

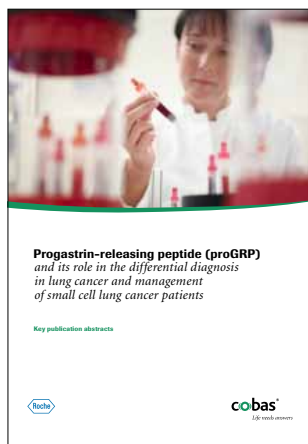
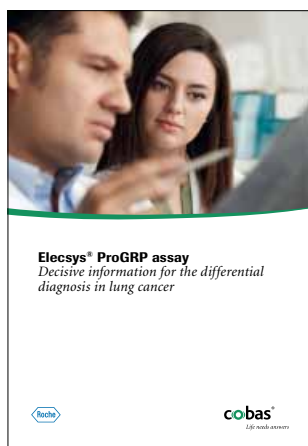


ISSN 1644-8448
nakład: 1000 egz.

LabForum



cobas[®]
Life needs answers



Szanowni Państwo,

Miło mi poinformować, że Roche wprowadza nowy marker nowotworowy – ProGRP, stosowany w diagnostyce raka płuc. Ten nowo wprowadzany parametr to bardzo czuły i dokładny test, który jest wykonywany na analizatorach immunochemicznych serii **cobas e** i Elecsys.

Rak płuca jest najczęściej występującym nowotworem złośliwym w Polsce, będąc pierwszą przyczyną zgonów wywołanych chorobami nowotworowymi u mężczyzn i drugą u kobiet. Jeszcze sto lat temu był rozpoznawany sporadycznie, rozpowszechnienie nałogu palenia tytoniu spowodowało, że na świecie każdego roku diagnozuje się ok. 1,35 mln nowych przypadków, co stanowi prawie 13% wszystkich nowych przypadków zachorowań na raka.

Około 20% wszystkich nowotworów płuc stanowi rak drobnokomórkowy (SCLC, *small cell lung carcinoma*), charakteryzujący się dużą złośliwością, zwykle rozpoznawany jest już w okresie uogólnionej choroby i podstawą leczenia jest odpowiednia chemioterapia. Komórki tego guza wytwarzają białko stymulujące wydzielanie prekursora gastryny (proGRP, *progastrin-releasing peptide*), które można oznaczać zarówno w tkance nowotworu, jak i krwi. Oznaczenie proGRP pozwala na wczesne wykrycie SCLC oraz różnicowanie z inną częstą postacią guza płuca – rakiem niedrobnokomórkowym (NSCLC, *non-small cell lung carcinoma*).

Diagnostyka różnicowa tych dwóch typów ma ogromne znaczenie ponieważ mają one różne podłoże patofizjologiczne i odmienne postępowanie lecznicze: przy wczesnym stadium NSCLC stosuje się zazwyczaj leczenie chirurgiczne, podczas gdy przy SCLC musi być zastosowana chemio- i radioterapia. Oznaczenie stężenia proGRP przewyższa czułością i swoistością inne obecnie stosowane markery, a połączenie oznaczenia proGRP i „standardowego” markera dla raka płuca – enolazy neuronalnej (NSE, *neuron-specific enolase*) znacząco zwiększa dokładność rozpoznania, zwłaszcza w przypadku wątpliwości obrazu histopatologicznego. Testy firmy Roche pozwalają na jednoczasowy pomiar markerów takich jak proGRP, NSE i CYFRA 21-1 w tej samej próbówce. Oprócz tych markerów immunochemicznych Roche produkuje również marker molekularny EGFR, który pozwala wyselekcjonować pacjentów do celowanej terapii biologicznej (np. przy użyciu leku Tarceva).

Zapraszam również do lektury bieżącego wydania LabForum, w którym znajdują Państwo ciekawe artykuły z zakresu diagnostyki wirusologicznej, transplantologicznej i immunohistochemicznej.

Z poważaniem,

Tomáš Petr

Spis treści:

Wirusologiczne badania przeglądowe
u krwiodawców 3

Ludzki wirus cytomegalii (HCMV)
u biorców przeszczepów narządów litych 8

Immunohistochemiczne
wykrywanie mutacji ALK w rakach
niedrobnokomórkowych płuca 13

Wirusologiczne badania przeglądowe u krwiodawców

Aneta Kopacz, Zakład Wirusologii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie

STRESZCZENIE

W Polsce do badań wirusologicznych zgodnie z zaleceniami WHO stosowane są metody i testy ze znakiem CE, wysokiej czułości i swoistości bliskiej 100%. Badania markerów serologicznych wykonywane są w pojedynczej próbce. Do badań NAT wykorzystuje się testy typu multiplex (w jednym badaniu wykrywany jest materiał genetyczny kilku wirusów). Dopuszcza się możliwość prowadzenia badań molekularnych w pulach osocza (zlanego z „n” donacji) pod warunkiem zachowania czułości badania rekomendowanej przez WHO i/lub krajową jednostkę nadzorującą krwiodawstwo. W polskiej służbie krwi każdy reaktywny wynik testu przeglądowego podlega weryfikacji przez badania powtórne i uzupełniające. Dawca z potwierdzonym wynikiem dodatnim wzywany jest na badanie kontrolne, wykluczające pomyłkę co do badanej próbki. Od ponad 20 lat prowadzone są międzynarodowe badania nad nowo pojawiającymi się chorobami zakaźnymi i wywołującymi je czynnikami przenoszonymi przez krew. W sytuacji, gdy zostaje jednoznacznie stwierdzone, że dany czynnik stanowi zagrożenie dla biorców krwi, w obowiązkowy panel badań przeglądowych dołączane są testy identyfikujące zakażonych dawców, wykluczając z użycia niebezpieczne donacje.

WIRUSY PRZENOSZONE PRZEZ KREW

Konieczność wykonywania przeglądowych badań wirusologicznych u krwiodawców wynika z faktu istnienia wirusów, które występując w krwiobiegu przez choćby krótki okres, nie dają objawów infekcji (zauważalnych tak dla dawcy wypełniającego kwestionariusz, jak i lekarza kwalifikującego), a są przenoszone z krwią i wywołują choroby niebezpieczne dla życia i zdrowia biorcy.

Okres ten może trwać od kilku dni do wielu lat i zależy od drobnoustroju (wirulencji, szybkości replikacji, tworzenie form polimorficznych) oraz sprawności układu immunologicznego osoby zakażonej (m.in. wielkość miana swoistych przeciwciał po szczepieniu przeciwko HBV). W przebiegu zakażenia bezobjawowego stężenie czynnika zakaźnego może się wahać od wartości niewykrywalnych do tysięcy kopii/ml. W przypadku, gdy nie ma skutecznych, dostosowanych do wszystkich składników krwi, procesów inaktywacji drobnoustrojów, jedyną możliwość zapobiegania przeniesienia zakażenia przez transfuzję (TT-, ang. *transfusion transmission*) stanowią badania przeglądowe wykonywane dla każdej donacji.

Zgodnie z przepisami i zaleceniami międzynarodowymi (Światowa Organizacja Zdrowia, Unia Europejska, Rada Europy) obowiązek badania markerów w każdej donacji krwi lub w pobieranym jej składniku dotyczy wirusów powszechnie chorobotwórczych. Zaliczono do nich: wirusa zapalenia wątroby typu B (HBV) i typu C (HCV) oraz wirusa upośledzenia odporności (HIV). Szacunkowe obliczenia wskazują, że zakażenie HBV dotyczy co najmniej 300 milionów, a HCV 170 milionów ludzi na świecie. Zakażonych HIV jest około 40 milionów, ale liczba nosicieli wirusa i chorych na AIDS stale wzrasta i jak dotychczas nie ma dostępnego w pełni skutecznego leku przeciw temu wirusowi.¹

WIRUSOLOGICZNE BADANIA PRZEGLĄDOWE W POLSKIM KRWIODAWSTWIE

HBV

Badania na obecność antygeny powierzchniowego HBs (HBsAg) u krwiodawców prowadzone są od ponad 40 lat. W tym czasie czułość metod wzrosła o wiele

Wprowadzenie do krwiodawstwa serologicznych testów przeglądowych wykrywających antygeny i przeciwciała wirusów znacząco zwiększyło bezpieczeństwo tocznej krwi. Badania nad kinetyką zakażeń wykazują występowanie faz, w których krew jest zakaźna, mimo, że markery serologiczne są niewykrywalne. Sytuacja ta dotyczy okresu okna serologicznego definiowanego jako czasu od momentu zakażenia do pojawienia się serologicznych markerów wirusa w osoczu oraz ukrytego/utajonego zakażenia (ang. Occult Infection), kiedy marker serologiczny jest niewykrywalny przez stosowany test ze względu na jego brak/niską produkcję, silną neutralizację, lub zmienioną budowę. Identyfikację zakażenia w/w fazach umożliwiają badania wykrywające kwasy nukleinowe wirusów (NAT; ang. Nucleic Acid Testing).

