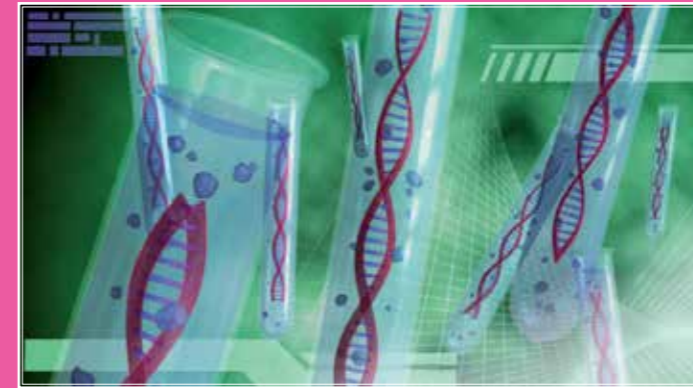




Diagnostyka laboratoryjna DNA HPV w profilaktyce raka szyjki macicy

Wydanie II



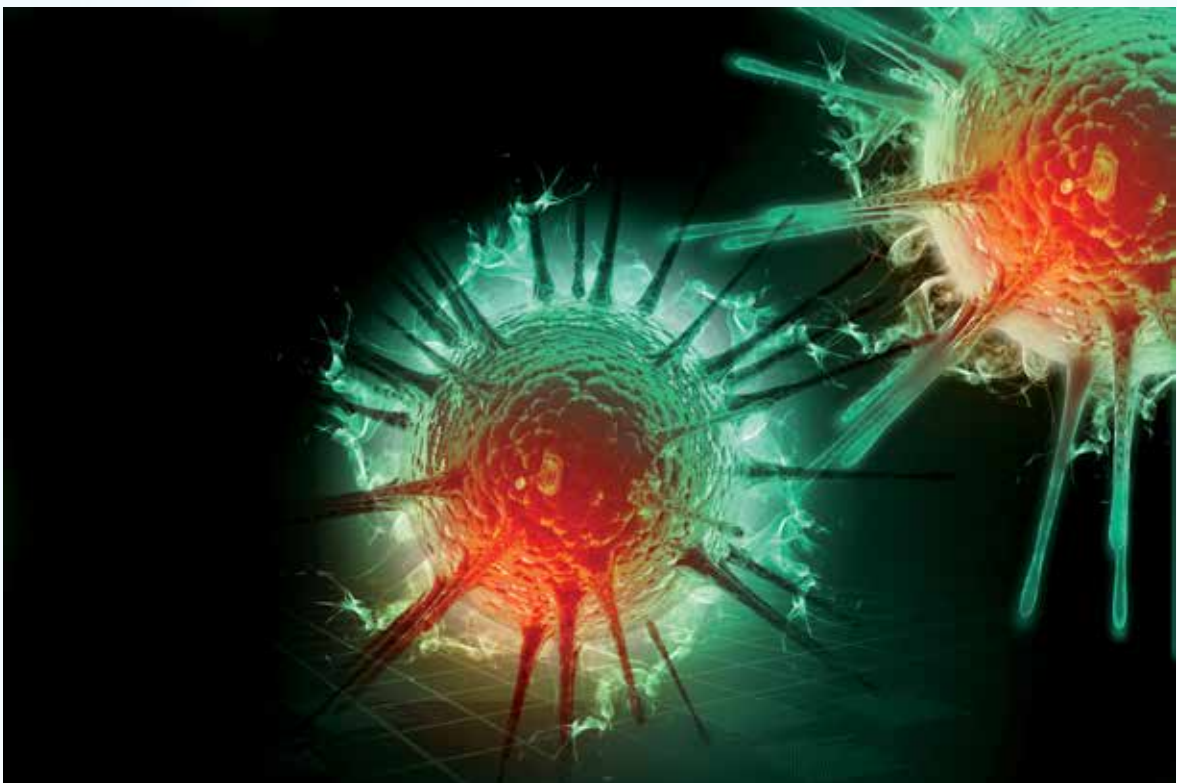
**Stanowisko ekspertów Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego
i Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych**

dr Agata Józefiak¹, dr Elżbieta Puacz¹, prof. dr hab. Witold Kędzia²,
prof. dr hab. Jan Kotarski², prof. dr hab. Ryszard Poręba²

¹ Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych
² Polskie Towarzystwo Ginekologiczne

Rak szyjki macicy jest jednym z najczęściej występujących nowotworów u kobiet. Każdego roku stwierdza się go u około 3500 Polek, z czego ponad połowa umiera. Możliwość zmiany tej niechlubnej statystyki daje skutecznie prowadzony program profilaktyczny. W Polsce program ten opiera się przede wszystkim na skriningu cytologicznym oraz na dalszej diagnostyce i leczeniu wykrytych zmian.

