoluują. Kiedy wirus pojawia się po raz pierwszy u danej osoby, jego układ immunologiczny początkowo generuje przeciwciała o niskim powinowactwie do wirusa. To niskie powinowactwo oznacza, że wczesne przeciwciała nie są

w stanie skutecznie wiązać się z wirusem i go wyeliminować. W miarę ewolucji odpowiedzi immunologicznej wytwarzane będą przeciwciała o wysokim powinowactwie (dojrzałe), które wiążą się z wirusem i neutralizują go. Te przeciwciała o wysokim powinowactwie pojawiają się później w trakcie infekcji i są to właśnie te przeciwciała, które wykrywane są za pomocą testu użytego w naszych badaniach. Taka konstrukcja testu minimalizuje ryzyko słabej reaktywności krzyżowej i uzyskania fałszywie dodatnich wyników.

Uzyskane wstępne wyniki naszych badań odzwierciedlają odpowiedź immunologiczną organizmu. Obserwujemy wzrost wartości wskaźnika COI w czasie miesiąca w granicach od 41% do 165% u osób z potwierdzoną przy pomocy RT-PCR infekcją oraz w granicach od 40% do 266% u osób z niepotwierdzoną badaniem RT-PCR infekcją (Tabela 2).

Nasze wyniki potwierdzają również, że poziom przeciwciał nie jest bezpośrednio skorelowany z ciężkością zakażenia (Tabela 3).

**Tabela 2.**

Zmiany poziomu przeciwciał anty-SARS-CoV-2 (podane w wartościach COI) dla osób z potwierdzoną oraz niepotwierdzoną infekcją wirusem wywołującym COVID-19.

| Pacjent                                        | Płeć | Data wykonanego badania RT-PCR SARS-CoV2 | Data I oznaczenia przeciwciał anty-SARS-CoV-2 | Wynik I oznaczenia przeciwciał anty-SARS Co-V2 (COI) | Data II oznaczenia przeciwciał anty-SARS Co-V2 | Wynik II oznaczenia przeciwciał anty-SARS CoV-2 (COI) | Wzrost o %* |
|------------------------------------------------|------|------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------|
| Pacjenci z badaniem RT-PCR SARS-CoV-2 dodatnim |      |                                          |                                               |                                                      |                                                |                                                       |             |
| 1.                                             | K    | 01.04.2020                               | 29.04.2020                                    | 16,45                                                | 1.06.2020                                      | 43,64                                                 | 165%        |
| 2.                                             | K    | 03.04.2020                               | 28.04.2020                                    | 83,55                                                | 2.06.2020                                      | 199,1                                                 | 138%        |
| 3.                                             | M    | 30.03.2020                               | 7.05.2020                                     | 80,55                                                | 5.06.2020                                      | 167,9                                                 | 108%        |
| 4.                                             | M    | 29.03.2020                               | 6.05.2020                                     | 11,19                                                | 19.06.2020                                     | 21,38                                                 | 91%         |
| 5.                                             | K    | 29.03.2020                               | 5.05.2020                                     | 61,45                                                | 5.06.2020                                      | 103,3                                                 | 68%         |
| 6.                                             | K    | 03.04.2020                               | 4.05.2020                                     | 97,7                                                 | 5.06.2020                                      | 162,7                                                 | 66%         |
| 7.                                             | K    | 31.03.2020                               | 4.05.2020                                     | 129,8                                                | 5.06.2020                                      | 183,6                                                 | 41%         |
| 8.                                             | K    | 03.04.2020                               | 6.05.2020                                     | 105,1                                                | 5.06.2020                                      | 148,5                                                 | 41%         |
| 9.                                             | K    | 29.03.2020                               | 5.05.2020                                     | 88,59                                                | 5.06.2020                                      | 108,1                                                 | 22%         |
| 10.                                            | K    | 29.03.2020                               | 8.05.2020                                     | 124,2                                                | 10.06.2020                                     | 141,8                                                 | 14%         |
| Pacjenci z badaniem RT-PCR SARS-CoV-2 ujemnym  |      |                                          |                                               |                                                      |                                                |                                                       |             |
| 1.                                             | K    | 29.03.2020                               | 6.05.2020                                     | 13,78                                                | 3.06.2020                                      | 50,5                                                  | 266%        |
| 2.                                             | K    | 30.03.2020                               | 29.04.2020                                    | 56,36                                                | 29.05.2020                                     | 149,5                                                 | 165%        |
| 3.                                             | M    | 30.03.2020                               | 05.05.2020                                    | 82,14                                                | 05.06.2020                                     | 204,9                                                 | 149%        |
| 4.                                             | M    | 30.03.2020                               | 12.05.2020                                    | 71,11                                                | 16.06.2020                                     | 145,3                                                 | 101%        |
| 5.                                             | K    | 10.04.2020                               | 4.05.2020                                     | 105,3                                                | 5.06.2020                                      | 147,8                                                 | 40%         |

\*% zmiany wskaźnika COI (cut-off index)

