



ISSN 1644-8448
nakład: 1000 egz.

LabForum



cobas[®]
Life needs answers



Szanowni Państwo,

Chciałbym poinformować o wprowadzeniu na rynek podwójnego testu nowej generacji do wykrywania parwowirusa B19 i wirusowego zapalenia wątroby typu A na rynkach uznających oznakowanie CE.

Test cobas® DPX jest już dostępny do stosowania w systemie cobas® 6800/8800 – poszerza on portfolio najnowszych platform diagnostyki molekularnej Roche służących do badań przesiewowych dawców krwi. Cobas® DPX jest testem PCR w czasie rzeczywistym. Pełni rolę podwójnego testu do ilościowego oznaczania B19 (parwowirusa B19) oraz wykrywania wirusa zapalenia wątroby typu A (HAV) w osoczu ludzkim. Stosowanie testów amplifikacji kwasów nukleinowych (NAT), w celu wykrywania tych wirusów, jest ważnym etapem w zapewnieniu bezpieczeństwa produktów leczniczych pochodzących z krwi, jej składników i osocza.

Dzięki wykorzystaniu testu cobas® DPX, ośrodki pobierające krew i osocze (Regionalne Centra Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa) są w stanie szybko zidentyfikować i usunąć jednostki zakażone HAV, jednocześnie minimalizując ilość parwowirusa B19 w pulach osocza przeznaczonego do frakcjonowania (dopuszczony maksymalny limit wirusa w próbce wynosi 10 000 IU/ml). Wykonanie NAT testem cobas® DPX podnosi skuteczność przetwarzania donacji przy zachowaniu wysokiego standardu bezpieczeństwa dla produktów leczniczych stosowanych w transfuzjach i innych zabiegach terapeutycznych u pacjentów.

Test cobas® DPX i system cobas® 6800/8800 są dostępne na rynkach, które uznają znak CE, w tym także w Polsce.

W bieżącym numerze LabForum polecam Państwa uwadze artykuły na temat diagnostyki zakażeń, wymagań normy ISO w pomiarach stężenia glukozy oraz diagnostyki stanów przednowotworowych raka szyjki macicy.

Życzę miłej lektury,

Z poważaniem

Tomáš Petr

wraz z zespołem RDP

Spis treści:

Diagnostyka zakażeń *Treponema pallidum* 3

HCV – zmieniający się wirus
Wyzwania diagnostyki molekularnej 6

ZZastosowanie testu CINtec PLUS
w wykrywaniu stanów przed-
nowotworowych raka szyjki macicy 10

Diagnostyka zakażeń *Treponema pallidum*

mgr Ewa Sulkowska, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

Kiła to choroba zakaźna, najczęściej przenoszona drogą płciową, wywołwana przez krętka białego (*Treponema pallidum*), bakterię pochodzącą z rodziny *Spirochaetaceae*. Okres wylegania choroby wynosi 9-90 dni¹. Kiła cechuje się wieloletnim przebiegiem z następującymi po sobie okresami objawowymi i bezobjawowymi. Może przebiegać w sposób utajony, ulegać samowyleczeniu lub wywoływać poważne zmiany narządowe. Zakaźność kiły jest ściśle związana z okresem choroby, największa jest w dwóch pierwszych latach zakażenia. Kiłę dzielimy na nabytą i wrodzoną. Kiła nabyta – wczesna – obejmująca dwa pierwsze lata od zakażenia, dzieli się na kiłę pierwotną i wtórną. Kiła późna – powyżej 5 lat od zakażenia, obejmuje okresy: utajony i objawowy². Kiła wrodzona jest chorobą wielonarządową będącą skutkiem zakażenia płodu w organizmie matki. Do zakażenia może dojść już w 9-10 tygodniu ciąży. Infekcja może doprowadzić do poronienia lub poważnego uszkodzenia płodu. Objawy kliniczne u dzieci żywo urodzonych mogą mieć różny stopień nasilenia i pojawiać się w różnym okresie. Rozpoznaje się kiłę wrodzoną wczesną (do 2 roku życia) oraz kiłę wrodzoną późną¹. Choroba w każdym stadium jest uleczalna, lekiem z wyboru jest penicylina. Dawkowanie i czas podawania leku zależą od postaci i czasu trwania choroby. Jeżeli w zakażonym organizmie doszło do zmian w narządach lub układach np. układ nerwowy, kostny, niemożliwe jest cofnięcie tych zmian¹.

DIAGNOSTYKA

Mimo, że choroba jest znana od ponad 100 lat diagnostyka nadal napotyka na trudności. Potwierdzenie choroby oparte jest na obrazie klinicznym, wywiadzie epidemiologicznym oraz wynikach badań laboratoryjnych³. Diagnostyka bezpośrednia polega na identyfikacji żywych drobnoustrojów na podstawie ich morfologii. *T. pallidum* to spiralne bakterie Gram-ujemne o średnicy 0,1-0,4 µm i długości 5-20 µm, dobrze widoczne w ciemnym polu mikroskopu świetlnego. Materiałem do badań jest wydzielina ze zmian skórnych towarzyszących chorobie. Czulość tej metody wynosi 70-80%. Ze względu na obecność saprofitycznych krętków, nie może być stosowana do diagnostyki zmian w jamie ustnej i okolicy odbytu^{2,4}.

W specjalistycznych laboratoriach wyposażonych w odpowiedni sprzęt *T. pallidum* można zidentyfikować przy pomocy mono- lub poliwalentnych przeciwciał znakowanych izotiocjanem fluoresceiny (*direct fluorescent assay*-DFA). Czulość i swoistość tej metody jest wyższa niż oglądanie bakterii w ciemnym polu mikroskopu⁴.

Testem referencyjnym zapewniającym najwyższą czulość jest próba biologiczna – test zakaźności królika (*rabbit infectivity test*-RIT)³. Jest to dojazdowe zakażenie królików – jedyny skuteczny sposób namnażania krętka białego. W Polsce ze względu na wysoki koszt i skomplikowaną procedurę test RIT nie jest wykonywany w celach diagnostycznych. Hodowla krętka białego jest bardzo trudna, są one wrażliwe na wysychanie i inne czynniki środowiska. Poza organizmem gospodarza giną szybko, są trudne do hodowania na sztucznych pożywkach oraz w hodowlach tkankowych. Można utrzymać je przy życiu na podłożu znanym jako system hodowlany *Fieldsteela*. Podwojenie liczby bakterii następuje po 30-50 godzinach, po tym czasie tempo wzrostu spada i należy *T. pallidum* przenieść na kolejne podłoże².