W Polsce, zarówno serologiczne (metodykę opisano poniżej) jak i molekularne (wykonywane opcjonalnie metodą: PCR - łańcuchowa reakcja polimerazy lub TMA - amplifikacja przez transkrypcję) badania przeglądowe wykonywane są w Centrach Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa (CKiK). W przypadku otrzymania wyniku powtarzalnie reaktywnego badania weryfikacyjne prowadzone są w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii (IHiT).

rzędów wielkości Pierwszy ze stosowanych testów wykrywających HBsAg oparty był na immunoprecypitacji, kolejne na: elektroimmunoprecypitacji (EIP) i odczynie wiązania dopełniacza (OWD). Wielkim osiągnięciem było wprowadzenie testów immunoenzymatycznych (EIA) o znacznie większej czułości i swoistości. Testy poszczególnych producentów różnią się czułością wykrywania genotypów, subtypów i form polimorficznych wirusa HBV². Udoskonalanie obecnie stosowanych testów EIA w tym immunoenzymosorbcyjnego (ELISA; *enzyme-linked immunosorbent assays*) i chemiluminescencyjnego (CLIA; *chemiluminescent immunoassay*) ma na celu umożliwić wykrywanie również zmienionych m.in. na skutek mutacji antygenów HBs. Obecnie w polskiej służbie krwi stosuje się testy ELISA o czułości < 0,2 ng/ml oraz CLIA < 0,1 ng/ml (102–267 HBV DNA IU/ml w badaniu NAT)³. Każdy wynik HBsAg reaktywny jest weryfikowany przez dwukrotne powtórzenie badania przeglądowego. Dla wyniku powtarzalnie reaktywnego wykonywany jest test potwierdzenia, który polega na neutralizacji antygenu HBs przez użyte w teście przeciwciała anti-HBs. Postępowanie to umożliwia różnicowanie wyników dodatnich od fałszywie dodatnich. Od roku 2005, w przypadku otrzymania ujemnego wyniku testu neutralizacji, próbka badana jest na obecność materiału genetycznego HBV. Dawcy z dodatnimi wynikami potwierdzenia (neutralizacja i/lub DNA HBV+) są odsuwani od krwiodawstwa (dyskwalifikowani) na stałe. Dawcy z wynikami niepotwierdzonymi dyskwalifikowani są czasowo⁴.

Z kinetyki zakażenia wiadomo, że wirusa HBV cechuje długi okres niskiej wiremii a okno serologiczne trwa około 36 dni⁵. Badania DNA HBV u krwiodawców pozwalają na wykrycie zakażenia w okresie „okna serologicznego”, co skutkuje dyskwalifikacją tej donacji zmniejszając ryzyko przeniesienia wirusa na biorcę. Skrócenie okna diagnostycznego (wczesne wykrycie zakażenia HBV) zależy od czułości stosowanych testów oraz wielkości badanych pul⁵. Obecnie dostępne testy wykrywające 3 – 5 IU/ml DNA HBV (95%LOD) pozwalają skrócić okno diagnostyczne do ok. 2 tygodni – przy założeniu dostania się do wątroby pojedynczych kopii wirusa (Ryc.1 HBV). Badania molekularne obok wykrywania zakażeń z etapu okna serologicznego pozwalają na identyfikację zakażeń ukrytych/ utajonych charakteryzujących się niewykrywalnym HBsAg i niską wiriemią < 200 IU/ml (w całym przebiegu zakażenia lub okresie innym niż okno serologiczne)⁶.

Obecne krajowe rekomendacje dla krwiodawstwa podają, że czułość przeglądowych badań DNA HBV dla pojedynczej donacji powinna być nie niższa niż 24 IU/ml (95% LOD)⁴. Testy o wysokiej czułości (wykrywające < 3 IU/ml DNA HBV) pozwalają zatem na prowadzenie badań w pulach (złożonych z maksymalnie 8 donacji). Do każdego HBsAg ujemnego, a NAT reaktywnego wyniku, wykonywane są dodatkowe badania molekularne w CKiK oraz weryfikacyjne w IHiT.

Wyniki międzynarodowego przeglądu badań NAT dla okresu 1999-2009 wskazują, że obligatoryjnie badanie DNA HBV wprowadzono w 12 krajach, w kolejnych 15 wykonywane są jako badania dodatkowe.⁷

HCV

Najpowszechniej stosowanym testem przeglądowym do identyfikacji osób zakażonych HCV jest badanie przeciwciał anti-HCV. W polskim krwiodawstwie obligatoryjne badania tego markera rozpoczęto w 1992 roku testami 2 generacji i zawsze stosuje się testy najczulsze z dostępnych na rynku. Mimo licznych udoskonaleń (obecnie używane są testy 3 generacji) badanie to ma ograniczone znaczenie. Testy wykrywające anti-HCV mogą dawać wyniki

falszywie dodatnie wynikające z: błędów technicznych wykonania testu, złego stanu próbki oraz z reakcji krzyżowych z innymi białkami. Te ostatnie tzw. wyniki biologicznie fałszywie reaktywne (BFR ang. *biological false reactives*), tj. wyniki nieswoiście reaktywne, prawdopodobnie występują na skutek reakcji krzyżowych z przeciwciałami nieodpłukanyymi w czasie produkcji testu, IgG, autoprzeciwciałami czy białkami wytworzonymi po szczepieniach. Ze względu na występowanie BFR, po otrzymaniu reaktywnego wyniku badania przeciwciał anti-HCV stosuje się następujący algorytm:

- 1) powtórne dwukrotne badanie próbki testem przeglądowym w dniu pobrania lub nazajutrz;
- 2) próbki powtarzalnie reaktywne badane są kolejno:

- a) na obecność RNA HCV – wynik reaktywny świadczy o aktualnie toczącym się zakażeniu;
- b) testem typu *western blot* (RIBA/Innolia), gdy wynik wcześniejszego badania RNA HCV był ujemny. *Western blot* jest testem uzupełniającym, jego dodatni wynik potwierdza swoistość przeciwciał anti-HCV występujących u osób, które przebyły zakażenie HCV w przeszłości.¹

Wszyscy dawcy, u których potwierdzono zakażenie HCV są dyskwalifikowani na stałe. W przypadku wyników niepotwierdzonych (RNA HCV niereaktywny oraz RIBA/Innolia ujemny lub wątpliwy) w stosunku do dawcy stosuje się dyskwalifikację czasową.⁴ Zakażenie wirusem HCV charakteryzuje długie okno serologiczne. Średni czas od momentu zakażenia do pojawienia się anti-HCV wynosi 70 dni. Opracowanie testu wykrywającego antygen rdzeniowy HCVAg umożliwiło skrócenie okna diagnostycznego (okres od momentu zakażenia do wykrycia markera wirusa) do 7-14 dni. Test ten wprowadzono w Polsce, na kilka miesięcy w 2001 roku do badania donacji seroujemnych, a zrezygnowano z jego wykonywania m.in. ze względu na wprowadzenie w roku 2002 obligatoryjnych badań RNA HCV. Minimalna czułość badań przeglądowych RNA HCV określona przez WHO to 5 000 IU/ml w odniesieniu do pojedynczej donacji⁸. Ponieważ okres okna serologicznego HCV charakteryzuje szczególnie duża zakaźność związana z bardzo wysokim stężeniem wirusa przez znaczną część tego okresu, od pojawienia się pierwszych testów NAT w 1999 roku kolejne kraje wysoko i średnio rozwinięte wprowadzały obligatoryjne badanie donacji na obecność RNA HCV. W 2008 roku badania wykonywano w co najmniej 23 krajach (w pojedynczej donacji lub pulach z 6-96 donacji)⁷. W Polsce pierwsze badania dawców w kierunku RNA HCV wykonywane były metodą PCR w pulach z 48 donacji. W 2005 roku wielkość badanej puli zmniejszono do złożonej z 24 donacji, a następnie w 2007 do puli z 6 donacji. Alternatywnie od 2003 roku część donacji badana jest metodą TMA w pojedynczych donacjach. Wszystkie powtarzalnie reaktywne wyniki testu przeglądowego RNA HCV w próbkach seroujemnych weryfikowane są w IHiT metodą biologii molekularnej⁴. Obecnie dostępne badania NAT (czułość testów <10 IU/ml) umożliwiają wykrycie zakażenia już w 3-5 dniu po ekspozycji (ryc. 1: HCV).

