



Nr
55

ISSN 1644-8448
nakład: 1000 egz.

LabForum



cobas[®]
Life needs answers



Szanowni Państwo,

Roche wprowadza na rynek nowy test Elecsys Calcitonin służący do diagnozowania i monitorowania nowotworów tarczycy, który poszerza ofertę markerów nowotworowych możliwych do oznaczania na analizatorach cobas e, Elecsys oraz Modular Analytics.

Nowy test służy do diagnozowania raka rdzeniastego tarczycy oraz monitorowania leczenia u pacjentów po operacji tarczycy. Kalcytonina jest ważnym markerem nowotworowym, który może pomóc specjalistom we wczesnej diagnozie raka rdzeniastego tarczycy, ponieważ zwiększenie jej stężenia we krwi ma związek z nowotworem tego typu i rozwojem choroby. Kalcytonina jest istotnym elementem oceny medycznej, szczególnie, gdy objawy podmiotowe występujące u pacjenta nie są typowe. Wraz z innymi badaniami oznaczenia kalcytoniny wspomagają ostateczne rozpoznanie kliniczne. Pacjenci mogą być leczeni we wcześniejszej fazie choroby, co zwiększa szanse ich przeżycia i wyleczenia.

Rak rdzeniasty tarczycy jest trzecim co do częstości występowania rodzajem raka tarczycy (5-10% wszystkich przypadków). Leczenie zazwyczaj obejmuje chirurgiczne usunięcie gruczołu tarczycowego, a następnie trwające do końca życia monitorowanie pacjenta (oznaczanie stężenia kalcytoniny zwykle co sześć miesięcy) w celu wczesnego wykrycia ewentualnej remisji.

Zachęcam Państwa do lektury bieżącego numeru LabForum, w którym znajdują się artykuły na temat przydatności oznaczeń HE4, CA 125 oraz algorytmu ROMA w diagnostyce raka jajnika, ginekologicznej diagnostyki histopatologicznej oraz komentarz do Rekomendacji KIDL w zakresie diagnostyki wzw typu C, a także informacje o nowych rozwiązaniach w oznaczeniach glikemii.

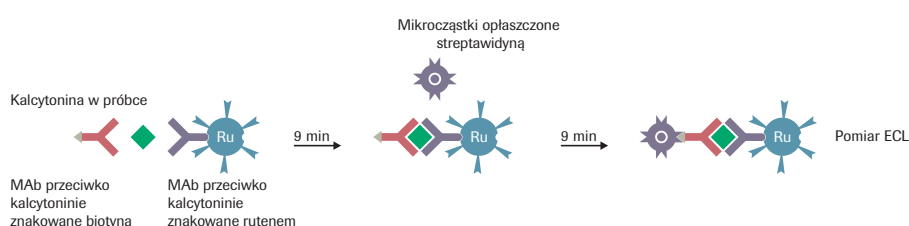
Z poważaniem,

Tomáš Petr

Spis treści:

Oznaczanie HE4, CA 125 i algorytm ROMA w diagnostyce i różnicowaniu guzów jajnika	3
Diagnostyka laboratoryjna zakażeń wirusem zapalenia wątroby typu C	6
p16 w ginekologicznej diagnostyce histopatologicznej	11
Accu-Chek Active Monitorowanie glikemii w obecności maltozy	13

SCHEMAT REAKCJI OZNACZANIA KALCYTONINY



Oznaczanie HE4, CA 125 i algorytm ROMA w diagnostyce i różnicowaniu guzów jajnika

Prof. Ewa Nowak-Markwitz

Klinika Onkologii Ginekologicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu

Guzy jajnika są często obserwowane wśród kobiet zgłaszających się do badania ginekologicznego. Nieznane są precyzyjne dane epidemiologiczne określające wskaźniki ich występowania, ponieważ nie ustalono dotychczas definicji guza jajnika. Szczególnie, w dobie powszechnego wykonywania badań ultrasonograficznych narządów płciowych zaobserwowanie zmiany cystycznej (torbielowatej) w jajniku nie jest niczym niezwykłym. Trudno arbitralnie ustalić granice wielkości zmiany uważanej za guz jajnika, ale uważa się, że zmiana przekraczająca 25–30 mm średnicy, utrzymująca się przez trzy kolejne cykle miesięczkowe powinna być uznana za guz. Dla rozpoznania ważna jest też dynamika obserwowanej zmiany, dlatego że w czasie cyklu miesięczkowego jajnik ulega ciągłym przemianom i czasem pęcherzyk jajnikowy lub ciało żółte mogą przekraczać 30 mm. Seryjne obserwacje w kolejnych cyklach pozwalają na weryfikację zmiany i jej właściwą kwalifikację jako zmianę czynnościową, fizjologiczną lub guz.

Guzy jajnika mają bardzo zróżnicowaną morfologię, ponieważ jajnik jest strukturą zbudowaną z wielu różnych grup komórek i każda z nich może być punktem wyjścia rozwijającego się guza. Makroskopowo guzy jajnika mogą być cystyczne (torbielowate), lite lub mieszane cystyczno-lite. W badaniu histologicznym guzy mogą być złośliwe, o granicznej złośliwości oraz niezłośliwe. Najczęściej występują zmiany cystyczne, niezłośliwe. W okresie rozrodczym kobiety są to torbiele folikularne, lutealne, tekaluteinowe, krwotoczne, endometrialne, przyjajnikowe, jajowodowe, torbielakogruczolak surowicze i śluzowe. Guzy lite, to przede wszystkim nowotwory złośliwe, ale także guzy niezłośliwe takie jak: potworniaki, włókniaki, cięże ektopowe czy torbiele endometrialne. Te ostatnie ukazują się jako lite w badaniu ultrasonograficznym, choć w rzeczywistości są torbielą z zawartością płynnej krwi.

OPEROWAĆ CZY OBSERWOWAĆ?

Guzy jajnika leczymy operacyjnie. Zgodnie z rekomendacjami Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego do natychmiastowej operacji kwalifikują się guzy duże, powyżej 6 cm średnicy, guzy sprawiające dolegliwości, głównie bólowe oraz te, podejrzane o złośliwy proces nowotworowy. Diagnostyka przedoperacyjna guzów jajnika jest łatwa i zarazem trudna. Bez problemu wykrywamy je w badaniu ultrasonograficznym, ale ustalenie, operować czy obserwować, szczególnie w przypadku niewielkich zmian jest prawie niemożliwe. Jednak nierozpoznanie procesu złośliwego może mieć fatalne skutki dla chorej. Decyzję o dalszym postępowaniu powinno się podjąć w oparciu o szereg danych, do których należą wywiad lekarski, spostrzegane objawy, wyniki badania klinicznego, obrazowego i badań biochemicznych, należy także uwzględnić doświadczenie lekarza i preferencje pacjentki. Dwa badania są niezwykle przydatne w różnicowaniu guzów jajnika. Są to przezpochwowa ultrasonografia oraz badania markerów nowotworowych w surowicy.