Mimo wielu lat prób, nie udało się stworzyć procedury potwierdzenia zakażenia *T. pallidum* w pełni spełniającej oczekiwania diagnostyczne. Duże nadzieje związane są z metodami biologii molekularnej, polegającymi na amplifikacji materiału genetycznego krętka białego. Na początku lat 90 XX w. opracowano pierwsze testy wykorzystujące polimerazową reakcję łańcuchową (PCR), w których amplifikowano fragmenty genów kodujących białka błonowe krętka białego o masie cząsteczkowej 47 kDa oraz TmpA – najbardziej immunogenne białko



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

bakterii^{5,6,7}. Czulość metody była bardzo wysoka i wynosiła od 1-10 krętków w badanym materiale. W ten sposób można wykryć materiał genetyczny bakterii w surowicy, płynie mózgowo-rdzeniowym, płynie owodniowym, w utrwalonym preparacie histologicznym. Przy pomocy tego typu testów nie można odróżnić zakażenia *T. pallidum subspecies pallidum* od zakażenia *T. pallidum subspecies pertenue* wywołującego występującą w regionach tropikalnych frambezę (malinica, jagodzica), chorobę nie przenoszoną drogą płciową. W kolejnych latach udoskonalano testy oparte na PCR zwiększając ich czulość. Zastosowanie RT-PCR (*reverse transcriptse* PCR) umożliwiło wykrywanie materiału genetycznego krętka bladego w obecności inhibitorów PCR, które mogą znajdować się we krwi, płynie mózgowo-rdzeniowym, tkankach. Jednak nie pozwoliło na zróżnicowanie zakażeń podgatunkami *T. pallidum*⁸. Najnowsza modyfikacja PCR w diagnostyce kiły polega na wykrywaniu genu swoistej dla krętka polimerazy DNA typu I (polA)⁹. Gen ten w komórkach *T. pallidum* ma niezmienną strukturę. Zmodyfikowany test ma bardzo wysoką czulość i swoistość, porównywalną z próbą biologiczną, a uproszczona metodyka oraz zastosowanie we krwi, płynie mózgowo-rdzeniowym, owodniowym pozwala na wykorzystanie w rutynowych badaniach⁹. Powszechnie stosowana jest diagnostyka zakażenia *T. pallidum* oparta na metodach pośrednich, wykrywających przeciwciała skierowane przeciwko antygenom krętka bladego. Wyróżniamy dwie grupy testów serologicznych:

- klasyczne („kłaczkujące”) - antygenem w tych odczynach są lipidy. Są to: test Wassermana, VDRL-*Veneral Disease Research Laboratory*, USR- *Unheated Serum Regın* – zastosowano w nich antygen zastępczy – kardiolipinę.
- krętkowe - antygenem są krętki kiły. Wykrywamy przeciwciała skierowane przeciwko krętkom bladym. Są to testy: TPI-*T.pallidum immobilization test*, FTA- *Fluorescent Treponemal Antibody*, FTA-ABS - *Fluorescent Treponemal Antibody Absorbtion Test*, TPHA- *T. pallidum Haemagglutination Assay*, EIA – *enzyme immunoassay*, WB – *Western-blot*⁶.

Odczyny klasyczne (niekrętkowe, nieswoiste) wykrywają przeciwciała przeciwlipidowe klasy IgG i IgM, wytwarzane również w przebiegu zakażeń innymi krętkami (np. brucelozie, boreliozie) oraz chorobach o podłożu autoimmunologicznym (choroby reumatyczne, kolagenozy)^{2,5}.

Czulość testów niekrętkowych jest podobna, zmienna w poszczególnych okresach choroby, dla kiły I okresu wynosi 80 %, dla kiły II okresu i utajonej wczesnej- 100%, dla kiły utajonej i objawowej późnej – 71%, dla kiły utajonej późnej – 40%^{4,5}.

Odczyny krętkowe (swoiste) charakteryzuje większa swoistość i czulość. Dodatnie wyniki u większości zakażonych osób otrzymywane są po 2-3 tyg. od zakażenia w przypadku kiły pierwszorzędowej oraz u 100 % chorych w kile drugorzędowej⁵. Często stosuje się je jako testy potwierdzające zakażenie wykryte testem klasycznym.

Na podstawie oceny czulości i swoistości testów serologicznych wykrywających przeciwciała przeciwko *T. pallidum* Międzynarodowa Organizacja ds. Chorób Przenoszonych Drogą Płciową (*International Union Against Sexually Transmitted Infections- IUSTI*) zaleca stosowanie w badaniach przeglądowych testów swoistych – krętkowych, takich jak testy immunochemiczne (EIA)⁵.

IUSTI zaleca, aby badania potwierdzające zakażenia *T. pallidum* wykonywane były innym testem niż badanie przesiewowe. Jeśli powtarzalnie reaktywny wynik testu przesiewowego uzyskano w teście immunochemicznym, badania weryfikacyjne powinny być wykonane testami TPHA, FTA, FTA-ABS, WB. Zaleca się, aby do potwierdzenia wyników powtarzalnie reaktywnych wykorzystywać dwa rodzaje testów.

Testy immunochemiczne do diagnostyki zostały wprowadzone w latach 70-tych XX w. Oparte

są na reakcji antygen-przeciwciała w oparciu o fazę stałą (płytką, kulki), w trakcie inkubacji z surowicą odpornościową sprzężoną z enzymem otrzymujemy swoisty wynik w przypadku zakażenia⁴. Testy te wykorzystują antygeny krętka bladego o masach cząsteczkowych 15 kDa, 17 kDa, 44,5 kDa, lub 47 kDa. Charakteryzują się one wyższą czułością i swoistością w porównaniu z testami niekrętkowymi. Dużą zaletą testów immunochemicznych jest możliwość wykonania badania w trybie automatycznym. Umożliwia to standaryzację odczytu, zmniejsza ryzyko błędu ludzkiego, minimalizuje wpływ czynników zewnętrznych na procedurę przeprowadzenia oznaczenia. Dlatego w trosce o dobro biorców krwi w polskim krwiodawstwie od połowy 2012 r. obowiązuje wykonywanie badań przeglądowych i potwierdzających testami swoistymi.

Obecnie w polskim krwiodawstwie w badaniach przeglądowych wykorzystywane są testy typu EIA. Są to: test Syphilis TP Architect firmy Abbott, Syphilis TPA firmy Ortho (testy CMIA) oraz Trepanostika firmy BioMerieux i Syphilis EIA II Total Antibody firmy Bio-Rad (testy ELISA). Wszystkie badania są zautomatyzowane i podlegają wewnątrz- i zewnątrzlaboratoryjnej kontroli. W Instytucie Hematologii i Transfuzjologii zakończono ewaluację systemu **cobas** firmy Roche. Testy i aparatura uzyskały pozytywną opinię i mogą być wykorzystywane w polskim krwiodawstwie.

W badaniach potwierdzających zakażenie kiłą wykorzystywane są testy oparte na technice Western blot (WB). W odróżnieniu od metody ELISA testy te umożliwiają wykrycie przeciwciał przeciwko konkretnym antygenom krętka bladego. Charakteryzują się wysoką czułością i swoistością powyżej 99%. Na paskach opłaszczane są białka antygenów o masie cząsteczkowej 15 kDa, 17 kDa, 44,5 kDa lub 47 kDa. Badanie WB, wykonywane w IHiT jest zautomatyzowane, co umożliwia otrzymanie wystandaryzowanego, obiektywnego wyniku. Interpretacja wyników badań powinna być dokonywana z dużą uwagą, możliwe są reakcje krzyżowe z innymi krętkami, wynik ujemny nie zawsze wyklucza infekcję. Należy powtórzyć badanie, gdy istnieje ryzyko zakażenia. W przypadkach potwierdzenia obecności przeciwciał badany na stałe wykluczany jest z grona dawców krwi. Należy taką osobę skierować do poradni wenerologicznej. Zgodnie z obowiązującym prawem potwierdzona obecność przeciwciała anty-*T. pallidum* podlega zgłoszeniu do pionu sanitarnego. W innych przypadkach stosowana jest dyskwalifikacja czasowa. Ponowna kontrola wyznaczana jest za 3 lub 6 miesięcy w zależności od otrzymanych wyników. Dawca może ponownie oddawać krew, gdy wyniki badań przeglądowych i weryfikacyjnych są ujemne.