**Tabela 3.**

Występowanie objawów charakterystycznych dla przebiegu COVID-19 u osób z potwierdzoną oraz niepotwierdzoną infekcją wirusem SARS-CoV-2.

| Pacjent                                       | Gorączka | Stan podgorączkowy | Oslabienie | Ból gardła | Ból głowy | Kaszel | Katar | Bóle mięśni i stawów | Utrata węchu i smaku | Czas trwania objawów (dni) | Wzrost o %* |
|-----------------------------------------------|----------|--------------------|------------|------------|-----------|--------|-------|----------------------|----------------------|----------------------------|-------------|
| Pacjenci z badaniem RT-PCR SARS-CoV2 dodatnim |          |                    |            |            |           |        |       |                      |                      |                            |             |
| 1.                                            | NIE      | TAK 37,7 °C        | TAK        | TAK        | TAK       | TAK    | TAK   | TAK                  | TAK                  | 14                         | 165%        |
| 2.                                            | NIE      | TAK 37,7 °C        | TAK        | TAK        | TAK       | TAK    | TAK   | TAK                  | TAK                  | 14                         | 138%        |
| 3.                                            | NIE      | NIE                | NIE        | NIE        | NIE       | NIE    | NIE   | NIE                  | NIE                  | 0                          | 108%        |
| 4.                                            | NIE      | NIE                | NIE        | NIE        | NIE       | NIE    | NIE   | NIE                  | TAK                  | 7                          | 91%         |
| 5.                                            | NIE      | TAK 37,7 °C        | TAK        | NIE        | NIE       | NIE    | NIE   | NIE                  | TAK                  | 5                          | 68%         |
| 6.                                            | NIE      | TAK 37,7 °C        | TAK        | NIE        | TAK       | NIE    | NIE   | TAK                  | NIE                  | 14                         | 66%         |
| 7.                                            | NIE      | TAK 37,7 °C        | TAK        | TAK        | TAK       | NIE    | TAK   | TAK                  | NIE                  | 14                         | 41%         |
| 8.                                            | NIE      | TAK 37,7 °C        | TAK        | TAK        | TAK       | TAK    | NIE   | TAK                  | TAK                  | 14                         | 41%         |
| 9.                                            | NIE      | TAK 37,7 °C        | TAK        | TAK        | TAK       | NIE    | NIE   | TAK                  | TAK                  | 14                         | 22%         |
| 10.                                           | NIE      | TAK 37,8 °C        | TAK        | NIE        | NIE       | NIE    | NIE   | TAK                  | TAK                  | 14                         | 14%         |
| Pacjenci z badaniem RT-PCR SARS-CoV-2 ujemnym |          |                    |            |            |           |        |       |                      |                      |                            |             |
| 1.                                            | NIE      | NIE                | NIE        | NIE        | NIE       | NIE    | NIE   | NIE                  | NIE                  | 0                          | 266%        |
| 2.                                            | NIE      | NIE                | NIE        | NIE        | NIE       | NIE    | NIE   | NIE                  | NIE                  | 0                          | 165%        |
| 3.                                            | NIE      | NIE                | NIE        | NIE        | NIE       | NIE    | NIE   | NIE                  | NIE                  | 0                          | 149%        |
| 4.                                            | NIE      | NIE                | NIE        | NIE        | NIE       | NIE    | NIE   | NIE                  | NIE                  | 0                          | 101%        |
| 5.                                            | NIE      | NIE                | NIE        | NIE        | NIE       | NIE    | NIE   | NIE                  | NIE                  | 0                          | 40%         |

\*% zmiany wskaźnika COI (cut-off index)

# Diagnostyka SARS-CoV-2 i COVID-19

## Kompleksowa oferta Roche Diagnostics

### cobas® SARS-CoV-2

**cobas** SARS-CoV-2 & Inf A/B\*  
TIB MOLBIOL SARS-CoV-2\*\*

### Elecsys Anty-SARS-CoV-2

### Koagulologia

D-Dimery

### Równowaga kwasowo-zasadowa



### Chemia kliniczna

CRP, Ferrytyna, D-Dimery, Albumina, ALT, AST,  
Dehydrogenaza mleczanowa, Bilirubina, Glukoza, CK-MB,  
Migloblina, Moczni, Cystatyna C, Kreatynina

### Immunochemia

IL-6, Ferrytyna, PCT, Migloblina,  
TnT-hs, NT-proBNP, HIV, WZW B/C

### Diagnostyka molekularna

HIV, WZW B/C, Infuena A/B,  
Zapalenie płuc (bakterie, Mycoplasma, Chlamydia),  
RSV4, adenowirus

### Point of Care

SARS-CoV-2 & Infuena A/B

\*W przygotowaniu  
\*\*RUO - tylko do badań naukowych

@2020 Roche Diagnostics

Roche Diagnostics Polska Sp. z o.o.  
ul. Bobrowiecka 8  
00-728 Warszawa

+48 22 481 54 00-05  
polska.diagnostics@roche.com

[www.roche.pl](http://www.roche.pl)



Projekt i realizacja:  
EDC Expert Direct Communication Sp. z o.o.

ISSN 1644-8448, nakład: 1000 egz.