BADANIE ULTRASONOGRAFICZNE

Badanie ultrasonograficzne pozwala na ocenę lokalizacji zmiany, jej wielkości oraz ocenę jej obrazowej morfologii. Duże nadzieje wiązano właśnie z morfologiczną oceną guza widocznego w ultrasonografii. Wraz z rozwojem technologicznym sprzętu opracowano szereg wskaźników, które miały za zadanie określić prawdopodobieństwo procesu złośliwego w obserwowanej zmianie. Jednak mimo wielu badań przeprowadzonych w dużych populacjach nie udało się jednoznacznie określić pewnych cech złośliwości guzów jajnika i swoistość tej metody jest nadal niezadowolająca. W ostatnich latach



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

w dwóch dużych badaniach populacyjnych jednoznacznie wykazano, że ultrasonografia nie jest przydatna w wykrywaniu wczesnych postaci raka jajnika, czyli nie może być zastosowana w badaniach przesiewowych.

MARKERY NOWOTWOROWE

Inaczej przedstawia się sytuacja biochemicznych markerów nowotworowych. Są to substancje produkowane przez nowotwór lub przez inne komórki w odpowiedzi na rozwijający się guz, które są uwalniane do krążenia w ilości wystarczającej do ich wykrycia. Ich pojawienie się w surowicy lub wzrost stężenia wskazuje na prawdopodobieństwo rozwoju nowotworu. Idealny marker powinien się charakteryzować 100% czułością, swoistością i dodatnią wartością predykcyjną rozpoznania raka. Znanych jest ponad 100 różnych substancji obecnych w surowicy, które mogłyby stać się potencjalnymi markerami procesu nowotworowego w jajniku. Niewiele z nich znajduje zastosowanie w praktyce klinicznej, przede wszystkim ze względu na brak odpowiednio dużych badań weryfikujących ich przydatność. Praktyczne znaczenie ma tylko CA 125 oraz ostatnio wprowadzony do praktyki klinicznej antygen HE4.

CA 125

CA 125 jest glikoproteiną, która ulega ekspresji w strukturach pochodzących z pierwotnej jamy ciała, czyli w komórkach mezotelialnych. Nie wykazano ekspresji CA 125 w nabłonku jajników. Jako górną granicę normy stężenia u kobiet zdrowych przyjmuje się 35 U/mL. Wartość ta została wyznaczona arbitralnie na podstawie wyników badań klinicznych. U kobiet po menopauzie i po histerektomii stężenie antygenu jest niższe i sugeruje się, aby u nich uznawać, jako górną granicę normy 20 U/mL–26 U/mL. U około 85% chorych na raka jajnika stężenie CA 125 jest wyższe niż 35 U/mL, ale tylko u połowy chorych w I stopniu klinicznego zaawansowania. Stężenie tego markera rzadko wzrasta w pewnych typach histologicznych raka jajnika (rak śluzowy, jasnokomórkowy) i w guzach granicznych. Jednak szereg chorób nie mających związku z procesem złośliwym także manifestuje wzrost stężenia markera. Należą do ich: niezłośliwe guzy jajnika, endometrioza, mięśniaki macicy, marskość wątroby, choroby zapalne miednicy oraz stany fizjologiczne takie, jak miesiączka i ciąża.

Wykazano niewystarczającą czułość i swoistość CA 125 do wczesnego wykrywania raka jajnika, czyli różnicowania widocznych w badaniu ultrasonograficznym niedużych guzów. Oznaczanie stężenia CA 125 jest przydatne u chorych, u których: w badaniu klinicznym i ultrasonograficznym podejrzewamy raka jajnika, w czasie prowadzenia chemioterapii i w monitorowaniu po leczeniu. Wzrost stężenia markera po zakończonym leczeniu wskazuje na nawrót choroby, przy czym wzrost ten wyprzedza pojawienie się objawów klinicznych o około 3 miesiące.

HE4 (ANG. HUMAN EPIDIDYMIS PROTEIN 4)

Drugą glikoproteiną, z którą wiąże się szczególne nadzieje na lepsze różnicowanie guzów jajnika jest HE4. Fizjologicznie, białko to wydzielają komórki nabłonkowe najądrza, ale też ulega ograniczonej ekspresji w komórkach błony śluzowej kanału szyjki macicy, endometrium i błonie śluzowej jajowodów oraz oskrzeli. Również nie stwierdza się jego obecności w prawidłowym nabłonku pokrywającym jajnik, natomiast występuje w dużej

ilości w obrębie kortykalnych torbieli inkluzyjnych jajnika wyścielonych metaplastycznym nabłonkiem Müllerskim. W raku jajnika wykazano nadekspresję HE4, co nie zależy od stopnia zaawansowania nowotworu, lecz od jego typu histologicznego. Jako górną granicę normy przyjmuje się wartości od 92 do 121 pmol/L, w zależności od wieku oraz statusu menopauzalnego. Biologiczna funkcja białka HE4 nie jest znana. Czułość markera u kobiet z rakiem jajnika jest porównywalna z CA 125, ale stężenie HE4 lepiej różnicuje chore z niezłośliwymi guzami przydatków, gdzie stężenie CA 125 też może być podwyższone. Wzrost stężenia jest także obserwowany u chorych w raku płuca, trzustki, piersi i rakach z komórek przejściowych.

RÓŻNICOWANIE ZŁOŚLIWYCH I NIEZŁOŚLIWYCH GUZÓW JAJNIKA - ALGORYTM ROMA (ANG. RISK OF OVARIAN MALIGNANCY ALGORITHM)

Algorytm ROMA jest modelem matematycznym stworzonym w celu oceny ryzyka nowotworu złośliwego u kobiet z guzami przydatków. Model uwzględnia wartości połączonych stężeń CA 125 i HE4 oraz status menopauzalny. Jest obliczany według następujących wzorów:

dla kobiet przed menopauzą: $PI = -12,0 + 2,38 \times \ln(HE4) + 0,0626 \times \ln(CA\ 125)$

dla kobiet po menopauzie: $PI = -8,09 + 1,04 \times \ln(HE4) + 0,732 \times \ln(CA\ 125)$.