Diagnostyka *T. pallidum* ma ogromne znaczenie w krwiodawstwie, infekcja uważana jest za chorobę znacznikową dla zakażenia wirusem HIV. Zmiany skórne towarzyszące kile oraz ich umiejscowienie w okolicy dróg rodnych, odbytu, jamy ustnej ułatwiają wnikanie wirusa HIV do organizmu. Współczynnik zachorowalności (liczba przypadków zachorowań na 100 000 mieszkańców w ciągu roku) na kiłę w Polsce w ostatnich latach wynosi: 2010 r. - 2,14¹⁰, 2011 r. - 2,2¹¹, 2012 r. - 2,6¹², 2013 r. - 3,5¹³. Sytuacja epidemiologiczna związana z kiłą w Polsce jest trudna do oceny ponieważ, spada liczba badań wykonywanych w tym kierunku. Przed reformą służby zdrowia w Polsce wykonywanych było około 8 milionów badań w kierunku kiły, obecnie ok. 300- 400 tysięcy. Od 2009 r. powrócono do bezpłatnej diagnostyki i leczenia kiły. Współczynnik zachorowalności (na 100 000 mieszkańców/rok) w krajach sąsiadujących z Polską jest wysoki i wynosi: Czechy - 7,7; Słowacja 4,2; Węgry 5,5; Łotwa 10,3; Litwa 9,7; Ukraina 27,5; Rosja 59,3¹⁴. Dlatego ważne jest, aby w krwiodawstwie do badań przeglądowych i potwierdzających wykorzystywać testy swoiste o wysokiej czułości.



cobas e 601

· system immunochemiczny przeznaczony dla średnich i dużych laboratoriów



cobas® 6000

· zintegrowany system biochemiczno-immunochemiczny

Piśmiennictwo dostępne w redakcji

HCV – zmieniający się wirus

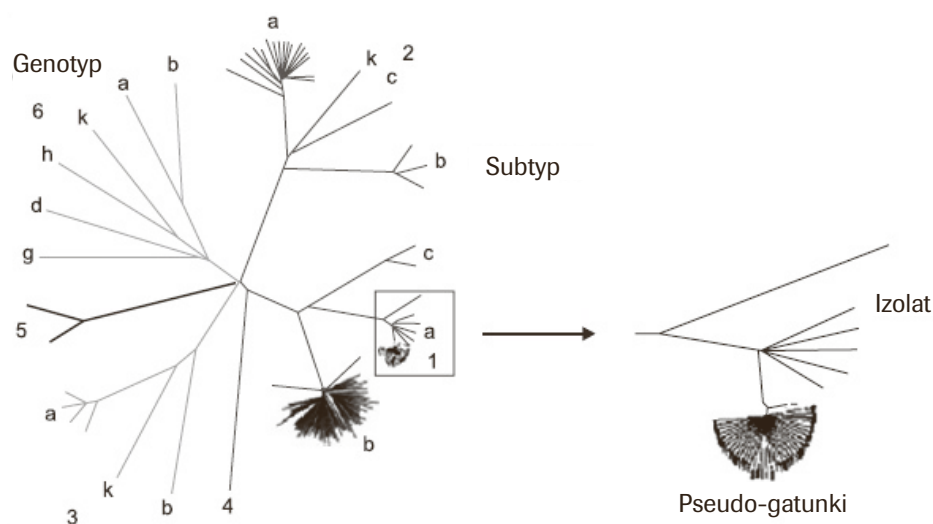
Wyzwania diagnostyki molekularnej

Wirus zapalenia wątroby typu C (HCV) jest główną przyczyną przewlekłych chorób wątroby. Szacuje się, że na świecie zakażonych HCV jest ok. 150 mln. osób, w tym 80% przewlekłe, a 350 tys. umiera każdego roku z powodu zaawansowanych zmian chorobowych jak marskość wątroby i rak wątroby.^{1,2} W Polsce zakażonych HCV jest ok. 200 tys. osób. Z tego powodu ciągła poprawa diagnostyki i leczenia przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C jest szczególnie istotna.

ZMIENNOŚĆ GENETYCZNA

HCV charakteryzuje się wysokim współczynnikiem częstości replikacji oraz wysoką częstością mutacji, co powoduje ekstremalnie wysoką zmienność genetyczną tego wirusa. Dotychczas HCV ewoluował w kierunku 6 genotypów i ponad 50 subtypów, ale stale u każdego pacjenta zakażonego HCV rozwijają się nowe warianty sekwencji wirusa.^{3,4,5} Podatna na błędy polimeraza RNA wirusa i brak mechanizmu naprawczego powoduje, że każdego dnia powstaje 10^{12} kopii wirusa zawierających mutację jednego nukleotydu. Nowe mutacje pojawiają się spontanicznie w organizmie pacjenta, a w odpowiedzi na presję od jego systemu immunologicznego tworzą się genetycznie odrębne grupy tzw. pseudo-gatunków (ang. *quasispecies*). (Rys.1). Presję selekcyjną mogą wywierać również leki antywirusowe.

1 Genetyczna różnorodność HCV



POSTĘP TECHNOLOGICZNY DLA LEPSZEJ NIEZAWODNOŚCI

Duża zmienność genetyczna i niejednorodność sekwencji HCV stawia wysokie wymagania testom do wykrywania i monitorowania wirerii HCV, ponieważ może powodować niedopasowanie sond i starterów.^{6,7} Naukowcy tworzący tego typu testy muszą wprowadzać nowe rozwiązania zapewniające wykrycie i dokładny pomiar ilościowy dla wszystkich wariantów HCV. Jest to bardzo istotne, ponieważ monitorowanie wirerii HCV pozwalające ocenić odpowiedź pacjenta na zastosowane leczenie jest kluczowym elementem obecnych standardów leczenia. Stwarza to szczególne wymagania dla testów molekularnych, które muszą prawidłowo rozróżniać obecność wirusa od tła dla zapewnienia dokładnego wyniku.⁸ W nowych testach do wykrywania HCV RNA (Roche) wprowadzono kilka udoskonaleń dla

poprawy niezawodności i dokładności. Wykorzystano dwie nienakładające się sondy w połączeniu z dodatkowymi parami starterów, zapewniając powtarzalne badanie dla różnych izolatów HCV i przy wysokiej zmienności sekwencji.⁹ (rys.2)

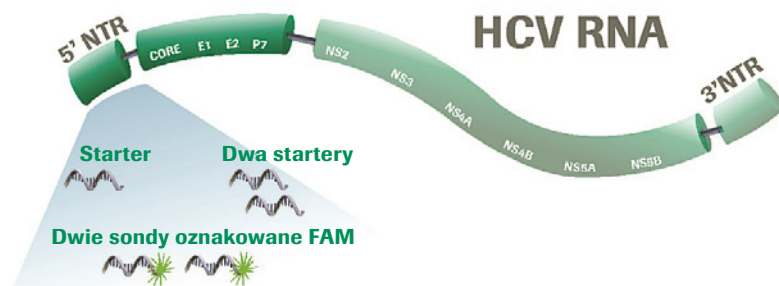
Ponad to sondy posiadają zwiększoną tolerancję na niedopasowanie, pozwalając na dokładny pomiar ilościowy wirusa pomimo zmian nukleotydów, utrzymując jednocześnie wysoka swoistość.^{10,11,12} Tolerancja na niedopasowanie musi być jednak bardzo ostrożnie zbalansowana ze swoistością testu. Zbyt duża tolerancja na niedopasowanie (jak stosowanie sond niskiego dopasowania^{14,15,16}) może skutkować wykrywaniem sekwencji nie-HCV, prowadząc do wyników fałszywie zawyżonych, co z kolei może ewentualnie wpływać na nieoptymalne leczenie pacjenta. Dodatkowo zastosowano nową mieszaninę polimeraz DNA która w połączeniu z optymalizacją PCR zwiększa wierność powielania i efektywność reakcji.