Głównym czynnikiem w etiologii raka szyjki macicy jest ludzki wirus brodawczaka HPV (ang. – *Human Papillomavirus*). Uważa się, że jest on czynnikiem niezbędnym w rozwoju raka szyjki macicy. Jego obecność stwierdza się w praktycznie 100% inwazyjnych raków szyjki macicy, 75% zmian przednowotworowych oraz w około 15% prawidłowych cytologiach szyjki macicy.



Identyfikacja DNA HPV

Dotychczas poznano 200 różnych typów wirusa HPV. Grupę tę można podzielić na typy: α , β , γ , Mu i Nu, z czego 60 typów wirusa atakującego nabłonek szyjki macicy zalicza się do grupy α , a około 30 jest związanych ze zmianami nabłonka, prowadzącymi do rozwoju raka szyjki macicy. Jednak tylko część spośród wspomnianych genotypów wirusa przenoszonych drogą płciową jest związana z dysplazją wysokiego stopnia oraz rakiem szyjki macicy. Z uwagi na ich zróżnicowany potencjał onkogenny, wyróżnia się wirusy HPV wysokiego ryzyka (HR – ang. *high risk*) – HPV 16, HPV 18, HPV 31, HPV 33 i HPV 45, które są związane z przeszło 80% przypadków nowotworu szyjki macicy, oraz wirusy o niskim potencjale onkogennym (LR – ang. *low risk*) – HPV 6 i HPV 11, które są związane z łagodnymi zmianami śródnabłonkowymi niższego stopnia lub z rozwojem kłykcin kończystych. Wirusy należące do grupy β infekują skórę, natomiast pozostałe wirusy (grupy γ , Mu i Nu) są odpowiedzialne za powstanie brodawek, które z reguły nie ulegają transformacji nowotworowej.

Zakażenie przenoszone drogą płciową wirusem HPV jest niezwykle częste. Szacuje się, że aż 75% kobiet narażonych jest na kontakt z tym wirusem. Jednak w ponad 90% dochodzi do zaniku infekcji w wyniku skutecznej odpowiedzi ze strony układu immunologicznego. Jakkolwiek za najbardziej niebezpieczne należy uznać przetrwałe zakażenie typami HPV 16 i 18 tj. utrzymujące się co najmniej 24 miesiące. Pozostałe wirusy HPV wysokiego ryzyka są rzadziej identyfikowane w komórkach nowotworowych i ich potencjał onkogenny jest słabszy.

Ze względu na obecność DNA HPV HR w blisko 100% raków szyjki macicy, molekularna diagnostyka wirusologiczna niesie nowe możliwości i jest bardzo użytecznym narzędziem diagnostycznym w skryningu nowotworowym. Testy DNA HPV posiadają wysoką czułość, co umożliwia wykrycie patologii już na bardzo wczesnym etapie możliwym do wyleczenia.

Niedoskonałością molekularnych testów DNA HPV jest ich niska swoistość.

W grupie kobiet poniżej 30 roku życia w większości przypadków mamy do czynienia zakażeniem przejściowym, które samoistnie zanika nie prowadząc do rozwoju patologii szyjki macicy. Dlatego w tej grupie wiekowej nie rekomenduje się testu DNA HPV jako testu skryningowego.



Standardy jakości w zakresie diagnostyki DNA HPV

Prawidłowo wykonane badanie laboratoryjne pozwala na podjęcie właściwych decyzji terapeutycznych. Błędy powstałe na etapie pobrania wymazu, transportu czy wykonania badania powodują uzyskanie wyników fałszywie negatywnych lub fałszywie pozytywnych.