HIV

Obowiązkowe badania wszystkich donacji na obecność przeciwciał anti-HIV w polskim krwiodawstwie rozpoczęto w 1987 roku. Pierwsze testy immunoenzymatyczne wykrywały przeciwciała anti-HIV po 42 dniach od zakażenia. Testy trzeciej generacji skróciły okres okienka serologicznego do około 21 dni. Test wykrywający antygen p24 (pojawiający się po 14 dniach od zakażenia) skraca okno serologiczne o kolejne dni, jednak wprowadzenie go do krwiodawstwa nie dało oczekiwanego efektu eliminacji TT-HIV. Jednakże możliwość



cobas e 601

· system
immunochemiczny
przeznaczony dla
średnich i dużych
laboratoriów



cobas® 6000

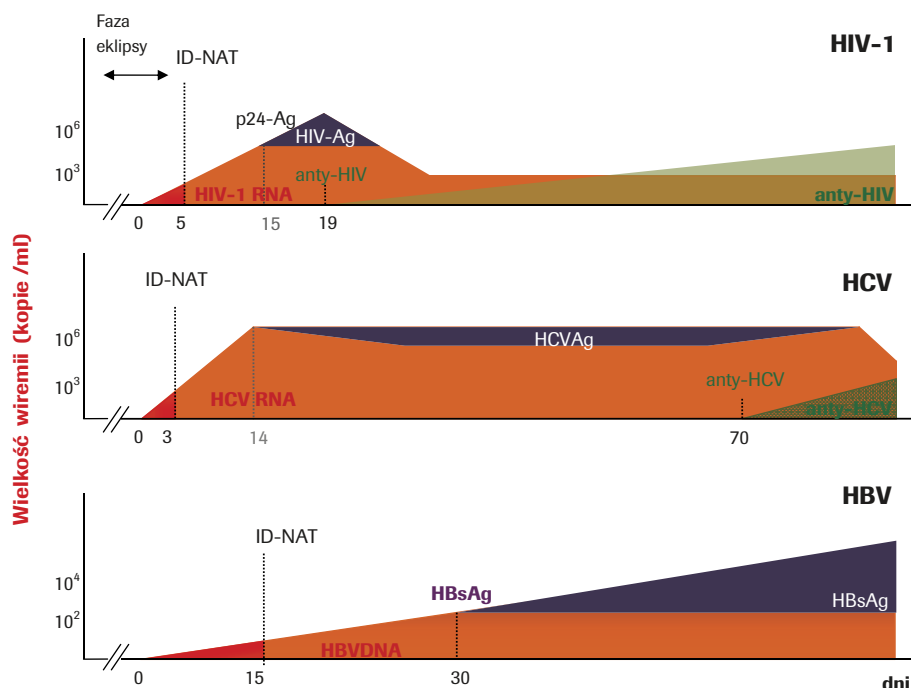
· zintegrowany system
biochemiczno-
immunochemiczny



cobas e 411

· system
immunochemiczny
przeznaczony dla
małych i średnich
laboratoriów

1 Schematyczny wykres zakaźności, poziom wirerii i obecności markerów molekularnych i serologicznych dla wczesnych faz zakażenia HIV-1, HCV, HBV. Wykresy przedstawiają dynamikę wirerii i produkcji przeciwciał od fazy eklipsy przez plateau po późną fazę zakażenia. Czerwony kolor wskazuje prawdopodobieństwo niewykrycia zakażenia mimo stosowania najczulszego badania NAT przy założeniu, że do krwioobiegu dostanie się 1 zakaźny wirion, co jest równoznaczne z ryzykiem przeniesienia zakażenia przy przetoczeniu składnika pochodzącego od dawcy we wczesnej fazie WP (1 wirionu/20ml osocza = 1KKCz) Kolor pomarańczowy = stężenie wirusa, fioletowy = możliwość wykrycia antygenu, zielony = wykrywalność przeciwciał. Kleinman et al. Transfusion (2009) 49:2454-2489 – modyfikacja własna (na podstawie czułości metod/testów dostępnych w roku 2012).



wykrywania antygenu HIV została wykorzystana do konstrukcji testów IV generacji tzw. COMBI wykrywających jednocześnie antygen p24 i przeciwciała anti-HIV1 i anti-HIV2 (stosowanych w krwiodawstwie opcjonalnie z testami III generacji)¹. Reaktywny wynik badania wymaga dwukrotnego powtórzenia testu przeglądowego. Ostateczne potwierdzenie zakażenia u dawcy następuje po zbadaniu donacji (z wynikami powtarzalnie reaktywnymi testów) na obecność RNA wirusa i wykonaniu testu WB. Dawcy, u których potwierdzono zakażenie HIV są dyskwalifikowani na stałe. W przypadku wyników niepotwierdzonych (RNA HIV niereaktywny i WB ujemny lub nieokreślony) w stosunku do dawcy stosuje się dyskwalifikację czasową⁴.

Należy zaznaczyć, że ze względu na wysoki polimorfizm wirusa HIV i związane z tym ryzyko wyników fałszywie ujemnych, każdy dawca, w którego próbce otrzymano powtarzalnie reaktywny wynik anti-HIV a nie wykryto materiału genetycznego wirusa badany jest w kolejno pobranej próbce na obecność RNA HIV metodą alternatywną. Obowiązkowe badania RNA HIV zgodnie z rekomendacjami WHO (minimalna czułość badania dla pojedynczej donacji = 10 000IU/ml) prowadzone są w co najmniej 20 krajach. W Polsce badania od roku 2003 wykonywane są opcjonalnie w pojedynczych donacjach i pulach (zmiany wielkości pul analogicznie jak dla HCV, rozpoczynając od roku 2005 tj. pul z 24 donacji). Każdy wynik RNA HIV powtarzalnie reaktywny/ anti-HIV niereaktywny (w metodzie *western blot*) przed przekazaniem dawcy jest weryfikowany w IHiT.

Krótki czas podwajania liczby kopii wirusa wynoszący 0,85 dnia oraz wprowadzenie bardzo czułych (18-174 IU/ml) przeglądowych badań molekularnych umożliwia skrócenia okna diagnostycznego HIV do kilku dni (ryc.1:HIV)⁹.

WYŁANIAJĄCE SIĘ CHOROBY ZAKAŻNE (ANG. EMERGING INFECTIOUS DISEASES, EID)

Obok działań mających na celu eliminację ryzyka przeniesienia przez krew wirusów określonych jako powszechnie chorobotwórcze, od ponad 2 dekad prowadzone są badania nad wyłaniającymi się chorobami zakaźnymi oraz ich znaczeniem dla bezpieczeństwa krwi. Za „nowo wyłaniające się” uznano te, których częstość wzrosła w ostatnich 20 latach lub grozi wzrostem w najbliższej przyszłości. Do wystąpienia EID przyczyniają się takie mechanizmy jak:

- a) przełamanie bariery gatunkowej zwierzęta-ludzie (HIV, SARS);
- b) ekspansja zakażeń w nowe regiony: wirus zachodniego Nilu (WNV), dengi (DENV), chikungunya (CHIKV); czynniki zakaźne niewirusowe: Plasmodium species/malaria/, Babesia species, Trypanosoma cruzi /choroba Chagasa;
- c) ustalenie czynnika zakaźnego wywołującego znaną chorobę dzięki zastosowaniu nowych technik badawczych: ludzki Herpeswirus-8 (HHV-8), wirus GB (GBV-C), wirus Torque teno (TTV/SEN-V);
- d) reaktywację zakażenia, którego konsekwencją jest wystąpienie poważnej choroby na skutek: przełamania odporności poszczepiennej (np. HBV), programów kontrolujących wektory zakażenia czy nabycia lekooporności (malaria, DENV, CHIKV) lub stosowania leków immunosupresyjnych: wirus cytomegalii (CMV), Epstein -Barr (EBV), HBV, parwovirus B19 (B19V)¹⁰.