Wyliczenie wartości ROMA:

$$\text{wartość ROMA (\%)} = \frac{e^{PI}}{1 + e^{PI}} \times 100$$

PI – wskaźnik predyktywny

wartość ROMA (%) – prawdopodobieństwo predyktywne

LN – logarytm naturalny

e – podstawa logarytmu naturalnego

Jeśli rozpoznajemy guz jajnika to ryzyko raka jest niskie, jeśli wyliczona wartość ROMA jest mniejsza niż 29,9% (dla kobiet po menopauzie) oraz mniejsza niż 11,4% (dla kobiet przed menopauzą). Do obliczeń służą specjalnie przygotowane linijki oraz kalkulatory internetowe – dostępne na stronie: <http://romatools.he4test.com>.

Wykazano w badaniach, że oba markery mogą wskazywać na rozwój raka jajnika już w jego wczesnej postaci. Zwykle obserwuje się wtedy powolny, ale stały wzrost ich stężeń, także w zakresach przyjętych norm biochemicznych. Takie chore wymagają szczególnej uwagi klinicznej, ponieważ wzrost stężenia markerów (CA 125, HE4 i mezoteliny) rozpoczyna się już 3 lata przed rozpoznaniem raka.

W 2012 roku opublikowano wyniki badań nad zastosowaniem nowego testu do wykrywania raka jajnika – testu OVA 1. Test uzyskał korzystne rekomendacje FDA. Mierzy w surowicy 5 markerów: CA 125, apolipoproteinę A1, beta 2 mikroglobulinę, prealbuminę oraz transferynę. U chorych na raka jajnika stężenia CA 125 i beta2 mikroglobuliny wzrastają a pozostałe trzy markery uzyskują wartości niższe, niż u zdrowych kobiet. Test ma wysoką czułość (96%) i wysoką negatywną wartość predykcyjną (98%).



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

Diagnostyka laboratoryjna zakażeń wirusem zapalenia wątroby typu C

Prof. dr hab. med. Kazimierz Madaliński, Kierownik Pracowni Immunopatologii Zakażeń Hepatotropowych Zakładu Wirusologii NIZP-PZH

KOMENTARZ DO REKOMENDACJI KIDL 2012/2013

Idea przygotowania tych Rekomendacji wyszła od Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych. Pani Prezes KIDL była autorem zasadniczej konstrukcji opracowania, tj. zasad ogólnych, klasyfikacji badań, zaleceń dotyczących spraw technicznych (tj. zlecenia badania laboratoryjnego), pobierania i przygotowania materiału do badań, transportu materiału i przyjmowania materiału do badań, wymagań dotyczących stosowanej aparatury i testów diagnostycznych, zapewnienia jakości badań laboratoryjnych, formułowania i wydawania wyników oraz zgłaszania wyników inspekcji sanitarnej.

Dobrano następnie Zespół składający się zarówno z diagnostów, jak i lekarzy klinicystów. Powołany Zespół Ekspertów* przygotował kolejne ważne elementy Rekomendacji, tj. wstęp dotyczący zakażeń wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV), metody badawcze, algorytm postępowania diagnostycznego, badanie przesiewowe: anti-HCV i uzupełniające: HCV RNA, oznaczenie genotypu HCV oraz polimorfizm genu interleukiny 28B. Zasadniczym elementem zaleceń stał się *Algorytm postępowania diagnostycznego HCV*, prowadzący od badania anti-HCV w surowicy, przez badanie HCV-RNA testami o czułości wykrywania ≤ 25 IU/ml, do oznaczenia wirerii, tj. ilościowego HCV RNA i genotypu HCV. Te trzy ostatnie badania odbywają się na zlecenie klinicysty i w czasie przez niego wskazanym. Wstępne badanie anti-HCV, aby uznać wynik badania za dodatni, odbywa się do otrzymania próbki reaktywnej w powtórzonem dwukrotnie badaniu. Dodatni wynik badania anti-HCV jest formułowany wyłącznie, gdy próbka jest powtarzalnie reaktywna.

Algorytm badań podlegał intensywnej dyskusji, co prowadziło do kolejnych ulepszeń; ostateczny jego kształt zaprezentowano na rycinie (str 9). Po pierwszym przygotowaniu tekstu odbyło się spotkanie Ekspertów, którzy pokonując początkowe rozbieżności, doprowadzili do ustalenia wspólnego stanowiska. Punktem, który budził duże kontrowersje w Zespole przygotowującym Rekomendacje, była konieczność dwukrotnego powtórzenia próbki wstępnie reaktywnej, zaś otrzymanie choć jednego wyniku dodatniego w tych powtórzeniach kwalifikuje tę próbkę jako dodatnią (reaktywną). Konieczność takiej procedury podkreślana jest przez wszystkich producentów testów. Oznacza to, że testy immunochemiczne anti-HCV, tak jak inne testy tego typu – nie odznaczają się najwyższą swoistością, a w każdym razie generują wyniki fałszywie dodatnie. Dążenie do zwiększenia czułości testów anti-HCV obniżyło ich swoistość, co potwierdzają obliczenia teoretyczne. W każdym razie, deklarowana swoistość testów anti-HCV, na poziomie 98,5-99,6% odnosi się wyłącznie do kwalifikowania próbek „powtarzalnie reaktywnych” jako dodatnie. Zastosowanie powtórzonego badania próbki, aż do uzyskania wyniku podwójnie dodatniego jest niezwykle ważne. Procedura taka była w Polsce używana przez całą Służbę Krwi. Ma to swoje implikacje praktyczne: przeprowadzone wg tych zasad pierwsze studium epidemiologiczne rozpowszechnienia anti-HCV w Polsce doprowadziło to stwierdzenia, że możemy tę częstość określić na 0,95%, a nie 1,9%, jak to dotychczas przyjęto (Godzik i wsp. 2012). Ponadto, częstość przeciwciał anti-HCV, standaryzowana do pełnoletniej populacji polskiej, wynosi 0,86%.