Pobieranie i transport wymazu z szyjki macicy do badań DNA HPV

Formularz zlecenia badania oraz szczegółowe instrukcje dotyczące pobierania, przechowywania i transportu próbek dostarcza medyczne laboratorium diagnostyczne wykonujące badanie DNA HPV. Zaleca się do formularza zlecenia dołączyć wynik badania cytologicznego i/lub histopatologicznego.

Rekomenduje się, aby wymaz z szyjki macicy został pobrany jałową szczoteczką obejmującą strefę przekształceń i częściowo wchodzącą do kanału. **Szczoteczkę należy umieścić centralnie w ujściu zewnętrznym kanału szyjki macicy i pięciokrotnie obrócić wokół własnej osi.** Następnie, o ile producent testu diagnostycznego nie zaleca inaczej, celem pozostawienia możliwie jak największej ilości materiału komórkowego do badania – zebrany materiał najlepiej zawiesić w podłożu transportowym do płynnej cytologii i testu HPV oraz starannie wypłukać uciskając o dno pojemnika. **Nie należy pozostawiać szczoteczki w podłożu do badania.** Tak pobrane komórki z szyjki macicy są bardzo dobrze zakonserwowane, co umożliwia przechowywanie materiału w temperaturze po-

kojowej (15-30°C) bez negatywnego wpływu na wynik badania. Zamknięty pojemnik z materiałem komórkowym zawieszonym w płynnym podłożu transportowym powinien być przechowywany zgodnie z wytycznymi producenta. Należy pamiętać, iż **system pobierania i transportu**, celem uniknięcia błędów przedanalizacyjnych i zapewnienia wiarygodnych wyników, **musi być zawsze walidowany ze stosowanym testem diagnostycznym**.

Pojemnik z pobranym wymazem powinien zawierać następujące dane pacjenta: imię i nazwisko, PESEL oraz datę pobrania lub kod paskowy. Materiał jest transportowany w zamkniętych probówkach, pojemnikach lub w zamkniętym opakowaniu zbiorczym, oznakowanym jako „materiał zakaźny”.

Medyczne laboratorium diagnostyczne stosuje metody badawcze, które odpowiadają aktualnej wiedzy medycznej i zostały odpowiednio walidowane przez laboratorium.



Wykrywane genotypy

Testy DNA HPV stosowane w profilaktyce raka szyjki macicy powinny wykrywać możliwie jak najwięcej z 14 genotypów wysokiego ryzyka (HR): 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68. Ze względu na dobór dalszego postępowania diagnostycznego niezbędna jest identyfikacja typów HPV 16 i 18. Genotypy HPV niskiego ryzyka często wiążą się z łagodnymi zmianami śród nabłonkowymi niższego stopnia lub z rozwojem kłykcin kończystych, dlatego też w badaniach profilaktycznych raka szyjki macicy nie stosuje się testów HPV wykrywających typy niskiego i średniego ryzyka.

Czułość kliniczna testu DNA HPV

Cechą większości testów do wykrywania DNA HPV HR jest wysoka czułość analityczna, ale niska swoistość w wykrywaniu śród nabłonkowej neoplazji szyjki macicy stopnia (\geq CIN 2). Z tego powodu pozytywny wynik DNA HPV nie pozwala na odróżnienie zakażenia trwałego od przejściowego i ustalenie dalszego postępowania diagnostycznego (powtórzenie badania oraz kolposkopia i biopsja).

Zaleca się, aby test DNA HPV HR przeznaczony do badań skriningowych kobiet \geq 30 r.ż. był walidowany klinicznie i posiadał potwierdzoną czułość i swoistość kliniczną w wykrywaniu zmian \geq CIN 2 ze skutecznością \geq 90%. Czułość kliniczna potwierdza, że test wykrywa analizowane typy HPV na klinicznie istotnych poziomach zakaźności.

Wyniki fałszywie negatywne

Zbyt mała ilość komórek pobranych do badania lub nieprawidłowe przechowywanie i warunki transportu próbki oraz błędy analityczne mogą prowadzić do uzyskania wyniku fałszywie negatywnego. W molekularnej diagnostyce DNA HPV należy stosować testy posiadające kontrolę, która stanowi ocenę poprawności: pobrania wymazu, przeprowadzenia procesu ekstrakcji oraz amplifikacji DNA i zabezpiecza przed uzyskaniem fałszywie ujemnego wyniku.