Efektom prac nad nowopojawiającymi się chorobami zakaźnymi jest m.in. wprowadzenie, w regionach, gdzie odnotowuje się wzrastającą ich częstość dodatkowych badań serologicznych i/lub molekularnych u krwiodawców zapobiegając przenoszeniu ich poprzez krew. Przykładem jest stosowanie od 2002 roku oznaczeń wirusa zachodniego Nilu (WNV) metodami NAT kolejno w: USA, Kanadzie, Grecji, Włoszech. Podobnie sytuacja epidemiologiczna w 19 krajach świata jest przyczyną badania markerów wirusa HTLV-1 i HTLV-2⁷.

Dostęp do coraz czulszych metod serologicznych i molekularnych pozwala znacząco skrócić okres okien diagnostycznych, a tym samym ograniczyć ryzyko przenoszenia zakażeń przez krew i jej składniki. Z ostatnio opublikowanego międzynarodowego podsumowania badań wirusologicznych w krwiodawstwie wynika, że w 2008 roku w kierunku markerów serologicznych wirusów HBV, HCV, HIV badania wykonywano w 37 krajach, a w 25 również metodami biologii molekularnej⁷. Analizując skuteczność badań przeglądowych, wyliczane ryzyko resztkowe i opublikowane przypadki zakażeń potransfuzyjnych kolejne państwa rozszerzają ich panel.

Należy podkreślić, że decyzja o wprowadzaniu kolejnych badań zawsze poprzedzona jest rozpatrzeniem minimum 4 zmiennych:

- 1) wpływ zakażenia danym drobnoustrojem na zdrowie publiczne (częstość, następstwa oraz ryzyko przeniesienia i rozprzestrzeniania wirusa);
- 2) reakcja społeczeństwa na pojawianie się czynnika i przebieg choroby (choć może być dysproporcjonalna do zagrożenia);
- 3) koszty;
- 4) dostępność właściwych testów charakteryzujących się odpowiednią swoistością i czułością, oraz sposobem wykonania, który umożliwi prowadzenie badań na masową skalę¹⁰.

Ważnym czynnikiem jest również możliwość weryfikacji wyników reaktywnych.



cobas e 601

· system immunochemiczny przeznaczony dla średnich i dużych laboratoriów



cobas® s 201

· system do badań przeglądowych NAT u dawców krwi wykrywający wirusy: HCV, HBV, HIV, Parwo B19, HAV i WNV

Piśmiennictwo dostępne w redakcji

Ludzki wirus cytomegalii (HCMV) u biorców przeszczepów narządów litych

Anna Kędzierska, Szpital Uniwersytecki w Krakowie, Zakład Mikrobiologii

Gatunkowo swoisty ludzki wirus cytomegalii (HCMV) należy do rodziny Herpesviridae, podrodziny Betaherpesvirinae, taksonomicznie określany jest jako herpes 5 (HHV-5). Genom wirusa zbudowany jest z liniowego, dwuniciowego DNA. Badania epidemiologiczne wskazują na szerokie rozpowszechnienie HCMV w środowisku naturalnym człowieka. U osób immunokompetentnych zakażenie jest samo ograniczające się o charakterze subklinicznym. U większości przebiega bezobjawowo i nie pozostawia trwałych następstw infekcji.

ZAKAŻENIE HCMV

Ludzki wirus cytomegalii należy do grupy patogenów oportunistycznych będących najczęstszą przyczyną zachorowań i śmiertelności u biorców przeszczepów narządowych, w tym biorców organów litych (SOT). Poprzez wywierane efekty pośrednie i bezpośrednie, ma niekorzystny wpływ na przeżycie biorców i przeszczepionych narządów. Konsekwencją zakażenia jest replikacja wirusa w przeszczepionym narządzie, której towarzyszy uwalnianie zakaźnych wirionów do krwiobiegu (postać wiremiczna). Powikłania spowodowane replikacją HCMV wystąpić mogą u 30-80% pacjentów poddanych przeszczepom narządów litych². Valsamakis z Johns Hopkins Hospital w Baltimore przypomina, iż choroba HCMV, u biorców po przeszczepie, może przyjąć postać wiremii bezobjawowej (zakażenia bez choroby), „zespołu CMV” z towarzyszącą gorączką, leukopenią, trombocytopenią, złym samopoczuciem, brakiem łaknienia (anoreksją) lub inwazyjną, obejmującą różne układy oraz narządy, w tym płuca, wątrobę, przewód pokarmowy¹. Częstość z jaką dochodzi do rozwoju choroby HCMV u biorców jest różna, w zależności od rodzaju przeszczepu, nasilenia immunosupresji czy „obciążenia” określonymi czynnikami ryzyka².

Jednym z istotnych czynników, który determinuje rozwój zakażenia HCMV jest stan serologiczny dawcy oraz biorcy. Grupą pacjentów o najwyższym ryzyku rozwoju zakażenia i choroby są HCMV-seronegatywni biorcy (B-), którzy otrzymują narząd od HCMV-seropozytywnego dawcy (D+). W tej grupie biorców może rozwinąć się infekcja pierwotna będąca następstwem otrzymania narządu z latentną formą wirusa, nawet w przypadku wcześniej stosowanej profilaktyki. Reaktywacja latentnej postaci wirusa u HCMV-seropozytywnych biorców jest następstwem ekspozycji pacjenta na stosowane w terapii leki o działaniu immunosupresyjnym i/lub powodujące eliminację limfocytów T. W celu oceny ryzyka zakażenia należy sprawdzić u dawcy oraz biorcy obecność przeciwciał anti-HCMV IgG. Rozwój zakażenia u biorcy przeszczepu może być również skutkiem reaktywacji lub nadkażenia innym szczepem wirusa u HCMV-seropozytywnego biorcy. W obu przypadkach dochodzi do rozwoju infekcji wtórnej. Poznano dodatkowo kilka innych czynników ryzyka, które determinują rozwój choroby po transplantacji. Jednym z nich jest intensywność immunosupresji związana z interwencją terapeutyczną, której celem jest usunięcie limfocytów T. Ponadto biorcy określonych narządów, w tym płuca, jelita cienkiego, trzustki, obarczeni są znacznie wyższym ryzykiem rozwoju infekcji i choroby niż pacjenci po przeszczepieniu nerki czy wątroby. Na rozwój zakażenia wpływa również polimorfizm genetyczny w zakresie wrodzonej i nabytej odporności w zakresie genów dla receptorów typu Toll-like czy IL-12 p40. Zwraca się uwagę, iż HCMV pośrednio odpowiada za działanie immunomodulacyjne, co prowadzi do zwiększonej podatności pacjenta na rozwój infekcji oportunistycznych, z drugiej zaś skutkuje odrzuceniem przeszczepionego narządu lub jego trwałym uszkodzeniem. Tragicznym w skutkach powikłaniem jest przewlekła dysfunkcja alloprzeszczepu i niewydolność narządowa¹.

PROFILAKTYKA I LECZENIE ZAKAŻENIA HCMV PO TRANSPLANTACJI

U 90% biorców narządów litych, stwierdza się replikację HCMV w okresie 1-4 miesięcy po transplantacji. Zapobieganie zakażeniu HCMV u biorców przeszczepów narządowych polega na interwencji farmakologicznej. Sposób leczenia należy uzależnić od czynników prognozujących przebieg i postęp choroby. Jedną ze strategii terapeutycznych jest profilaktyka uniwersalna polegająca na włączeniu leczenia przeciwwirusowego od

momentu transplantacji. Aktualne wytyczne zalecają wdrożenie profilaktyki u pacjentów z grupy wysokiego ryzyka, w tym D+/R-, biorców: płuca, jelita cienkiego oraz trzustki³. Profilaktykę należy rozważyć również u chorych otrzymujących przeciwciała poliklonalne lub monoklonalne (ATG, OKT3, ALG), które wykazują silny wpływ na reaktywację HCMV⁴. Profilaktyka nie tylko zmniejsza częstość występowania choroby HCMV ale także efekty pośrednie na przeżycie biorców i przeszczepionych narządów. Inną formą zapobiegania zakażeniu jest terapia wyprzedzająca (*pre-emptive therapy*). Strategicznym celem terapii wyprzedzającej jest regularne monitorowanie u biorcy DNAemii HCMV DNA i włączenie leczenia w momencie pojawienia się aktywnej replikacji wirusa. Rozważenie wdrożenia profilaktyki lub terapii preemptywnej sugeruje się również w grupie pacjentów o umiarkowanym ryzyku rozwoju zakażenia HCMV, tj. D+/B+ lub D-/B+⁴. Bezwzględny wskazaniem do podjęcia interwencji terapeutycznej jest choroba HCMV z towarzyszącym jej zespołem objawów klinicznych.