Powyższe kluczowe zmiany w konstrukcji testu zapewniają wiarygodne wyniki ilościowe, które spełniają wymagania leczenia WZW typu C z wykorzystaniem nowych leków o bezpośrednim działaniu przeciwwirusowym (DAA - *Direct Acting Antivirals*).¹³



**COBAS AmpliPrep
COBAS TaqMan 48**
system do automatycznej
izolacji kwasów
nukleinowych
i amplifikacji PCR
oraz detekcji w czasie
rzeczywistym

2 Regiony wiązania podwójnych sond i primerów w genomie HCV



LEPSZA DIAGNOSTYKA DLA SKUTECZNIEJSZEGO POSTĘPOWANIA Z PACJENTEM

Polska Grupa Ekspertów HCV w swoich rekomendacjach leczenia wirusowych zapaleń wątroby typu C (2014) zaleca stosowanie badania o czułości analitycznej 15 IU/ml dla badania jakościowego i liniowości od 25 IU/ml do oceny ilościowej.¹⁷

Wiarygodny wynik ilościowy jest szczególnie istotny podczas leczenia bazującego na odpowiedzi pacjenta na terapię. W zależności wyniku badania ilościowego z zastosowaniem DAA terapia jest kontynuowana lub przerywana.

Przykładowo dla genotypu 1 leczenie trójkowe z boceprewirem (BOC) przerywamy jeżeli HCV RNA; w 8 tygodniu terapii wynosi ≥ 1000 IU/mL, 12 tygodniu wynosi ≥ 100 IU/mL, w 24 tygodniu terapii jest wykrywalne, czyli ≥ 25 IU/mL. Podobnie w przypadku leczenia trójkowego z zastosowaniem telaprewiru (TVR) należy przerwać leczenie, gdy stężenie HCV RNA przekracza 1000 IU/mL w 4 lub 12 tygodniu.¹⁷

Poszczególne punkty kontroli postępów leczenia i decyzji terapeutycznych za pomocą poziomu wirerii zostały wyznaczone podczas badań klinicznych tych leków. W badaniu klinicznych, które były podstawą do rejestracji boceprewiru i telaprewiru wykorzystywano test COBAS TaqMan HCV v2.0 For Use With The High Pure System (Roche).^{18,19,20,21}



**COBAS AMPLIPREP/
STACJA DOKUJĄCA/
COBAS TAQMAN**
całkowita automatyzacja
izolacji RNA/DNA,
transferu próbek i PCR
w czasie rzeczywistym

Wieloośrodkowe badanie ExPECT przeprowadzone w celu zbadania klinicznej przydatności testu z podwójnymi sondami (COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, Roche) i porównaniu z innymi używanymi testami wykazało rozbieżności wyników ilościowych dla niskich wirerii.

W badaniu tym kliniczna przydatność testu była oceniona wykorzystując 421 próbek pozostałych po rutynowych badaniach laboratoryjnych. Pierwotnie oznaczone stężenie HCV RNA wynosiło od 50 do 1×10^8 IU/mL.^{22,23}

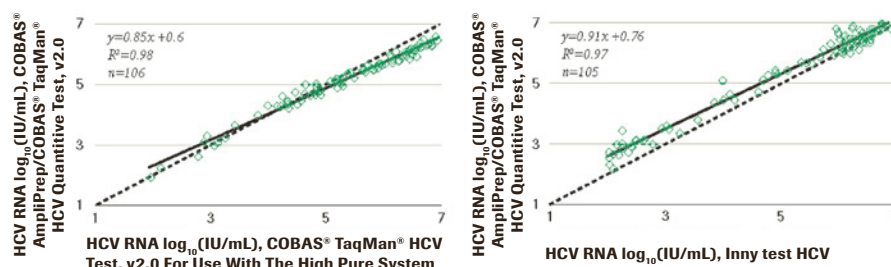
Test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0 wykazał dobrą zgodność z testem COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0 For Use With The High Pure System, średnie odchylenie wynosiło tylko $0,22 \log_{10}$ IU/mL ($R^2=0,98$); 91% (96/106) próbek nie różniło się o więcej niż $\pm 0,5 \log_{10}$ IU/mL.

W odróżnieniu do testu HCV innego wiaodającego producenta, dla którego średnie odchylenie wynosiło $0,28 \log_{10}$ IU/mL ($R^2=0,97$) i tylko 78% (82/105) próbek miało odchylenie poniżej $\pm 0,5 \log_{10}$ IU/mL (Rys.3).

Pomiędzy testami Roche tylko 9% wyników różniło się o więcej niż $\pm 0,5 \log_{10}$ IU/mL, podczas gdy pomiędzy testem HCV z dwoma sondami, a testem innego producenta aż 28% wyników różniło się o więcej niż $\pm 0,5 \log_{10}$ IU/mL.

Analiza wyników po zastosowaniu wartości odcięcia na poziomie 25 IU/mL, wykazała tylko

3 Porównanie korelacji testów HCV RNA



86,63% zgodność pomiędzy COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0, a testem innego producenta. 25 IU/mL HCV RNA jest kryterium odcięcia dla trwałej odpowiedzi wirusologicznej w schemacie leczenia boceprewirem i teleprawirem i niepowodzenia w schemacie leczenia semiprewirem, jak ustalono w badaniach klinicznych używając testu COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0 For Use With The High Pure System.^{24,25} Obniżenie wartości odcięcia do 15 IU/mL, zwiększyło zgodność do 93,58%. (Tab.1) Różnice te wskazują, że użycie innego testu niż tego którym ustalono kliniczne punkty odcięcia może prowadzić do podjęcia różnych decyzji terapeutycznych.

Tabela 1.

		Inny test HCV			
		TND	<25 IU/mL	≥25 IU/mL	
COBAS® AmpliPrep/ COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0	TND*	45	5	0	Ogólna procentowa zgodność: 86,63% (162/187)
	<25 IU/mL	2	5	6	
	≥25 IU/mL	0	112	112	
	TND	45	4	1	Ogólna procentowa zgodność: 93,58% (175/187)
	<15 IU/mL	2	1	4	
	≥15 IU/mL	0	1	129	

*TND - Target Not Detected (nie wykryto wirusa)

Szczegółowe badania próbek o wirerii w zakresie 25–3,500 IU/mL wykazały, że wartości otrzymane testem HCV innego producenta były istotnie niższe ($p < 0,05$) w porównaniu do wirerii oznaczonych testem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0. (Tab.2). Różnice te mogą mieć wpływ na prowadzenie pacjentów ponieważ w tym zakresie mieszczą się wartości 100 i 1000 IU/mL powodujące przerwanie leczenia odpowiednio dla boceprewiru i telaprewiru.^{18,19,24} Stąd, zaniżenie wirerii może spowodować nieprawidłowe postępowania.

Tabela 2.