Parę słów trzeba poświęcić testowi *Western blot* (RIBA). Ma on duże zastosowanie w innych zakażeniach wirusowych i spełnia pozytywną rolę. Jednak w zakażeniach HCV nie posuwa on diagnostyki naprzód, w porównaniu z prawidłowo oznaczonymi przeciwciałami

* Skład Zespołu Ekspertów:
Kazimierz Madaliński, Elżbieta Puacz, Piotr Grabarczyk, Bogdan Mazur, Bogdan Solnica, Robert Flisiak, Waldemar Halota, Krzysztof Tomaszewicz

anty-HCV. Dlatego właściwym i istotnym zastosowaniem testu RIBA jest sprawdzenie, czy próbka, która była powtarzalnie reaktywna na anty-HCV, lecz ujemna w reakcji PCR, zawiera rzeczywiście swoiste przeciwciała (patrz - rycina na str. 9). Inny problem, związany z reakcją RIBA, polega na otrzymaniu wyniku „nieokreślony” (*indeterminate*), w przypadku którego badanie należy powtórzyć po 3 tygodniach. Oznacza to utratę tempa diagnostyki.

W tekście Rekomendacji nazewnictwo: próbka reaktywna (dodatnia) oraz niereaktywna (ujemna) zostało użyte w odniesieniu do wyników testów anty-HCV i HCV RNA. Wynika to m.in. z nomenklatury używanej w Unii Europejskiej. Parę słów o sposobie formułowania wyników: w wypadku badania przeciwciał anty-HCV informujemy o wyniku ujemnym (próbka niereaktywna) lub wyniku dodatnim (próbka reaktywna). Algorytm postępowania diagnostycznego HCV przedstawia w skrócie poszczególne etapy badania. Zarówno badanie HCV RNA, jak i badanie genotypu HCV odbywają się na żądanie klinicysty i we wskazanym przez niego czasie. Jest to zgodne z praktyką w większości krajów europejskich. Wspólnie określono wymaganą czułość testu HCV RNA na ≤ 25 IU/ml.

Należy przy tej okazji zwrócić uwagę na prawidłowe używanie określeń: „kontakt z wirusem HCV” i „zakażenie HCV”. Wytworzenie przeciwciał anty-HCV w organizmie immunokompetentnym świadczy o „kontakcie z wirusem” i rozwinięciu odporności humoralnej. Zdolności tej pozbawione są dzieci z pierwotnymi niedoborami odporności (zwłaszcza humoralnej) i chorzy z wtórnym niedoborem odporności (zwłaszcza zakażeni HIV). W odróżnieniu od kontaktu z wirusem, stan zakażenia organizmu określamy jako wykrycie obecności HCV RNA (przy danej czułości testu). W związku z tym, nie należy używać terminu „osoba zakażona” w stosunku do osób posiadających przeciwciała anty-HCV, ponieważ tylko u części z nich wykrywamy zakażenie. Warto o tym wspomnieć, bo te pojęcia są mylone.

Pewne niuanse oznaczeń serologicznych i biologii molekularnej zasługują na uwagę. Przy badaniu przeciwciał anty-HCV trzeba pamiętać o okresie wczesnego zakażenia wirusem, kiedy jest zjawisko „okienka serologicznego”, tj. niewytworzenia przeciwciał na skutek niedostatecznego upływu czasu od zakażenia. Przeciwciała biernie przeniesione przez zakażone HCV matki na noworodki trwają w ich krążeniu ~18 mies. Z kolei, „rozstrojenie immunologiczne” kobiety ciężarnej prowadzi do wzrostu miana autoprzeciwciał, które mogą powodować błędną interpretację badania anty-HCV (wyniki fałszywie dodatnie). Jeśli chodzi o czas przetrwania przeciwciał, wykazano, że zakażenie wirusem HCV u osoby immunokompetentnej prowadzi do przetrwania przeciwciał anty-HCV do 18 lat po zakażeniu. W ostatnich trzech latach, obok badań anty-HCV w surowicy, wchodzi na rynek testy bibułkowe na próbkę śliny (www.orasure.com), które mają równie wysoką czułość i swoistość, jak testy serologiczne, a odczyt następuje w ciągu 20–40 min.

W odniesieniu do biologii molekularnej trzeba dodać, że Rekomendacje obejmują badania HCV RNA w surowicy. Należy pamiętać, że wiramia w surowicy może być na niskim poziomie (ale otrzymujemy wynik dodatni); może też być przerywana, a potem znów powracać. Fluktuacje wirerii są bardzo charakterystyczne dla zakażenia HCV. W związku z tym szereg ośrodków prowadzi już oznaczenia HCV RNA w następnym źródle materiału od pacjenta, tj. z komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC); co jest niewątpliwym



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

uzupełnieniem testu serologicznego. Badania M. Radkowskiego, T. Laskusa i ich amerykańskich kolegów wskazują, że wyniki dodatnie testu PBMC są wyraźnie częstsze niż w równolegle badanej surowicy.

ZALECENIA PRAKTYCZNE:

- Formułowanie wyniku laboratoryjnego

	Wynik	Objaśnienie wyniku
Badanie anty-HCV		
1.	Próbka niereaktywna (ujemna)*	Nie wykryto obecności przeciwciał anty-HCV w badanej próbce
2.	Próbka reaktywna (dodatnia)*	Wykryto obecność przeciwciał anty-HCV w badanej próbce
Badanie HCV-RNA		
3.	Próbka niereaktywna (ujemna)	Nie wykryto obecności HCV-RNA w badanej próbce
4.	Próbka reaktywna (dodatnia)	Wykryto obecność HCV-RNA w badanej próbce
5. Materiał źle przechowywany lub źle dostarczony		Nie wykonano badania

* Niektóre testy immunochemiczne (np. Anti-HCV Roche II Elecsys; Access HCV BioRad) dają wynik 0,9-1,0 (signal/cut off), tj. w szarej strefie. Próbkę taką należy powtórzyć dwukrotnie, a jeżeli choć jeden wynik powtórzenia będzie w szarej strefie lub powyżej „cut-off” – próbkę należy uznać za dodatnią.

- Rolą diagnosty jest czuwanie nad prawidłowością wykonania oznaczeń w laboratorium, a także odpowiednia interpretacja wyniku badań.
- Istnieje obowiązek kierownika laboratorium zgłoszenia danych chorego, u którego potwierdzono zakażenie HCV – odpowiedniej terytorialnie placówce Państwowej Inspekcji Sanitarnej. W tym celu należy wypełnić i przesłać „Formularz zgłoszenia zachorowania (podejrzenia zachorowania) na chorobę zakaźną”.