Grupą leków stosowanych w profilaktyce oraz terapii preemptywnej są inhibitory wirusowej polimerazy DNA wymagające uprzedniej fosforylacji w komórce gospodarza. Należą do nich: gancyklowir oraz, prekursor gancyklowiru – walgancyklowir. Ostatni z leków, dostępny w Polsce tylko w postaci doustnej, charakteryzuje 10-krotnie większa biodostępność w porównaniu do doustnej postaci gancyklowiru. Pomimo dogodnej dla pacjenta formy aplikacji, lek wykazuje działanie nefrotoksyczne, teratogenne, powoduje neutropenię i trombocytopenię. Zgodnie z rekomendacjami opublikowanymi w 2011 roku u biorców wszystkich narządów lekiem I rzutu w terapii choroby CMV jest analog nukleozydowy – gancyklowir. U dorosłych biorców z ciężką postacią choroby, zapaleniem błony śluzowej przewodu pokarmowego, śródmiąższowym zapaleniem płuc i zapaleniem mózgu zaleca się dożylne leczenie gancyklowirem. Doustne leczenie walgancyklowirem zaleca się u dorosłych biorców z „zespołem” CMV o łagodnym i umiarkowanym przebiegu⁵. W leczeniu choroby CMV wskazana jest redukcja stopnia immunosupresji w zależności od ciężkości przebiegu, wielkości wirerii czy oporności na terapię. Oporność na gancyklowir jest coraz częściej obserwowana u biorców z ciężką dysfunkcją układu odpornościowego w przypadku wydłużonej ekspozycji na lek⁵. Mechanizm oporności na lek jest najczęściej wynikiem mutacji genu *CMV-UL97*. Skutkiem mutacji jest niedobór kinazy wirusowej warunkującej fosforylację leku do postaci aktywnej. Przyczyną oporności pozostaje także inna mutacja, indukowana w obrębie genu *CMV-UL54*, kodującego wirusową polimerazę DNA. Jej powstanie to najczęściej skutek kontynuacji leczenia nie terapeutycznymi dawkami gancyklowiru. Mechanizm oporności na walgancyklowir jest analogiczny jak dla gancyklowiru⁵.

W przypadku stwierdzenia genotypowej oporności na gancyklowir zastosowanie w terapii alternatywnej choroby HCMV znajdują dwa leki II rzutu – faskarnet oraz cidofowir. Poważną wadą obu leków jest jednak znaczna toksyczność, w tym neuro- i nefrotoksyczność, która „dotyka” około 30% pacjentów objętych terapią. Wystąpienie mutacji w genie *CMV-UL54* indukuje najczęściej krzyżową oporność na gancyklowir, cidofowir i faskarnet⁵. Oporność należy podejrzewać w przypadku narastania wirerii HCMV DNA lub nasilenia ciężkości choroby podczas trwającej dłużej niż 6 tygodni terapii optymalną dawką gancyklowiru. Valsamakis z Johns Hopkins Hospital w Baltimore¹ wyjaśnia, iż oporność przeciwwirusowa jest częściej obserwowana w grupie pacjentów wysokiego ryzyka, czyli



cobas e 601

· system
immunochemiczny
przeznaczony dla
średnich i dużych
laboratoriów



cobas® 6000

· zintegrowany system
biochemiczno-
immunochemiczny



cobas e 411

· system
immunochemiczny
przeznaczony dla
małych i średnich
laboratoriów

HCMV-seronegatywnych biorców otrzymujących narząd od HCMV-seropozytywnego dawcy i rozwija się u 5-10% biorców. Nabywanie oporności na gancyklowir może być także następstwem szeregu innych czynników ryzyka, za które uważa się wysoki poziom wirerii, wielokrotnie powtarzające się epizody choroby HCMV, suboptymalne stężenie leku w tkankach, wydłużoną terapię a także głębokie upośledzenie odporności u biorcy.

MONITOROWANIE SKUTECZNOŚCI LECZENIA ZAKAŻENIA HCMV

Monitorowanie terapii, z zastosowaniem leków hamujących replikację HCMV, jest możliwe dzięki dostępności do nowoczesnych i zalecanych obecnie metod diagnostyki HCMV. Wykorzystane metod molekularnych, szczególnie techniki RT PCR, umożliwia wykrycie aktywnej replikacji wirusa przed pojawieniem się objawów klinicznych. U pacjentów z objawami choroby cytomegalowirusowej, średnie stężenie HCMV DNA w próbkach krwi obwodowej pozostawało znacząco wyższe niż u biorców bezobjawowych i wynosiło odpowiednio 4800 kopii/ml oraz 500 kopii/ml DNA. U części biorców narządów litych pomimo braku symptomów choroby cytomegalowirusowej, dochodzi do replikacji DNA HCMV w zakresie niskich wartości stężeń od 43 do 3.8×10^4 kopii/ml⁶. Powyższe obserwacje sugerują iż w grupie pacjentów bezobjawowych, systematyczne monitorowanie wirerii w czasie jest zdecydowanie najważniejszym czynnikiem prognostycznym rozwoju choroby. W trakcie leczenia wyprzedzającego należy monitorować wiramię raz lub dwa razy w tygodniu. W leczeniu choroby HCMV należy monitorować ilościowo HCMV DNA w krwi pełnej lub w osoczu raz w tygodniu i stosować leczenie przeciwwirusowe do czasu zahamowania replikacji HCMV. Wciąż problematyczną pozostaje kwestia wyznaczenia optymalnego progu wirerii, przy którym należy rozpocząć terapię. U biorców narządów litych, HCMV-seropozytywnych, z grupy niskiego ryzyka zakażenia, „wartość odcięcia” wyznaczono na poziomie 3983 IU/ml (2600 kopii DNA/ml)⁷. W innych badaniach, istotny z punktu widzenia interwencji terapeutycznej próg wirerii, wyznaczono dla wartości 3000 kopii DNA/ml, w przypadku biorców organów litych, oraz na poziomie 1000 kopii/ml dla biorców przeszczepu szpiku kostnego⁶. Zdaniem wielu autorów, decyzja o interwencji terapeutycznej powinna być wypadkową kilku czynników. Za szczególnie istotne uważa się poziom wirerii monitorowanej w czasie oraz czułość metod diagnostycznych wykorzystywanych do wykrycia HCMV. Zgodnie z zaleceniami Polskiego Towarzystwa Transplantacyjnego dotyczącymi postępowania profilaktycznego i leczniczego w zakażeniu wirusem cytomegalii u biorców przeszczepów narządowych, do rekomendowanych metod należą antygenemia pp65 oraz oznaczenie HCMV DNA metodą ilościową (QNAT, *quantitative nucleic acid testing*) z wykorzystaniem polimerazowej reakcji łańcuchowej czasu rzeczywistego (*Real-time PCR*)⁸. W ostatnich badaniach wykazano znacznie wyższą czułość metody rt-PCR w porównaniu do antygenemii pp65 oraz relatywnie niski współczynnik korelacji pomiędzy metodami⁶. Podobne dane pochodzą z prezentacji Aleksandry Valsamakis przedstawionej na Międzynarodowym Sympozjum w Rzymie we wrześniu bieżącego roku¹. Czułość antygenemii pp65 oraz techniki *Real-time PCR* wyznaczono odpowiednio w zakresach 50-83% oraz 50-100%. Ponadto ocena antygenemii pp65 jest również trudna do przeprowadzenia u pacjentów z ciężką neutropenią. Stwierdzenie, „*Viremia and increases in viral load may be detected sooner by qPCR than by antigenemia*” niewątpliwie oddaje pierwszeństwo czulszym technikom molekularnym.