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0	n	Średnia różnica ($\log_{10}$ IU/mL)	p-wartość
Inny test HCV	21	0,52	<0,0001
COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Test	21	0,05	0,73
COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0 do użytku z systemem High Pure	8	0,06	0,56

Wyniki badania ExPECT, włączając próbki o niskiej wirerii, wykazały doskonałą kliniczną użyteczność testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative Test, v2.0 w monitorowaniu HCV RNA podczas leczenia inhibitorami proteazy pacjentów zakażonych genotypem 1. Ponadto wykazano dobrą zgodność z testem COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0 For Use With The High Pure System użytym we wszystkich badaniach klinicznych leków o bezpośrednim działaniu przeciwwirusowym (DDA).

W innym badaniu zostało przeprowadzone porównanie wzorca Paul-Ehrlich-Institute (PEI) za pomocą testu HCV z dwiema sondami oraz testem innego producenta z pojedynczą sondą (Tab. 3).

Odchylenia pomiędzy pomiarami i niedoszacowanie wirerii w zakresie wartości decyzyjnych (np. 1000 IU/ml dla talaprewiru) o kontynuacji lub przerwaniu leczenia może prowadzić do nieuzasadnionego kontynuowania podawania leku zamiast przerwania leczenia, które nie przyniesie pozytywnych wyników.

Tabela 3.

Log ₁₀ IU/mL	Dwie sondy HCV		test HCV z pojedynczą sondą	
PEI Standard	Średnia	Odchylenie	Średnia	Odchylenie
2,00	1,86	-0,14	1,71	-0,29
3,00	2,97	-0,03	2,74	-0,26

PODSUMOWANIE – DWIE SONDY SĄ LEPSZE NIŻ JEDNA

Zmienność genetyczna HCV stwarza nieustające wyzwania dla konstrukcji testów molekularnych. Innowacyjny test HCV zawierający dwie sondy precyzyjnie odróżnia sygnał od szumu tła, pozwalając na uzyskanie dokładniejszych wyników ilościowych.²⁷

Udoskonalenia polegające na zastosowaniu dwóch sond zamiast pojedynczej oraz dodatkowych starterów wprowadza nowy standard i pozwala na się do wykrywania nowych wariantów wirusa które mogą pojawić się w przyszłości.

Dokładne monitorowanie wirerii HCV RNA jest szczególnie ważne w prowadzeniu leczenia za pomocą nowych leków działających bezpośrednio na wirusa (DAA).



COBAS AmpliPrep COBAS TaqMan 48

·system do automatycznej izolacji kwasów nukleinowych i amplifikacji PCR oraz detekcji w czasie rzeczywistym



COBAS AMPLIPREP/ STACJA DOKUJĄCA/ COBAS TAQMAN

·całkowita automatyzacja izolacji RNA/DNA, transferu próbek i PCR w czasie rzeczywistym

*Piśmiennictwo dostępne
w redakcji*

Zastosowanie testu CINtec PLUS w wykrywaniu stanów przednowotworowych raka szyjki macicy

Lek. Martyna Trzeszcz^{1,2}, lek. Maciej Mazurec¹

¹Centrum Zdrowia Kobiety „CORFAMED” Sp. z o.o., ul. Kluczborska 37, 50-322 Wrocław

²Zakład Patomorfologii i Cytologii Onkologicznej Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu, ul. Borowska 213, 50-556 Wrocław

WSTĘP

Rak szyjki macicy (RSzM) należy do tej grupy nowotworów złośliwych, których zapadalność mogłaby bardzo znacząco zmaleć w przypadku wprowadzenia skutecznych programów jego profilaktyki pierwotnej i wtórnej. W Polsce mimo wdrożenia od 2006 roku Populacyjnego Programu Profilaktyki i Wczesnego Wykrywania Raka Szyjki Macicy nie osiągnięto do dzisiaj obniżenia śmiertelności z powodu tego nowotworu. W Europie jesteśmy na jednym z pierwszych miejsc w śmiertelności z powodu RSzM. Wnioski płynące z realizacji programu są dla niego niekorzystne także w zakresie zgłaszalności zapraszanych kobiet (sięgała ona do 27% w 2010r., z zaznaczającą się tendencją spadkową wynoszącą do 23 %! w roku 2012), bez poprawy w kolejnych latach. W różnych analizach wymieniane są złożone powody tej sytuacji, ale żadna z nich nie podnosi kwestii skuteczności i wiarygodności rozpoznań cytologicznych polskiego skriningu, ponieważ takie statystyki nie są prowadzone. Polski populacyjny skrining RSzM nie uwzględnia weryfikacji, histopatologicznej wskazanych grup rozpoznań cytologicznych, zwłaszcza w grupie z ASC-US+, z obecnością nieprawidłowych komórek nabłonka wielowarstwowego płaskiego o nieokreślonym znaczeniu. Nie mamy więc dostępnej wiedzy na temat liczby fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych wyników, co jest podstawą oceny skuteczności każdego skriningu.

Pewną nadzieją napawa z kolei fakt, że duża populacja polskich kobiet jest pod opieką prywatnych specjalistycznych praktyk ginekologicznych, z których część zapewnia, możliwie pełny zakres badań diagnostycznych dla grupy pacjentek ASC-US+, ale także przynajmniej części osób z prawidłowym wynikiem cytologii, dzięki coraz częstszemu wykrywaniu wysokoonkogennych genotypów wirusa brodawczaka ludzkiego (HPV-HR) w badaniach przesiewowych RSzM.

Szansą dla poprawy polskich wyników walki z RSzM jest m. in. edukacja personelu medycznego połączona z upowszechnieniem nowszych i najnowszych technik diagnostycznych, niestosowanych lub stosowanych w bardzo ograniczony sposób w programie. Bardzo istotnym jej elementem jest popularyzacja oceny statusu HPV-HR oraz pobierania materiału z szyjki macicy na podłoże płynne. Materiał pobrany na podłoże płynne i jego późniejsza preparatyka umożliwiają wykonanie poszerzonej diagnostyki, obejmującej nie tylko cytologię płynną, ale co ważniejsze, wykonanie nowego testu immunocytochemicznego – **CINtec PLUS**. Wprowadzanie nowych metod skriningu, wymaga połączonego działania personelu medycznego oraz mediów. Pozostaje mieć nadzieję, że znajdzie to swoją realizację w najbliższej przyszłości.

Powszechnie stosowane w badaniach przesiewowych RSzM testy posiadają znane ograniczenia. Cytologia złuszczeniowa szyjki macicy charakteryzuje się niską czułością pojedynczego testu, wysoką subiektywnością i niejednoznacznością wyników badania opartego na ocenie morfologii komórek, z dużymi rozbieżnościami między diagnozującymi. Metody oparte na detekcji HPV-HR cechuje wysoka czułość przy niskiej swoistości, co wynika z rozpowszechnienia zakażenia wirusem: powyżej 80 % populacji zetknie się w swoim życiu z HPV, przy jednoczesnym wysokim prawdopodobieństwie, że u ponad 90 % dojdzie do samoistnego ustąpienia infekcji. Niezwykle istotne jest, że w tylko poniżej 10 % aktualnie stwierdzanych zakażeń –HPV-HR rozwiną się śródnabłonkowe zmiany

dysplastyczne dużego stopnia (HSIL, *high-grade squamous intraepithelial lesion*) czy rak. Szczególnie ożywiona dyskusja toczy się od 8. stycznia 2015 roku, kiedy to ASCCP (*American Society for Colposcopy and Cervical Pathology*) i SGO (*Society for Gynecologic Oncology*) ogłosiły rekomendacje dla testu w kierunku HPV-HR jako podstawowego (obok cytologii i co-testingu) badania przesiewowego RSzMRSzM. Podstawą dla takiego zalecenia są wyniki badania ATHENA (**A**ddressing **t**he **N**eed for **A**dvanced HPV Diagnostics), w którym w grupie ponad 42 000 kobiet powyżej 25 roku życia. wykazano przewagę skринingu opartego na wykrywaniu HPV DNA (Roche cobas HBV test) nad cytologią, w diagnozowaniu zagrożenia RSzM. Warto przypomnieć, że jest to jedyny test zaaprobowany przez FDA (Food and Drug Administration) w USA do zastosowania w skринingu RSzM.