1 Test immunodiagnostyczny

– oznaczenia HCV na platformie **cobas®**

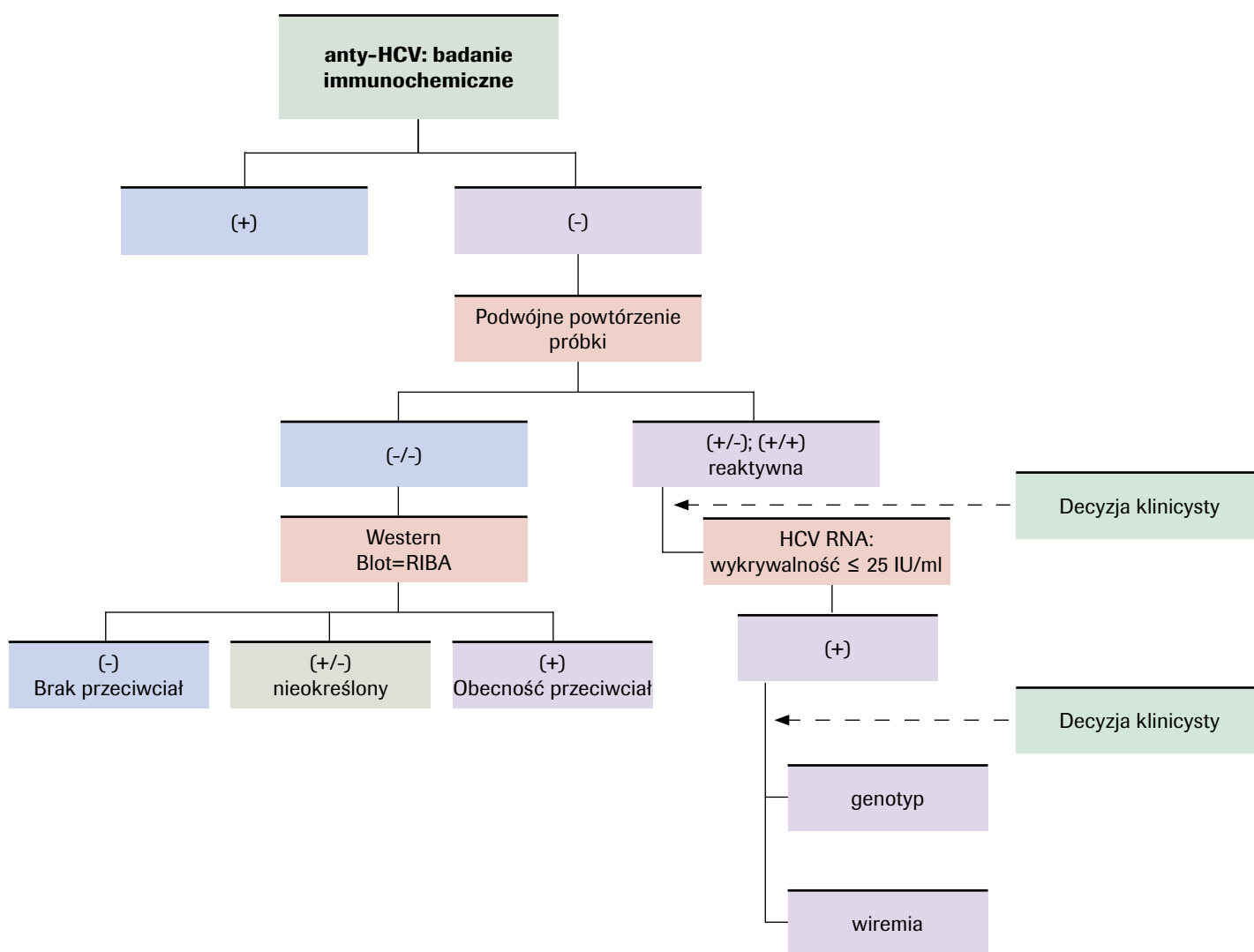
2 System COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®

– system przeznaczony do potwierdzenia aktywnego zakażenia testem jakościowym HCV RNA wykrywającym od 15 IU/ml oraz monitorowanie miana wirusa testem ilościowym o zakresie liniowości od 15 IU/mL do 1×10^8 IU/mL



Rekomendacje są pierwszym dokumentem dotyczącym HCV, powstałym w wyniku zgodnej współpracy diagnostów i klinicystów. „Rekomendacje 2012/2013: Diagnostyka laboratoryjna zakażeń wirusem zapalenia wątroby typu C” ukażą się wkrótce na łamach „Diagnostyki Laboratoryjnej”, czasopisma Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej. Planowane jest także umieszczenie tych zaleceń na stronie internetowej Ministerstwa Zdrowia (www.mz.gov.pl).

ALGORYTM POSTĘPOWANIA DIAGNOSTYCZNEGO W KIERUNKU ZAKAŻENIA HCV



p16 w ginekologicznej diagnostyce histopatologicznej

*dr n.med Szymon Wojtylak, Laboratorium Patomorfologii Klinicznej,
Uniwersyteckie Centrum Kliniczne, Gdańsk*

Zakażenie wirusem ludzkiego brodawczaka (HPV) z grupy tzw. wysokiego ryzyka odgrywa istotną rolę w patogenezie raka szyjki macicy, pochwy i sromu. Z klinicznego punktu widzenia kluczowe znaczenie ma wczesne wykrywanie tych nowotworów na etapie zmian przedinwazyjnych definiowanych, jako neoplazja wewnątrz nabłonkowa (intraepithelial neoplasia-IN). Modelowym przykładem takiego podejścia jest diagnostyka raka szyjki macicy obejmująca profilaktyczne badania cytologiczne, uzupełnione o kolposkopię i ocenę histologiczną pobranych wycinków. Histologiczny podział neoplazji wewnątrz nabłonkowej na poszczególne stopnie (IN1, IN2, IN3) oparta jest na ocenie morfologii zmiany w preparacie barwionym rutynowo hematoxyliną i eozyną. Na tym etapie diagnostyki podstawowe znaczenie prognostyczne ma właściwa selekcja zmian będących wynikiem zakażenia typami HPV należącymi do grupy wysokiego ryzyka nowotworzenia (IN2 lub IN3). Ocenę poszczególnych przypadków utrudnia morfologiczne podobieństwo obrazów neoplazji wewnątrz nabłonkowej do szeregu zmian reaktywnych. Należą do nich zmiany reaktywne nabłonka płaskiego związane z zapaleniem, niedojrzała metaplasja płaskonabłonkowa, zmiany zanikowe, zmiany po radioterapii oraz naśladujące obraz neoplazji zmiany nienabłonkowe spotykane w utkaniu fragmentów tkankowych w wyskrobinach.