METODY POMIARU WIREMII

Poważnym problemem ostatnich lat pozostaje standaryzacja technik opartych na amplifikacji

kwasu nukleinowego (*NAT-based assays*). Uważa się, iż z powodu braku standaryzacji, wyniki otrzymywane przy pomocy testów opartych na technikach NAT, nie są powtarzalne. Przeprowadzona przez Pang i wsp.⁹ międzylaboratoryjna analiza porównawcza stężeń DNA HCMV potwierdziła te rozbieżności. Wykazano znamienne różnice pomiędzy wynikami pochodzącymi z różnych ośrodków w szerokim zakresie stężeń (od 2.0 log₁₀ do 4.3 log₁₀). W badaniach wykorzystano panel próbek dostarczonych do 33 laboratoriów w USA, Kanadzie i Europie. Według autorów, jedną z przyczyn takich rozbieżności jest dostęp do różnych, komercyjnych oraz walidowanych wewnętrznie w samej pracowni testów diagnostycznych przeznaczonych do monitorowania liczby kopii DNA HCMV w czasie. Dotychczas, poszczególne zestawy diagnostyczne podlegały kalibracji względem prawnie zastrzeżonych standardów. Niestety, różnice wynikające z zastosowania, w poszczególnych laboratoriach wirusologicznych, procedur i technik molekularnych, pozbawionych jednolitej standaryzacji, były i są powodem tworzenia „własnych” algorytmów postępowania, zarówno w zakresie leczenia pacjenta, jak i monitorowania replikacji DNA HCMV. Zwraca się uwagę, iż ilościowe monitorowanie DNA HCMV w czasie, powinno odbywać się przy użyciu tego samego zestawu diagnostycznego z zachowaniem określonych parametrów w zakresie limitu detekcji DNA, jak i szerokiego zakresu dynamiki. Taki pomiar umożliwiłby monitorowanie wirerii z zachowaniem powtarzalnych parametrów reakcji, a w konsekwencji powtarzalnej, ilościowej oceny wirusowego DNA. Mając na uwadze różnice pomiędzy poszczególnymi testami i jej wpływ na rzetelność wyników najważniejszym stał się postulat globalnej standaryzacji testów do diagnostyki *in vitro*, wykorzystujących amplifikację kwasu nukleinowego. W roku 2008 powstał raport Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), w którym po raz pierwszy przedstawiono cele i znaczenie standaryzacji odpowiadające wymaganiom stawianym technikom opartym na amplifikacji kwasów nukleinowych¹⁰. Zaproponowano pilną potrzebę opracowania międzynarodowego standardu (*1st WHO International Standard*) dla CMV DNA jako „Gold Standard” dla metod molekularnych. Ponadto, jak wynika z raportu, wprowadzenie międzynarodowego standardu pozwoliłoby opracować ujednolicony system raportowania wyników stężeń HCMV DNA w jednostkach międzynarodowych, International Unit (IU), stworzyłoby podstawy kalibracji standardów oraz umożliwiłoby ocenę porównawczą wyników stężeń materiału genetycznego HCMV generowanych przy pomocy dostępnych zestawów diagnostycznych. Idea stworzenia przez WHO międzynarodowego standardu, zaowocowała organizacją badań wieloośrodkowych, które umożliwiły weryfikację i ocenę rekomendowanego przez WHO standardu (*NIBSC code 09/162*). Zaproponowany standard został wykorzystany po raz pierwszy, w celu standaryzacji technik opartych na amplifikacji kwasu nukleinowego ludzkiego wirusa cytomegalii¹¹. Wyniki badań, które raportowano z 32 laboratoriów znajdujących się w 14 krajach, pozwoliły jednoznacznie określić *1st WHO International Standard*. Jest nim szczep Merlin wirusa HCMV o stężeniu 5x10⁶ International Units/mL (IU/mL) uzyskiwanego po rekonstytucji liofilizatu w 1 ml dejonizowanej, pozbawionej nukleaz wody. Wartość 5x10⁶ IU/mL (6,7 log₁₀) została uznana jako swoistego rodzaju konsensus wśród wyników oznaczeń ilościowych, które generowano w poszczególnych laboratoriach z zastosowaniem różnych testów i platform diagnostycznych.

Aktualnie, pierwszy międzynarodowy standard WHO jest dostępny komercyjnie i dystrybuowany przez *National Institute for Biological and Control* w Wielkiej Brytanii (NIBSC code: 09/162). Preparat występuje pod postacią liofilizatu równoważnego



COBAS AmpliPrep/ COBAS TaqMan 48

· automatyczny system do ilościowego badania CMV DNA z wykorzystaniem testu standaryzowanego względem 1st International Standard.



COBAS® AmpliPrep/ COBAS® TaqMan®

· pełna automatyzacja ilościowego oznaczania CMV DNA i raportowania wyników w IU/mL.

1 mL HCMV w 10 mM buforu Tris-HSA (pH 7,4) oraz 0,5% roztworu albuminy ludzkiej¹². Fiolki zawierające liofilizowany standard powinny być przechowywane w temperaturze -20°C. Pierwszy międzynarodowy standard dla ludzkiego wirusa cytomegalii umożliwi standaryzację zestawów diagnostycznych, opartych na technikach ilościowych wykorzystujących amplifikację kwasu nukleinowego. Ponadto, będzie możliwe obliczenie współczynnika konwersji (*conversion factor*) swoistego dla określonej matrycy DNA, na przykład krwi pełnej, osocza lub surowicy oraz metody ekstrakcji/amplifikacji z zastosowaniem odpowiedniej platformy diagnostycznej. Współczynnik konwersji będzie podstawą do przeliczenia wyników stężeń DNA HCMV, dotychczas raportowanych w kopiach/ml, na równoważną wartość wyrażoną w jednostkach międzynarodowych (IU/ml). Zastosowanie pierwszego międzynarodowego standardu WHO dla CMV QNAT prawdopodobnie przyczyni się do wzrostu powtarzalności wyników w zakresie stężeń HCMV DNA generowanych w różnych laboratoriach diagnostycznych. Dostępny komercyjnie pierwszy międzynarodowy standard opracowany przez *WHO Expert Committee on Biological Standardization*, obliuguje poszczególne laboratoria do standaryzacji własnych zestawów diagnostycznych wykorzystujących ilościowe metody amplifikacji DNA.

Z drugiej strony, zwraca się uwagę, iż dostępność do testów, do diagnostyki *in vitro*, zróżnicowanych pod względem metod ekstrakcji, rodzaju próbki, zakresu liniowości, limitu detekcji oraz wykrywanej sekwencji docelowej, jest powodem poważnych rozbieżności w zakresie interpretacji, jak i powtarzalności wyników¹³. Rozwiązaniem istniejących problemów może okazać się dostępny komercyjnie test COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan CMV Test (CAP/CTM CMV test; Roche Molecular Systems), w którym po raz pierwszy zastosowano kilka standardów i kontroli w celu zapewnienia zgodności z pierwszym międzynarodowym standardem WHO dla CMV QNAT¹⁴. Primery oraz sondy oligonukleotydowe wykorzystane w teście są swoiste względem konserwatywnego regionu genomu HCMV - genu UL54, kodującego wirusową polimerazę DNA. Standardy, zastosowane podczas opracowywania testu, obejmowały standard WHO dla wirusa HCMV, drugorzędowy standard RMS, materiał źródłowy drugorzędowego standardu RMS (szczep wirusa CMV AD169) oraz panel kalibracyjny RMS (Lambda CMV1.2). Standardy, panel kalibracyjny oraz niezależna próbka kliniczna wirusa HCMV badane przy podobnych stężeniach, wykazały współliniowość względem pierwszego międzynarodowego standardu WHO. Standaryzacja testu CAP/CTM CMV względem standardu WHO, pozwala raportować wyniki stężeń HCMV DNA zarówno w jednostkach międzynarodowych/ml oraz kopiach /ml (1 kopia = 0,91 IU). Przeprowadzona przez Hirsch i wsp.¹⁴ międzynarodowa, wieloośrodkowa analiza porównawcza stężeń DNA HCMV, z wykorzystaniem testu CAP/CTM CMV wykazała dużą zgodność w zakresie oznaczeń ilościowych HCMV DNA oraz powtarzalność wyników. Uzyskane dane jednoznacznie wskazują na potrzebę kontynuacji badań, z wykorzystaniem testu CAP/CTM CMV, w celu opracowania ujednoliconych algorytmów postępowania z pacjentem po przeszczepie.