Wyniki fałszywie pozytywne

Wysoka czułość metod molekularnych wykrywających DNA HPV niesie ze sobą ryzyko wyników fałszywie pozytywnych z powodu zanieczyszczenia próbki badanej przez niewielkie ilości DNA innych pacjentów. Stąd zaleca się stosowanie testów zawierających enzymatyczne zabezpieczenia przed kontaminacją (np. UNG i dUTP).

Wymagania dotyczące testów diagnostycznych i aparatury

Testy stosowane do wykrywania DNA HPV, system do pobierania wymazu i podłoże transportowe oraz wykorzystywana do diagnostyki medycznej *in vitro* aparatura **muszą spełniać wymagania określone w ustawie o wyrobach medycznych**.

Bazę danych o wyrobach medycznych dopuszczonych do używania w Rzeczypospolitej Polskiej prowadzi Prezes Urzędu Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych.

Prezes Urzędu udziela informacji publicznej o zawartości bazy na wniosek producenta lub laboratorium, stąd zaleca się weryfikację czy usługodawca spełnia wymagania gwarantujące jakość oferowanego produktu.

Testy komercyjne

Producent testu jest odpowiedzialny za przeprowadzenie walidacji i wykonuje stosowne badania kliniczne pozwalające na dopuszczenie testu do stosowania w diagnostyce medycznej *in vitro*. Walidacja obejmuje stosowane podłoże transportowe, test diagnostyczny oraz wykorzystywaną aparaturę. Dodatkowo dla metod komercyjnych (opracowanych i opisanych przez producenta) laboratorium medyczne wykonuje ocenę precyzji i poprawności.

Użytkownik jest zobowiązany do przestrzegania instrukcji używania testu i aparatury dostarczonej przez producenta oraz podanej w niej interpretacji wyników. Modyfikacje użytkownika w procedurze wykonania badania wymagają walidacji przez medyczne laboratorium diagnostyczne.

Testy wytworzone przez laboratorium

Stosowanie testów wytworzonych przez laboratorium (typu *in-house*, *home-made*) jest możliwe wyłącznie po przeprowadzeniu pełnej walidacji i spełnieniu odpowiednich wymagań, które są określone w rozporządzeniu Ministra Zdrowia. Spełnienie wymagań jakościowych musi być potwierdzone wpisem do bazy prowadzonej przez Prezesa Urzędu Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych.



Przedstawianie i wydawanie wyników badań DNA HPV

Formularz sprawozdania z badania DNA HPV prowadzony jest zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 23.03.2006 r. w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych [Dz.U nr 61. poz 435 z późn. zm.] i zaleca się by był **autoryzowany przez diagnostę laboratoryjnego lub lekarza, posiadających tytuł specjalisty z laboratoryjnej genetyki medycznej lub mikrobiologii medycznej** oraz legitymujących się **co najmniej dwuletnim doświadczeniem w diagnostyce molekularnej**. Formularz sprawozdania z badania laboratoryjnego może być przekazany w formie elektronicznej z zachowaniem wymagań prawnych. Medyczne laboratorium diagnostyczne archiwizuje wyniki przez czas określony w przepisach dokumentacji medycznej tj. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 21.12.2010 r. w sprawie dokumentacji medycznej.



Wymagania dotyczące laboratorium

Laboratorium musi spełniać standardy jakości podane w rozporządzeniu Ministra Zdrowia z dnia 23.03.2006 r. w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych. W szczególności opracowuje, wdraża i stosuje procedury przyjmowania, rejestrowania i laboratoryjnego oznakowania materiału do badań, a następnie udostępnia je zleceniodawcom, którzy potwierdzają zapoznanie się z tymi procedurami. Laboratorium diagnostyki medycznej musi prowadzić wewnętrzną kontrolę jakości badań i uczestniczyć w zewnętrznej kontroli jakości co najmniej raz w roku zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia. Dokumentacja kontroli jakości badań jest przechowywana przez okres 20 lat zgodnie z przepisami dotyczącymi dokumentacji medycznej. Dla zapewnienia wymaganej jakości wykonywanych badań medyczne laboratorium diagnostyczne jest zobowiązane do wykonania minimum 100 badań DNA HPV rocznie.