Cennym uzupełnieniem diagnostyki histologicznej stanów przednowotworowych w szczególności szyjki macicy stały się metody immunohistochemiczne. Markery Ki-67 oraz Pro-Ex-C znalazły zastosowanie w różnicowaniu reaktywnych zmian nabłonkowych ze wszystkimi stopniami neoplazji wewnątrz nabłonkowej oraz w diagnostyce różnicowej zmian zanikowych i zmian typu IN2 i IN3. Czynnikiem znacząco ograniczającym wartość diagnostyczną jest fakt, że silna ekspresja tych markerów występuje w złuszczonych nabłonkach z obrazem zmian reaktywnych, co może prowadzić do nadinterpretacji wartości odczynu i błędnego rozpoznania stanu przednowotworowego. Ponadto, ekspresja tych markerów nie daje odpowiedzi na podstawowe z prognostycznego punktu widzenia pytanie: czy podłożem ocenianych zmian jest zakażenie typem wirusa z grupy wysokiego ryzyka neoplazji czy nie?

Poznanie mechanizmów komórkowych zaburzeń molekularnych towarzyszących infekcji HPV umożliwiło rozwój nowych, bardziej swoistych metod diagnostycznych pomocnych w rozpoznawaniu zmian przednowotworowych w nabłonku płaskim szyjki macicy, pochwy i sromu. Wprowadzono szereg testów, w tym metody immunohistochemiczne, umożliwiające identyfikację poszczególnych podtypów wirusa HPV. Metody te jednak nie różnicują infekcji w formie episomalnej od przypadków, gdzie doszło do integracji wirusowego genomu z DNA zainfekowanej komórki, co jest warunkiem koniecznym dla procesu transformacji nowotworowej.

Nowe możliwości w diagnostyce neoplazji wewnątrz nabłonkowych szyjki otworzyło przeciwciało anti-p16. Białko supresorowe p16 (INK4A) należy do rodziny inhibitorów cyklozależnych kinaz (CDK), które biorą udział w regulacji cyklu komórkowego. Mutacje genu kodującego białko p16 występują w części przypadków czerniaka, raka przełyku i raka trzustki. Ujawniające się po zintegrowaniu z DNA zainfekowanej komórki białkowe produkty genów wirusów HPV wysokiego ryzyka E6 i E7 mają zdolność inaktywowania białek p53 oraz Rb, kluczowych w procesie proliferacji komórkowej. Status komórkowy białka p16 jest

uzależniony od poziomu białka Rb. Jego inaktywacja prowadzi do zwiększonej akumulacji p16 w komórce, co można wykazać barwieniem immunohistochemicznym z użyciem przeciwciała anti-p16.

Jak pokazują liczne opracowania, białko p16 charakteryzuje się największą czułością w wykrywaniu neoplazji wewnątrznowotworowych zależnych od infekcji wirusami brodawczaka z grupy wysokiego ryzyka. Należy jednak podkreślić, że białko to nie jest markerem dla wirusa HPV wysokiego ryzyka, lecz markerem identyfikującym produkt infekcji z jego udziałem. Metoda ta umożliwia różnicowanie zmian wywołanych wirusami wysokiego i niskiego ryzyka nowotworzenia. Należy jednak pamiętać, że oceny ekspresji powinno się dokonywać w ścisłej korelacji z morfologią zmiany. Użycie przeciwciała p16 nie wyklucza stosowania innych markerów takich jak Ki-67 lub Pro-Ex-C, co więcej, można je wykorzystać, jako element wspólnego panelu diagnostycznego. Intensywność i umiejscowienie reakcji ujawnia różnice w zależności od typu ocenianych zmian. Neoplazje wewnątrznowotworowe wywołane infekcją wirusem HPV wysokiego ryzyka prezentują intensywną, rozlaną reakcję, natomiast intensywność barwienia w zmianach typu IN1 lub odczynowych jest wyraźnie słabsza z ogniskowym charakterem reakcji. Miejsce wystąpienia reakcji precyzyjnie koreluje z obszarem objętym neoplazją wewnątrznowotworową, co ułatwia stopniowanie zmian.

Obiecującym obszarem do stosowania p16 jest diagnostyka cytologiczna zmian przednowotworowych szyjki macicy. Metoda użyta w tym celu umożliwia różnicowanie zmian komórkowych wywołanych infekcją typem wirusa niskiego i wysokiego ryzyka, jak również może być pomocna w określeniu rzeczywistego stanu atypowych komórek nabłonka płaskiego o nieokreślonym znaczeniu (ASC-US) lub takich, u których nie można wykluczyć obecności zmian dużego stopnia (ASC-H). Algorytm postępowania w rozpoznaniu ASC-US przewiduje powtórzenie badania cytologicznego po upływie sześciu miesięcy, natomiast w przypadku rozpoznania ASC-H wymaga badania kolposkopowego z pobraniem wycinków. Selekcja rozpoznań fałszywie pozytywnych na poziomie badania cytologicznego może w pierwszym przypadku wyeliminować stres pacjentek związany z oczekiwaniem na wynik powtórnego badania, a w drugim uniknąć kosztów związanych z wykonaniem niepotrzebnych procedur.

Aktualne zalecenia CAP/ASCCP zalecają stosowanie przeciwciała p16 jako referencyjnej metody do diagnozowania HPV-zależnych płaskonabłonkowych zmian przednowotworowych okolic anogenitalnych (srom, pochwa, szyjka macicy, prącie, moszna). Sformułowane w protokole algorytmy ograniczają zastosowanie oznaczania p16 do następujących sytuacji:

1. kategoryzacja statusu przednowotworowego neoplazji typu IN2,
2. diagnostyka różnicowa pomiędzy zmianami typu IN2 i IN3
3. rozstrzyganie przypadków wątpliwych diagnostycznie przy założeniu, że w kręgu różnicowym rozważane jest rozpoznanie zmiany przednowotworowej w stopniu IN2 lub IN3.

Protokół CAP/ASCCP nie zaleca użycia przeciwciała p16 jako metody potwierdzającej rozpoznanie zmian jednoznacznych morfologicznie tj. IN1 lub IN3. Zastosowanie



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

przeciwciała anty-p16 w zmianach szyjki typu CIN2 ma na celu wyeliminowanie rozpoznań fałszywie pozytywnych. Silna i uogólniona reakcja z użyciem przeciwciała p16 ostatecznie kategoryzuje zmianę, jako przednowotworową, co determinuje decyzję terapeutyczną. Pozwala to ona ograniczenie liczby wykonywanych w przypadku CIN2 procedur konizacji lub resekcji pętlowych szyjki macicy.