W szczególności miałyby one dotyczyć wyznaczenia optymalnego *cut-off* dla stężeń HCMV DNA, oraz oceny częstości z jaką należy monitorować biorcę w okresie po przeszczepowym. Uzyskane wyniki stanowiłyby wytyczne przy podejmowaniu decyzji terapeutycznych oraz ocenie ryzyka rozwoju zakażenia i choroby wirusem cytomegalii.

Immunohistochemiczne wykrywanie mutacji ALK w rakach niedrobnokomórkowych płuca

Renata Langfort, Zakład Patomorfologii, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, Warszawa

Rak płuca jest jednym z najczęściej rozpoznawanych nowotworów złośliwych. Każdego roku na świecie wykrywa się ok. 1,35 miliona nowych przypadków zachorowań. W Polsce, z powodu raka płuca umiera blisko 21 tys. osób rocznie – tyle, ile wynosi liczba mieszkańców średniej wielkości miasta, natomiast na świecie ok. 1,4 mln. Tylko 15% pacjentów w momencie rozpoznania choroby kwalifikuje się do zabiegu chirurgicznego. Dla zdecydowanej większości osób, ze względu na stopień zaawansowania nowotworu, jedyną szansą leczenia pozostaje konwencjonalna chemio- i/lub radioterapia, przedłużająca czas życia chorych zaledwie o kilka miesięcy.

NOWA KLASYFIKACJA RAKA NIEDROBNOKOMÓRKOWEGO PŁUCA OPARTA NA BADANIACH MOLEKULARNYCH

Do niedawna, największe znaczenie w wyborze leczenia zaawansowanych postaci raka płuca miało odróżnienie postaci raka drobnokomórkowego od niedrobnokomórkowego, natomiast podtyp raka niedrobnokomórkowego (NSCLC – *non-small cell carcinoma*) nie był istotny, gdyż nie wpływał na wybór rodzaju chemioterapii. Rozwój biologii molekularnej, wykrycie mutacji biorących udział w powstawaniu i progresji raka płuca oraz wprowadzenie terapii celowanej, spowodowały radykalne zmiany w podejściu do rozpoznawania i klasyfikacji NSCLC. W zaawansowanych postaciach raka, nie tylko typ (niedrobnokomórkowy vs drobnokomórkowy), ale również podtyp NSCLC (gruczolowy vs płaskonabłonkowy), okazały się ważnymi czynnikami zarówno rokowniczymi, jak i predykcyjnymi, które pozwalają przewidywać możliwość wystąpienia mutacji w komórkach raka i wyodrębnić grupę chorych, która mogłaby odnieść korzyść z leczenia ukierunkowanego molekularnie.

W rakach gruczolowych (ADC – *adenocarcinoma*), również budowa morfologiczna nowotworu może być cenną wskazówką informującą o możliwości wystąpienia mutacji. Dominujące utkanie tapetujące, brodawkowate, drobnobrodawkowate bądź zrazikowe, częściej kojarzą się z występowaniem mutacji aktywującej kinazę tyrozynową receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR – *epidermal growth factor receptor*), natomiast raki o budowie łitej, a zwłaszcza śluzowej wykazują mutację w genie KRAS.

Obecnie, w każdym przypadku, zwłaszcza zaawansowanej postaci NSCLC, konieczne stało się wykonywanie testów pozwalających na identyfikację zaburzeń molekularnych w komórkach nowotworowych. Dotychczas najistotniejsze znaczenie miało wykrycie obecności mutacji EGFR, najbardziej wiarygodnego czynnika predykcyjnego odpowiedzi na leczenie inhibitorami kinazy tyrozynowej.

W ostatnim czasie nowym celem molekularnym stał się szlak kinazy chłoniaka anaplastycznego (ALK – *anaplastic lymphoma kinase*).

ALK należy do rodziny insulinowego receptora kinazy tyrozynowej, który prawidłowo wykazuje ekspresję w rozwijającym się układzie nerwowym. Zaburzenia związane z genem ALK są wykrywane w wielu różnych nowotworach, przede wszystkim w chłoniakach anaplastycznych z dużych komórek B (ALCL – *anaplastic large cell lymphoma*), w rozlanych chłoniakach z komórek B, w guzach zapalnych, jak również w rakach płaskonabłonkowym przełyku, anaplastycznych tarczycy, w rakach nerki, w białaczkach szpikowej, w niektórych postaciach raka piersi i w raku jelita grubego.

W 2007 roku stwierdzono występowanie rearanżacji w genie ALK w NSCLC, będącej następstwem fuzji dwóch genów ALK i EML4 (*echinoderm microtubule-associated protein-*



Aparat BenchMark ULTRA

· system kolejnej generacji do automatycznego barwienia metodą IHC/ISH



Aparat BenchMark GX

· system do automatycznego barwienia metodą IHC/ISH



Aparat BenchMark XT

· system do automatycznego barwienia metodą IHC/ISH

like 4). W warunkach prawidłowych obydwie znajdują się na przeciwległych końcach tego samego krótkiego ramienia chromosomu 2p. W wyniku wewnątrzchromosomalnej inwersji zachodzącej w obrębie chromosomu 2p dochodzi do fuzji obu genów i powstania chimerycznego (fuzyjnego) białka EML4-ALK. Wynikiem fuzji EML4-ALK jest stała aktywacja szlaku przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego, stymulacja proliferacji komórek nowotworu i hamowanie apoptozy.

Obok najczęściej występującej rearanżacji EML4-ALK, w NSCLC pojawiają się również inne rodzaje translokacji w genie ALK (TFG-ALK, KIF5B-ALK, KLC1-ALK), które jednak nie mają istotnego wpływu na decyzję o leczeniu.

Częstość występowania genu fuzyjnego EML4-ALK ocenia się na 2-8% wśród chorych na ADC, a według niektórych doniesień nawet do 17%, niezależnie od płci.

Wyjątkowo rzadko mutacja ALK współistnieje z mutacjami EGFR lub KRAS.

Chorzy, u których stwierdza się rearanżację ALK są zwykle młodszy od pozostałych pacjentów z pierwotnym rakiem płuca, na ogół należą do osób nie palących lub mało palących (≤ 10 paczkalet). Nieprawidłowości w genie ALK mogą pojawiać się w ADC płuca o różnej budowie morfologicznej, ale głównie dotyczą postaci o utkaniu litym, zawierających komponent sygnetowatokomórkowy, śluzowy, bądź o morfologii zrazikowej, sitowatej, jak również brodawkowatej.

WYKRYWANIE MUTACJI GENU ALK

Wykrycie występowania mutacji ALK, zwłaszcza w postaciach zaawansowanych raka płuca staje się coraz istotniejsze, przede wszystkim w związku z wprowadzeniem do leczenia kryzotynibu, inhibitora aktywności kinazy ALK.

Obecnie jedynym zwalidowanym testem oceniającym status ALK w NSCLC płuca jest metoda fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ, czyli FISH (*fluorescence in situ hybridization*), której celem jest ocena integralności genu ALK. Metoda FISH (*dual-labeled break-apart*) wykorzystuje sondy DNA z fluorescencyjnymi barwnikami, które umożliwiają wykrywanie rearanżacji ALK znajdujących się na chromosomie 2. Zielony sygnał fluorescencyjny pojawia się w pobliżu regionu 5'ALK, zaś czerwony bezpośrednio w okolicy 3'ALK. Położenie obydwu sygnałów blisko siebie świadczy o prawidłowej kopii genu ALK, natomiast ich rozdzielenie lub pojedynczy sygnał czerwony przemawiają za występowaniem rearanżacji. Za dodatni przyjmuje się wynik, w którym co najmniej 15% jąder komórek nowotworowych, spośród przynajmniej 50 policzonych w badanym materiale, emituje intensywny sygnał.

Mimo, że metoda FISH w ocenie występowania rearanżacji ALK w NSCLC jest rekomendowana przez FDA (*Food and Drug Administration*), CAP (*College of American Pathologists*), IASLC (*International Association for the Study of Lung Cancer*) i AMP (*Association for Molecular Pathology*), coraz częściej podkreśla się minusy związane z jej stosowaniem.

Przede wszystkim walidacja dotyczy wycinków, utrwalonych w formalinie i zatopionych w blokach parafinowych, natomiast nie obejmuje rozmazów cytologicznych, które stanowią ogromną część materiału diagnostycznego. Zarówno płyn utrwalający, jak i czas utrwalania istotnie wpływają na jakość wykonywanych testów. Preparaty nie są trwałe i po pewnym czasie sygnał ulega zanikowi, uniemożliwiając ponowną ocenę.