Dyskusja odnośnie zmian w skринingu RSzM toczy się wokół dwóch kluczowych kwestii:

- czy posiadamy wystarczające dowody na **skuteczność** testu wykrywającego HPV-RH (z ograniczeniem do 14 wysokoonkogennych typów) jako podstawowego w skринingu RSzM; są przecież inne wysokoonkogenne typy i grupa raków szyjki macicy HPV-niezależnych?
- oraz jaki jest **poziom zrozumienia i akceptacji** grupy poddawanej badaniom przesiewowym dla zmian zachodzących w skринingu RSzM?

Nie dając ostatecznej odpowiedzi na postawione powyżej pytania oczywistym są **ograniczenia obecnych testów** stosowanych w badaniach przesiewowych: cytologii, wykrywania HPV DNA, czy nawet połączeniu obu metod. Dotyczy to zwłaszcza cytologicznych zmian granicznych z obecnością nieprawidłowych komórek nabłonka wielowarstwowego płaskiego (zmiany typu ASC-US oraz LSIL), a także zakażenie HPV typami 16 i 18 czy przetrwałe infekcje pozostałymi 12 typami (nie-16 /nie-18). Wszystkie wyżej wymienione stany kliniczne wiążą się z ryzykiem rozwoju śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy. Ryzyko rozwoju zmian śródnabłonkowych i raka jest bardzo zróżnicowane i trudne do oszacowania w oparciu o tylko jeden z dostępnych testów diagnostycznych. W przypadku uwzględnienia wniosków płynących z zastosowania dwóch testów – cytologicznego i molekularnego – margines niepewności pozostaje nadal duży. Przytaczając wyniki z 2012 roku największego na świecie dostępnego badania w zakresie oceny profilaktyki wtórnej RSzM – *Kaiser Permanente Northern California Medical Care Plan* (KPNC) – skumulowane 5-letnie ryzyko wystąpienia CIN3+ u pacjentek z potwierdzonym pozytywnym statusem HPV-HR oraz obrazem ASC-US w cytologii wynosi 6,8 %, a dla LSIL 5,2 %. Konieczność dalszego postępowania diagnostycznego (wykonanie kolposkopii z biopsją) u tych pacjentek jest więc logiczna i bezspornie konieczna (z wyjątkiem wybranych grup pacjentek, np. kobiet w ciąży czy w wieku 21-24 lat). Dla porównania ryzyko CIN2+ w grupie kobiet z rozpoznaniem cytologicznym HSIL (bez względu na status HPV) wynosi 60 %, a w grupie z rozpoznaniem HSIL przy negatywnym wyniku HPV-HR 5-letnie ryzyko rozwoju CIN3+ to 29 %.

Konkludując, „mniejsze nieprawidłowości” generują dużą liczbę procedur dodatkowych, takich jak powtórna cytologia, oznaczenie genotypu HPV, kolposkopia czy biopsja szyjki macicy, które w konsekwencji nie prowadzą do potwierdzenia istotnych zmian prekursorowych.

Kluczowy cel profilaktyki wtórnej – **zmniejszenie zachorowalności a tym samym śmiertelności z powodu RSzM** – realizowany poprzez zdiagnozowanie możliwie wszystkich pacjentek, u których występuje histologiczny obraz **HSIL** (zgodnie z nową nomenklaturą WHO 2014) lub CIN2 lub CIN3 (w zgodzie z dotychczasową), przy



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

obecnym modelu skriningu powoduje konieczność objęcia dalszym, m. in. inwazyjnym, postępowaniem diagnostycznym znacznie większej liczby kobiet (nawet kilkunastokrotnie) niż wymaga tego ich faktyczny status histologiczny, czyli rzeczywiste, a nie potencjalne ryzyko HSIL+/CIN2+, co prowadzi do wykonywania niepotrzebnych nieinwazyjnych i inwazyjnych procedur dodatkowych.

Duże nadzieje na znaczącą poprawę swoistości skriningu, przede wszystkim ze względu na bezpieczeństwo i komfort pacjentek, ale także aspekt ekonomiczny ograniczenia liczby niepotrzebnych procedur diagnostycznych w skriningu RSzM wiąże się z rolą **biomarkerów** RSzM. Zrozumienie ich potencjalnej roli diagnostycznej powiązane jest z rosnącą wiedzą na temat zmian zachodzących w cyklu komórkowym, m. in. pod wpływem onkogenów E6 i E7 hr-HPV.

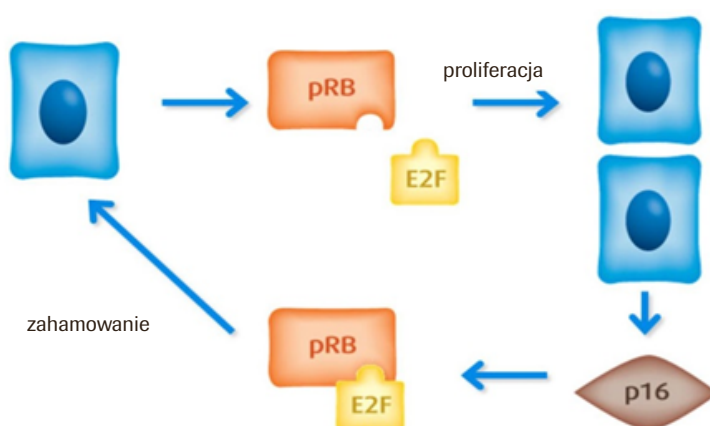
BIOMARKERY RAKA SZYJKI MACICY

Wśród biomarkerów RSzM najczęściej wymieniane są testy wykrywające obecność mRNA HPV oraz **badanie immunocytochemiczne na obecność antygenu p16/Ki-67 (test CIntec PLUS)**.

Dostępne piśmiennictwo nie potwierdza na obecnym etapie możliwości zastosowania oraz korzyści diagnostycznych detekcji mRNA HPV w selekcji pacjentek z wysokim ryzykiem HSIL+/CIN2+. Kliniczne zastosowanie i szersze potwierdzenie w piśmiennictwie uzyskał jedynie oparty na cytologii **test p16/Ki-67 (CIntec PLUS)**. Oba **biomarkery, p16 i Ki-67**, są wykładnikami zmian w nabłonku wielowarstwowym płaskim szyjki macicy związanych z transformacją nowotworową. Białko **p16** w zdrowej komórce jest białkiem regulatorowym blokującym cykl komórkowy (tzw. białko supresorowe). Nieprawidłowa nadekspresja **p16** pojawia się jako wynik degradacji antyonkogeny komórkowego pRB przez białko E7 wirusa.