Należy zwrócić uwagę, że zalecenia CAP/ASCCP ograniczają się jedynie do zastosowania barwienia p16 w diagnostyce zmian płaskonabłonkowych. Zasadnym wydaje się jednak rozszerzenie, zakresu stosowania tej metody do różnicowania zmian w nabłonku gruczołowym szyjki macicy. Zmiany przedinwazyjne typu adenocarcinoma in situ (AIS) szyjki macicy stanowią bardzo trudny problem diagnostyczny i w opinii wielu autorów są często przeoczone. Ponadto, dane z piśmiennictwa wskazują, że zmiany typu AIS mogą współistnieć z wewnątrz nabłonkową neoplazją w nabłonku płaskim nawet w 30% przypadków. Użycie anty-p16 może być pomocne w rozpoznaniu imitujących obraz AIS przypadków nasilonej atypii reaktywnej nabłonka gruczołowego, prezentowanej w stanach zapalnych szyjki macicy oraz obszarach ektopii gruczołowych. Ponadto barwienie na p16 może być cennym uzupełnieniem panelu immunohistochemicznego dla wykrycia pierwotnego raka gruczołowego szyjki macicy, pomocnym w różnicowaniu tego nowotworu z pierwotnym rakiem gruczołowym trzonu macicy, jak również w określeniu pierwotnego punktu wyjścia raka gruczołowego w ogniskach przerzutowych.

Innym potencjalnym celem zastosowania anty-p16 może być diagnostyka różnicowa zmian drobnogruczołowych w nabłonku szyjki i macicy, szczególnie trudnych do oceny w materiale wyskrobinowym. Przykładem może tu być powszechnie znany w patologii ginekologicznej problem różnicowania rozrostu drobnogruczołowego endocervix z drobnogruczołowym wariantem raka śluzotwórczego endometrium. Rozrost drobnogruczołowy endocervix cechuje zmiennie intensywna, jednakże stała ekspresja p16, co ułatwia właściwe typowanie tych trudnych diagnostycznie zmian.

Wiele z potencjalnych zastosowań testu na obecność p16 znalazło już miejsce w rekomendowanych algorytmach diagnostycznych. Niektóre opracowania naukowe wskazują jednak na konieczność wypracowania ujednoliconej metody standaryzacji oceny ekspresji reakcji z anty-p16. Nie zmienia to jednak faktu, że białko p16 jest najczulszym ze stosowanych markerów do oceny zmian przed i nowotworowych wywołanych infekcją typami wirusa HPV wysokiego ryzyka. Wymienione w niniejszym artykule możliwości wykorzystania przeciwciała p16 promują ten marker, jako cenne narzędzie w ginekologicznej diagnostyce histopatologicznej.

Accu-Chek Active

Monitorowanie glikemii w obecności maltozy

Najwyższymi priorytetami dla Roche Diabetes Care są dokładność pomiarów i bezpieczeństwo pacjentów. W związku z tym na przełomie marca i kwietnia 2013 w Polsce zostały wprowadzone do obrotu testy paskowe Accu-Chek **Active** z ulepszoną, zaawansowaną reakcją chemiczną. Obecnie system do monitorowania glikemii Accu-Chek **Active** może być bezpiecznie używany u osób:

- leczonych przy zastosowaniu środków zawierających maltozę, która jest obecna w niektórych preparatach immunoglobuliny oraz
- leczonych metodą dializy otrzewnowej z zastosowaniem roztworów zawierających ikodekstrynę, takich jak roztwór dializacyjny EXTRANEAL™.

Opakowanie testów paskowych z zaawansowanymi rozwiązaniami chemicznymi Accu-Chek **Active** jest oznaczone zielonym prostokątem,  który informuje, że obecność maltozy nie ma klinicznie istotnego wpływu na testy.

Opracowano na podstawie materiałów własnych Roche



1 Przykłady opakowań testów paskowych Accu-Chek Active z zaawansowanymi rozwiązaniami chemicznymi

TESTY PASKOWE ACCU-CHEK ACTIVE Z ZAAWANSOWANYMI ROZWIĄZANIAMİ CHEMICZNYMI

Dzięki wykorzystaniu molekularnych technik klonowania firma Roche Diabetes Care wyprodukowała enzym Mut. Q-GDH2. Dzięki temu enzymowi pacjenci, u których stosowane są leki zawierające maltozę lub terapia prowadząca do jej wytworzenia, mogą być pewni, że pomiar stężenia glukozy będzie prawidłowy.

Test paskowy Accu-Chek **Active** mierzy glikemię wykorzystując metodę fotometrii. Po nałożeniu kropli krwi na test paskowy zmodyfikowana dehydrogenaza glukozy utlenia glukozę. Podczas reakcji równoważniki produktów redukcji są przekazywane do mediatora i wskaźnika, który zmienia kolor. Ta mierzona fotometrycznie zmiana zabarwienia odpowiada stężeniu glukozy obecnej w próbce krwi.



Accu-Chek Active
· aparat do samodzielnego monitorowania glikemii

INTERFERENCJA WYWOŁANA MALTOZĄ

Fizjologicznie maltoza nie występuje we krwi. Spożyta maltoza jest w jelicie hydrolizowana do glukozy przed wchłanianiem. Maltoza pojawia się we krwi pacjentów otrzymujących pozajelitowo leki, które ją zawierają, takie jak niektóre preparaty immunoglobulin. Ponadto ikodekstryna, używana w płynach dializacyjnych, gdy jest podawana pozajelitowo, co ma miejsce przy podawaniu śródtrzewnym w trakcie dializy otrzewnowej, ulega przemianie do małych polimerów glukozy (cząsteczki maltozy (G2), maltotriozy (G3) i maltotetrazy (G4)). W testach ze związkami chemicznym podatnymi na wpływ maltozy polimery te są błędnie interpretowane jako glukoza.