Piśmiennictwo

1. A. Anttila, L. Kotaniemi, M. Leinonen i wsp., „Rate of cervical cancer, severe intraepithelial neoplasia, and adenocarcinoma in situ in primary HPV DNA screening with cytology triage: randomized study within organized screening programme”, „BMJ” nr. 340, s. 1014.
2. F. M. Carozzi, A. DelMistro, M. Confortini i wsp., „Reproducibility of HPV DNA testing by Hybrid Capture 2 in screening setting”, „Am. J. Clin. Pathol.” nr. 124, s. 716-721.
3. P. E. Castle, C. M. Wheeler, D. Solomon i wsp., „ALTS Group Interlaboratory reliability of Hybrid Capture 2”, „Am. J. Clin. Pathol.” nr. 122, s. 238-245.
4. J. Dillner, M. Roboli, P. Birembaut i wsp., „A long-term predictive values of cytology and human papillomavirus testing in cervical cancer screening: joint European cohort study”, „BMJ” nr. 337, s. 1754.
5. H. A. Katki, W. K. Kinney, B. Fettman i wsp., „Cervical cancer risk for women undergoing concurrent testing for human papillomavirus and cervical cytology: a population-based study in routine clinical practice”, „Lancet Oncol.” nr. 12, s. 663-672.
6. W. Kinney, M. H. Stoler, P. E. Castle, „Special commentary: patient safety and the next generation of DNA HPV tests”, „Am. J. Clin. Pathol.” nr. 134, s. 193-199.
7. C. J. Meijer, J. Berkhof, P. E. Castle i wsp., „Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older”, „Int. J. Cancer” nr. 124, s. 516-520.
8. N. Munoz, X. Bosch, S. de Sanjose i wsp., „Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer”, „N. Eng. J. Med.” nr. 348, s. 518-527.
9. G. Ronco, P. Giorgi-Rossi, F. Carozzi i wsp., „New technologies for Cervical Cancer Screening (NTCC) Working Group. Efficacy of human papillomavirus testing for the detection of invasive cervical cancers and cervical intraepithelial neoplasia: a randomized controlled trial”, „Lancet Oncol.” nr. 11, s. 249-257.
10. D. Saslow, D. Solomon, H. W. Lawson i wsp., „American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology Screening Guidelines for the Prevention and Early Detection of Cervical Cancer”, „Am. J. Clin. Pathol.” nr. 136, s. 516-542.
11. M. H. Stoler, P. E. Castle, D. Solomon i wsp., „American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. The expanded use of HPV testing in gynecologic practice per ASCCP-guided management requires the use of well-validated assays”, „Am. J. Clin. Pathol.” nr. 127, s. 335-337.
12. M. H. Stoler, T. C. Wright, A. Sharma, G. Zhang, R. Apple, T. L. Wright, C. M. Behrens, „The Interplay of age stratification and HPV testing on the predictive value of ASC-US cytology”, „Am. J. Clin. Pathol.” nr. 137, s. 295-303.
13. J. M. Walboomers, M. V. Jacobs, M. M. Mason i wsp., „Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cancer worldwide”, „J. Pathol.” nr. 189, s. 12-19.
14. Ustawa o zawodach lekarza i lekarza dentystry z dnia 5 grudnia 1996 r.
15. Ustawa o diagnostyce laboratoryjnej z dnia 27 lipca 2001 r.
16. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 3 marca 2004 r. w sprawie wymagań, jakim powinno odpowiadać medyczne laboratorium diagnostyczne.
17. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 21 stycznia 2009 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych.
18. Ustawa o wyrobach medycznych z dnia 20 maja 2010 r.
19. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 21 grudnia 2010 r. w sprawie dokumentacji medycznej.
20. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 12 stycznia 2011 r. w sprawie wymagań zasadniczych oraz procedur oceny zgodności wyrobów medycznych do diagnostyki in vitro.
21. Ustawa o działalności leczniczej z dnia 15 kwietnia 2011 r.