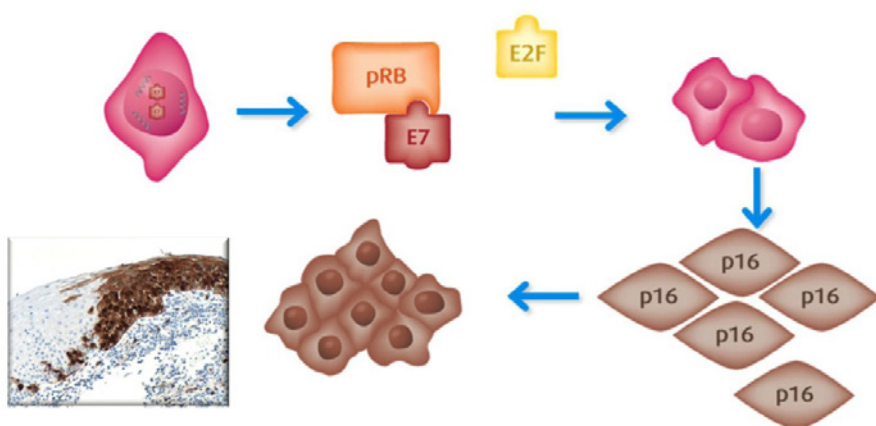
1 Przebieg prawidłowego cyklu komórkowego

- Uwolnienie czynnika transkrypcyjnego E2F z połączenia z pRB skutkuje progresją cyklu komórkowego, replikacją, i niskim poziomem ekspresji p16.
- Białko p16 umożliwia ponowne związanie pRB z E2F prowadząc do zahamowania cyklu komórkowego.
- Ten mechanizm sprzężenia zwrotnego jest kluczowy w utrzymaniu równowagi między proliferacją, a zahamowaniem cyklu komórkowego



2 Mechanizm transformacji nowotworowej komórki przez HPV

- W komórkach z transformującą infekcją HPV, wirusowa onkoproteina E7 uszkadza funkcję pRB pozbawiając je zdolności wiązania E2F.
- Prowadzi to do dysregulacji cyklu komórkowego, niestabilności genetycznej i nadekspresji p16 wykrywanej metodami barwienia immunohistochemicznego.



Rola **p16** jako **biomarkera transformacji nowotworowej** znalazła swoje potwierdzenie w aktualnych zaleceniach dotyczących diagnostyki histopatologicznej szyjki macicy, wynikających z projektu **LAST** (**L**ower **A**nogenital **S**quamous **T**erminology) i częściowo zaimplementowanych do najnowszej klasyfikacji **WHO** z 2014 roku dla zmian przednowotworowych szyjki macicy.

Projekt LAST i klasyfikacja WHO 2014 wprowadzają, stosowane do tej pory tylko w cytologii szyjki macicy, rozpoznania **LSIL** i **HSIL** do nomenklatury histopatologicznej. LSIL zastępuje CIN1, a HSIL CIN2 oraz CIN3, sprowadzając klasyfikację CIN do subklasyfikacji. Aktualnie obowiązujące pełne rozpoznanie dotychczasowego CIN1 to **LSIL/CIN1**, a CIN2 czy CIN3 to **HSIL/CIN2** i **HSIL/CIN3**.

Dodatkowo, dzięki **immunohistochemii** z zastosowaniem **p16**, wprowadzono konieczność weryfikacji wszystkich rozpoznań histopatologicznych CIN2 do LSIL (przy negatywnym lub ogniskowym odczynie p16) lub HSIL (przy odczynie silnym i rozlanym).

Jednocześnie CAP (College of American Pathologists) i ASCCP zalecają użycie badania na obecność **p16**:

- w diagnostyce różnicowej CIN2 i CIN3 od zmian je naśladujących,
- w przypadku niezgodności między patomorfologami w zakresie rozpoznań CIN2 i 3
- oraz przy rozpoznaniu w wycinkach zmiany CIN1 lub NIL (**N**egative for **I**ntraepithelial **L**esion) z poprzedzającym rozpoznaniem cytologicznym HSIL, ASC-H, ASC-US z pozytywnym 16 typem HPV i AGC NOS.

W każdym z powyższych przypadków silny i rozlany odczyn **p16** rozstrzyga o rozpoznaniu zmiany dużego stopnia (HSIL), z tym że w ostatniej sytuacji, w obrębie grupy komórek z pozytywnym odczynem **p16** muszą zostać dodatkowo potwierdzone morfologiczne cechy HSIL.

Ki-67, białko jądrowe i jąderkowe, jest z kolei markerem proliferacji dającym się uwidocznąć we wszystkich fazach cyklu komórkowego poza G0.

W prawidłowych komórkach **p16** (marker supresorowy) i **Ki-67** (marker proliferacji) nie powinny więc ulegać ekspresji jednocześnie w jednej komórce.

TEST CINtec PLUS

CINtec PLUS to podwójne barwienie immunocytochemiczne z kombinacją dwóch



Aparat BenchMark GX
· system do
automatycznego
barwienia metodą IHC/
ISH



Aparat BenchMark XT
· system do
automatycznego
barwienia metodą
IHC/ISH

biomarkerów - p16 i Ki-67 – zawartych w jednym teście, łączącym wysoką czułość z wysoką swoistością dla HSIL+/CIN2+.

Test nie wymaga interpretacji morfologii komórkowej a jedynie identyfikacji komórek z podwójnie pozytywnym barwieniem:

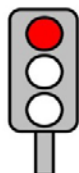
- **brązowym zabarwieniem cytoplazmy** jako potwierdzenia nadekspresji p16
- oraz **czerwonym jądra komórkowego** jako potwierdzenia nadekspresji **Ki-67**.

Test określany jest jako pozytywny jeśli zidentyfikowana zostanie **minimum jedna komórka** spełniająca powyższe kryteria, jest więc prosty i jednoznaczny dla doświadczonego cytopatologa.

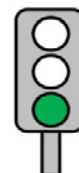
W obrazowym uproszczeniu - **CINtec PLUS** wykorzystuje logikę ulicznej sygnalizacji świetlnej. Czerwone światło oznacza zahamowanie cyklu komórkowego, za co w prawidłowych komórkach odpowiada **p16** – marker antyproliferacyjny (białko supresorowe). Zielone światło to progresja cyklu komórkowego czego wskaźnikiem jest białko **Ki-67** – marker proliferacji. Jednocześnie zapalone czerwone i zielone światło (brązowa cytoplazma i czerwone jądro czyli w teście **CINtec PLUS** komórka pozytywna) to sygnał dysregulacji cyklu komórkowego - wysoce prawdopodobny jest proces transformacji nowotworowej komórki zainfekowanej przez HPV-HR.