STĘŻENIA MALTOZY ISTOTNE KLINICZNIE

Przeprowadzono badania kliniczne, których celem była ocena potencjalnych stężeń maltozy w osoczu przy zastosowaniu różnych terapii. Ponieważ maltoza nie występuje w osoczu krwi w znaczących poziomach jako wynik diety, odpowiednie badania oceniały:

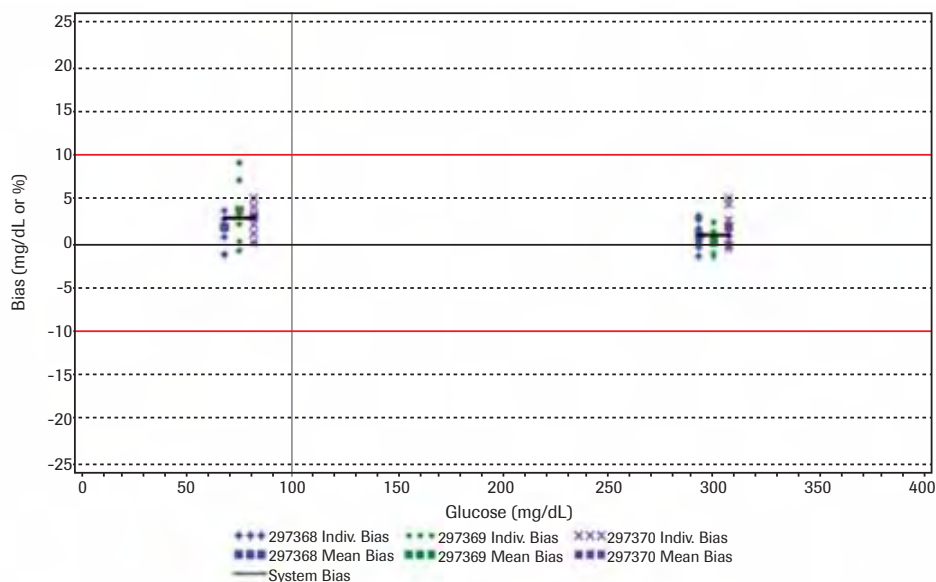
- dożylne podanie maltozy osobom z prawidłową czynnością nerek
- zastosowanie roztworów do dializy otrzewnowej zawierających ikodekstrynę (np. EXTRANEAL™).

WYNIKI UZYSKANE PRZY UŻYCIU TESTÓW PASKOWYCH ACCU-CHEK ACTIVE Z ZAAWANSOWANYMI ROZWIĄZANAMI CHEMICZNYMI

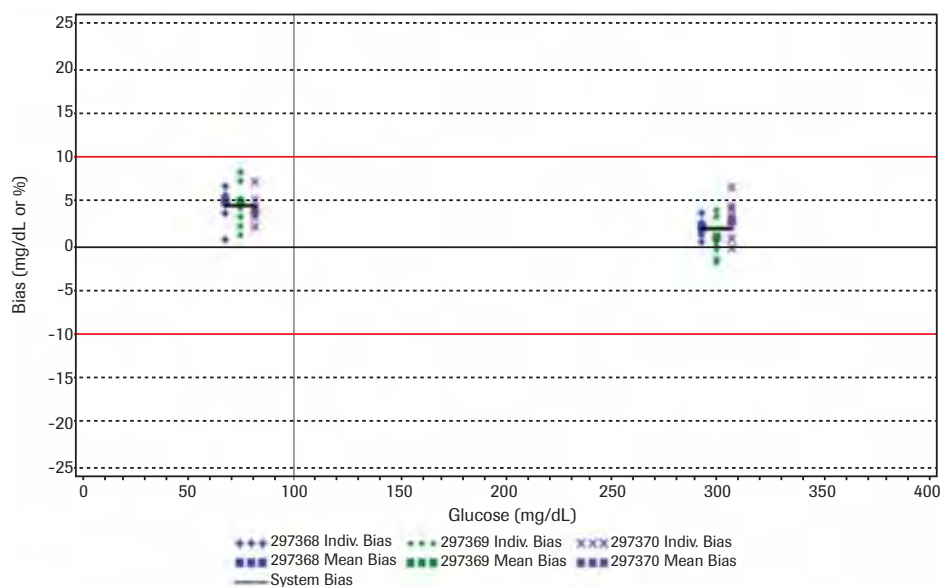
Aby przedstawić charakterystykę zaawansowanych rozwiązań chemicznych, na testy paskowe Accu-Chek **Active** nałożono krew zawierającą 360 mg/dl maltozy (10,5 mmol/L). Test przeprowadzono wykorzystując trzy reprezentatywne partie testów Accu-Chek **Active** (Mut. Q-GDH 2).

Do testu przygotowano próbki heparynizowanej krwi żyłnej z wartościami hematokrytu natywnego na poziomie 41–46% oraz dwoma różnymi stężeniami glukozy (50–100 mg/dl oraz 200–350 mg/dl, zgodnie z proponowanymi poprawkami do normy EN ISO 15197 (ISO/DIS 15197:2011)).

Każda próbka oznaczana była jednokrotnie na dziesięciu glukometrach za pomocą każdej serii testów paskowych. Puste próbki zawierające tylko rozpuszczalnik dla roztworu maltozy (0,9% NaCl) oznaczano również jednorazowo na dziesięciu glukometrach dla każdej serii testów paskowych. Pomiary wykonywano zarówno przy nakładaniu próbki krwi na test umieszczony w aparacie jak również przy nakładaniu próbki krwi poza glukometrem. Dla każdego stężenia glukozy obciążenie indywidualne, średnie obciążenie dla serii testów (n=10) i obciążenie systemowe we wszystkich 3 seriach pasków (n=30) w stosunku do wartości odniesienia (średnia wyników analogicznej ślepej próby) zostały obliczone i zaznaczone na rycinie 2 (test paskowy w aparacie) oraz rycinie 3 (test paskowy poza aparatem). Dane z badań własnych.



2 Systemowe obciążenie,
 średnie obciążenie dla serii
 i obciążenie indywidualne
 — maltoza, 360 mg/dl, test
 w aparacie



3 Systemowe obciążenie,
 średnie obciążenie dla serii
 i obciążenie indywidualne
 — maltoza, 360 mg/dl, test
 poza aparatem



Accu-Chek Active
 · aparat do samodzielnego
 monitorowania glikemii

WNIOSKI

W związku z poprawą swoistości testy paskowe Accu-Chek **Active** z wykorzystaniem zaawansowanych rozwiązań chemicznych wolnych od wpływu maltozy mogą być stosowane przez pacjentów przyjmujących leki zawierające maltozę lub poddanych terapii wytwarzającej maltozę. Pacjenci ci otrzymają wiarygodne wyniki pomiaru stężenia glukozy z właściwą dokładnością.



System cobas b 101

Oznaczanie hemoglobiny glikowanej i profilu lipidowego.

Udowodniona wartość medyczna wyniku.



Wyjątkowy, przenośny system cobas b 101 do monitorowania ryzyka związanego z cukrzycą oraz współistniejącej dyslipidemii i chorób układu krążenia.



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