Konieczny jest właściwy wybór nie tylko wycinka, ale także wytypowanie odpowiedniego utkania morfologicznego, które byłoby najbardziej miarodajne dla wystąpienia mutacji w genie ALK i pozwalałoby na uzyskanie wiarygodnych wyników. Istotna jest umiejętność

oceny testu FISH, gdyż rearanżacje wewnątrzchromosomalne mogą prowadzić do niewielkiego rozdziału sygnału, interpretowanego fałszywie jako wynik ujemny. Przyjęty arbitralnie odstęp większy niż średnica 2 sygnałów, wskazujący na obecność genu fuzyjnego EML4-ALK wymaga dużego doświadczenia ze strony osoby oceniającej wynik. W ocenie testów dotyczących rearanżacji ALK niezbędny jest udział nie tylko biologa molekularnego, ale również doświadczonego patomorfologa.

Wreszcie, podkreśla się wysokie koszty metody, związane z wykorzystywaniem znakowanych sond, konieczność stosowania mikroskopu fluorescencyjnego oraz ograniczenie dostępu do badania, które jest wykonywane w niewielu ośrodkach, co może wpływać na opóźnienie wykonania testu i tym samym odpowiedniego leczenia. Metodą, która mogłaby być alternatywą dla FISH, a przynajmniej pozwalałaby na wstępny wybór chorych z NSCLC z prawdopodobną mutacją ALK jest diagnostyka immunohistochemiczna (IHC).

Badania IHC są tańsze, szybsze i prostsze w wykonaniu oraz bardziej dostępne niż FISH, są możliwe do przeprowadzenia w każdym zakładzie patomorfologii dysponującym pracownią immunohistochemiczną. Nie wymagają dodatkowego wyposażenia w postaci mikroskopu fluorescencyjnego, a interpretacja wyników jest dużo łatwiejsza. Dodatnia reakcja dłużej utrzymuje się w preparacie mikroskopowym, co w przypadku jakichkolwiek wątpliwości, pozwala na ponowną ocenę wycinków.

Badania IHC można wykonywać zarówno w materiale tkankowym, utrwalonym i zatopionym w bloczkach parafinowych, jak również cytologicznym.

Problemem natomiast pozostaje wybór odpowiedniego przeciwciała IHC.

Stężenie białka z rearanżacją ALK w NSCLC jest względnie małe. Dotychczas używane przeciwciała, skuteczne w wykryciu nieprawidłowości w genie ALK w ALCL, w NSCLC mogą być mało przydatne. Najprawdopodobniej różnica ta jest związana z mniejszą aktywnością transkrypcyjną promotora EML4 w porównaniu z NPM (*nucleophosmin*), który bierze udział w fuzji NPM-ALK w ALCL.

Obecnie dostępne są trzy klonów przeciwciała anti-ALK: ALK1, 5A4 i D5F3. Doświadczenie z dwoma pierwszymi jest najdłuższe. O ile wszystkie charakteryzują się podobną swoistością, sięgającą od 97% dla ALK1, 98% dla 5A4 i 99% dla D5F3, wyraźnie różnią się czułością. Najmniej czułe jest przeciwciała anti-ALK1 (67%), natomiast najbardziej czułe D5F3 (100%), które wykazuje pozytywną wartość predykcyjną sięgającą 96% i negatywną 100%.

Przeciwciała D5F3 zawiera również system detekcji i amplifikacji, ułatwiające wykrycie niewielkich ilości zmutowanego białka ALK w NSCLC. Pojawienie się silnego, ziarnistego zabarwienia cytoplazmy komórek nowotworowych, w niektórych przypadkach również z podkreśleniem błony komórkowej jest uważane za dodatni odczyn. Każdy odsetek komórek nowotworowych wykazujący intensywną reakcję z przeciwciałem przeciwko D5F3 jest uznawany za wynik pozytywny. Ocena IHC nie wymaga określania liczby komórek nowotworowych wykazujących dodatnią reakcję, natomiast istotne jest odróżnienie nieswoistych odczynów oraz wybarwienia specyficznych elementów tkankowych. Interpretację wyników ułatwia wykonywanie w każdym przypadku równoległej negatywnej i dodatniej kontroli.

Stosowanie innych klonów zwykle wymaga półilościowej oceny występującej reakcji, ale za wynik pozytywny również uważa się drobnoziarniste zabarwienie cytoplazmy komórek raka. Ocena IHC, podobnie jak FISH, wymaga przestrzegania zasad utrwalenia materiału i wyboru



Aparat BenchMark ULTRA

· system kolejnej generacji do automatycznego barwienia metodą IHC/ISH



Aparat BenchMark GX

· system do automatycznego barwienia metodą IHC/ISH



Aparat BenchMark XT

· system do automatycznego barwienia metodą IHC/ISH

odpowiedniego skrawka, zawierającego możliwie najlepiej zachowany fragment nowotworu. Wycinki należy utrzymywać w roztworze 10% zbuforowanej formaliny, przez co najmniej 6 godzin, ale nie dłużej niż 48 godzin, natomiast mniejsze, kilkumilimetrowe, wymagają odpowiednio krótszego czasu utrwalania, jednak nie mniej niż 4 godziny.

WYKRYWANIE MUTACJI W RAKU NIEDROBNOKOMÓRKOWYM PŁUCA – ZALECENIA EKSPERTÓW

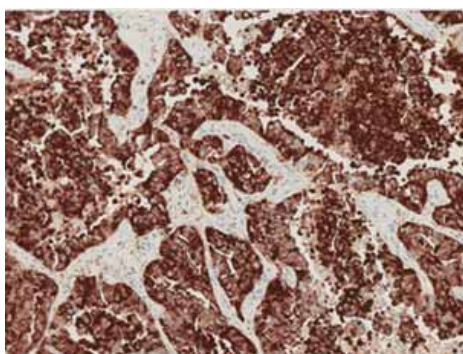
Zgodnie z ostatnio przedstawionymi przez CAP, IASLC i AMP rekomendacjami dotyczącymi oceny występowania mutacji EGFR i ALK w NSCLC, wskazane jest wykonywanie IHC, przed testem FISH, ale konieczna jest dokładna walidacja badania. Diagnostyka IHC może być stosowana jako metoda skriningowa umożliwiającą wyodrębnienie grupy chorych, u których należy przeprowadzić badanie FISH w celu potwierdzenia lub wykluczenia rearanżacji genu ALK.

Proponowany algorytm zaleca wykonywanie testu FISH, w przypadkach, w których badaniem IHC stwierdza się dodatnią reakcję z przeciwciałem przeciwko ALK, niezależnie od jej intensywności i rozległości. Negatywna reakcja IHC wskazuje na brak rearanżacji ALK w komórkach raka i nie wymaga potwierdzenia testem FISH.

Dotychczasowe badania podkreślają 100% zgodności pomiędzy reakcją IHC i testem FISH w przypadkach negatywnych wyników, jak również silnej, pozytywnej reakcji IHC i dodatniego testu FISH. Różnice dotyczą przede wszystkim sytuacji, w których reakcja IHC jest słaba lub umiarkowana.

Wydaje się, że w każdym przypadku, zwłaszcza zaawansowanego NSCLC odpowiadającego ADC lub NOS (*not otherwise specified*) należy nie tylko zabezpieczyć materiał do dalszych badań molekularnych, ale również wykonywać reakcję IHC z przeciwciałami anti-ALK, w celu wstępnej oceny obecności rearanżacji ALK.

Barwienie immunohistochemiczne
z przeciwciałem anti-ALK (D5F3)



Nasz adres:
Roche Diagnostics Polska Sp. z o.o.
ul. Wybrzeże Gdyńskie 6B
01-531 Warszawa

centrala: tel. 22 481 55 55, 56
faks 22 481 55 99
call center: tel. 22 481 54 54
e-mail: dia.callcenterpl@roche.com

obsługa klienta: tel. 22 481 54 00-05
faks 22 481 55 96
e-mail: polska.diagnostics@roche.com
internet: www.roche.pl

COBAS i LIFE NEEDS ANSWERS są znakami
towarowymi należącymi do Roche
©2013 Roche Diagnostics

Przygotowanie do druku:
TAMKAPRESS