3 Schemat działania CINtec PLUS

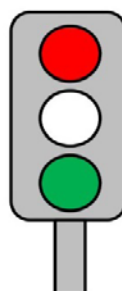
Przewaga jednoczesnej detekcji p16 i Ki-67



▪ **p16** hamuje cykl komórkowy

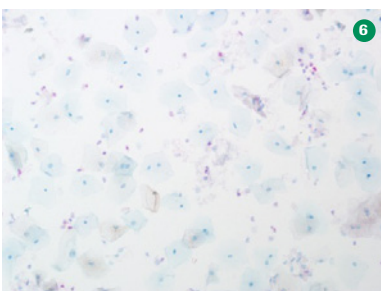
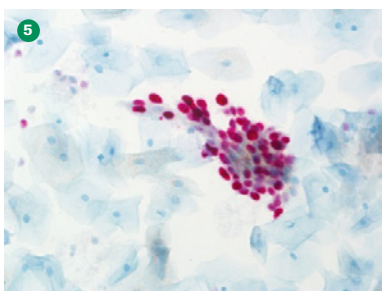
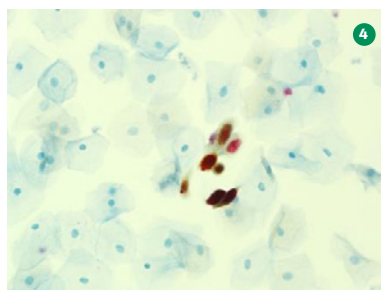
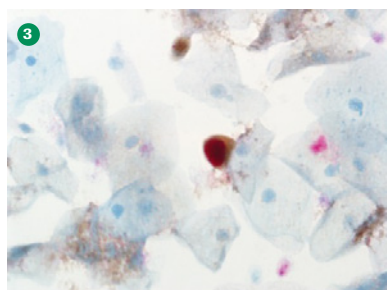
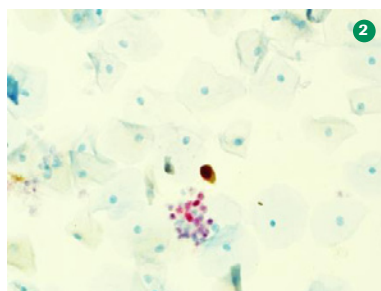
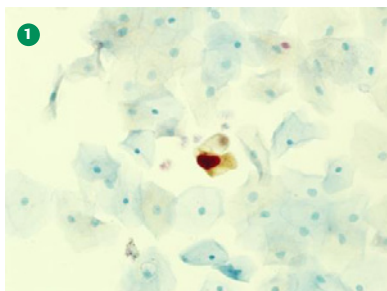


▪ **Ki-67** wskazuje na progresję cyklu komórkowego i proliferację



▪ **Komórka utraciła samokontrolę!**
Koekspresja wskazuje na dysregulację cyklu komórkowego

Przykłady obrazów mikroskopowych z zastosowaniem **CINtec PLUS** – materiały własne.



Opublikowanych zostało kilka badań klinicznych walidujących użyteczność testu **CINtec PLUS** w identyfikacji pacjentek HSIL+/CIN2+ z wcześniejszym potwierdzonym pozytywnym statusem HPV-HR lub rozpoznaniem cytologicznym ASC-US lub LSIL, m. in. wieloośrodkowe badania PALMS i EEMAPS czy Waldstroma, Wentzensena i Kileena ze współautorami. We wszystkich badaniach test wykazywał zbliżoną czułość, ale wyższą swoistość dla rozpoznań cytologicznych ASC-US (odpowiednio do 94 i 80 %) w porównaniu z LSIL (do 94 i 68 %). Potwierdzono jego porównywalną z pozytywnym statusem HPV-HR czułość (HPV do 96 %), ale znacznie wyższą swoistość (HPV dla ASC-US do 36 % a dla LSIL do 19 %, wartości dla testu **CINtec PLUS** powyżej). Dodatkowym, klinicznie interesującym, zastosowaniem testu **CINtec PLUS** jest potwierdzona badaniem Wolfsburg (Petry i współautorzy) skuteczna identyfikacja pacjentek z prawidłowym wynikiem cytologii (NILM) i pozytywnym statusem HPV-HR, ale z wysokim ryzykiem HSIL+/CIN2+. Wskazuje się na możliwość zastosowania testu **CINtec PLUS** wykrywania pacjentek z wyższym ryzykiem HSIL+/CIN2+ (z aktualnie potwierdzonym histopatologicznie rozpoznaniem CIN1 lub NIL).

1 Barwienie CINtec PLUS – wynik pozytywny

Pacjentka z rozpoznaniem **ASC-US** w cytologii konwencjonalnej oraz pozytywnym **typem 16 hr-HPV**. W biopsji **HSIL/CIN3**.

2 Barwienie CINtec PLUS – wynik pozytywny

Pacjentka z rozpoznaniem **ASC-US** w cytologii konwencjonalnej oraz pozytywnym **typem 16 hr-HPV**. W biopsji **HSIL/CIN3**.

3 Barwienie CINtec PLUS – wynik pozytywny

Pacjentka z rozpoznaniem **LSIL** w cytologii płynnej oraz pozytywnym **typem 16 hr-HPV**. W biopsji **HSIL/CIN2**.

4 Barwienie CINtec PLUS – wynik pozytywny

Pacjentka z rozpoznaniem **ASC-US** w cytologii konwencjonalnej oraz pozytywnym **typem 16 hr-HPV**. W biopsji **HSIL/CIN3**.

5 Barwienie CINtec PLUS – wynik negatywny

Pacjentka z rozpoznaniem **LSIL** w cytologii płynnej oraz pozytywnymi **typami nie-16 i nie-18 hr-HPV**. W biopsji **LSIL/CIN1**. Widoczne czerwone wybarwienie jąder komórkowych przez Ki-67.

6 Barwienie CINtec PLUS – wynik negatywny

Pacjentka z rozpoznaniem **LSIL** w cytologii płynnej oraz pozytywnymi **typami nie-16 i nie-18 hr-HPV**. W biopsji **LSIL/CIN1**. Widoczne jedynie lekko podbarwione przez Ki-67 granulocyty.

Przytaczając wyniki największych wieloośrodkowych badań (PALMS, EEMAPS i Wolfsburg) czułość i swoistość testu **CINtec PLUS** dla CIN2+ w selekcji pacjentek z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US i LSIL przedstawia poniższa tabela.

CINtec PLUS dla rozpoznań	czułość	swoistość
ASC-US	92-94 %	78-81 %
LSIL	85-94 %	54-68 %

Mniejsze badanie Wentzensena porównuje z kolei skuteczność fenotypowania HPV, genotypowania dla typów 16 i 18 HPV oraz **podwójnego barwienia p16/Ki-67** dla CIN2+.

	pozytywny status hr-HPV	pozytywne typy 16 i 18 HPV	pozytywny wynik barwienia 16/Ki-67
czułość	94 %	48 %	86 %
swoistość	32 %	81 %	59 %
dodatnia wartość predykcijna (PPV)	38 %	77 %	90 %
ujemna wartość predykcijna (NPV)	91 %	53 %	45 %

Test CINtec PLUS optymalizuje czułość, swoistość i wartość predykcijną dla rozpoznań HSIL+/CIN2+, ponadto jest markerem choroby, a nie zakażenia. Może być skuteczny:

- prawdopodobnie także w przypadkach raków HPV-niezależnych (uwidacznia dysregulację w komórce a nie proces infekcji),
- niezależnie od wieku badanej (także w grupie kobiet młodych z największym ryzykiem infekcji i najwyższym prawdopodobieństwem wycofania zakażenia)
- oraz niezależnie od doświadczenia i umiejętności osoby oceniającej cytologię ponieważ test nie uwzględnia szczegółowej oceny morfologii komórkowej (prostsza ocena a tym samym proces edukacji).

Doświadczenie diagnostyczne autora oparte jest na ocenie ponad 250 testów połączonych wykonanych przez współpracującą placówkę w 2014 roku zgodnie ze schematem opisanym poniżej, z czego ponad 150 została dodatkowo zweryfikowana testem **CINtec PLUS** (immunocytochemia p16/Ki-67).

*Piśmiennictwo dostępne
w redakcji*



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
©2015 Roche Diagnostics

Przygotowanie do druku:
TAMKAPRESS