



Wytyczne dotyczące aplikacji testów molekularnych identyfikujących DNA HPV HR w profilaktyce raka szyjki macicy. Stanowisko ekspertów PTG i KIDL

Wytyczne dotyczące aplikacji testów molekularnych identyfikujących DNA HPV HR w profilaktyce raka szyjki macicy. Stanowisko ekspertów PTG i KIDL

- **dr Agata Józefiak** – Poznań
- **prof. dr hab. Witold Kędzia** – Poznań
- **prof. dr hab. Jan Kotarski** – Lublin
- **prof. dr hab. Ryszard Poręba** – Tychy
- **dr Elżbieta Puacz** – Lublin
- **prof. dr hab. Marek Spaczyński** – Poznań

1. Wprowadzenie

Konsekwentny, populacyjny skrining cytologiczny ogranicza istotnie zachorowalność i umieralność na raka szyjki macicy na świecie. W krajach, gdzie wieloletnie programy profilaktyczne, oparte o kontrolowaną pod względem jakości cytodiagnostykę, objęły co najmniej 2/3 populacji kobiet, osiągnięto spektakularny spadek zachorowalności na raka szyjki macicy o 80% i umieralności o 70%.

Niedoskonałości profilaktyki cyto-onkologicznej raka szyjki macicy wynikają z:

- wykrywania patologii na etapie zmian morfologicznych, a nie molekularnych,
- niesatysfakcjonującej czułości i swoistości identyfikacji patologii nabłonka płaskiego, a w szczególności raka gruczołowego szyjki macicy,
- możliwości popełniania błędów technicznych i diagnostycznych,

- konieczności powtórnego badania w sytuacji niediagnostycznego rozmazu cytologicznego,
- konieczności częstego powtarzania badania,
- niemożności prognozowania rozwoju patologii.

2. Identyfikacja DNA HPV HR jako nowe narzędzie diagnostyczne w skriningu

Dotychczas poznano 200 różnych typów wirusa HPV (ang. *Human papillomavirus*).

Ze względu na zróżnicowany potencjał onkogeny wirusów HPV oraz obecność DNA HPV HR, w blisko 100% badanych guzów nowotworowych szyjki, diagnostyka wirusologiczna staje się nowym narzędziem diagnostycznym w skriningu onkologicznym.

Do niewątpliwych zalet diagnostyki wirusologicznej należą:

- wykrywanie patologii już na etapie molekularnym,
- wysoka czułość identyfikacji wykrywania patologii szyjki macicy,
- możliwość automatyzacji diagnostyki wraz z kontrolą materiału komórkowego i przebiegu oznaczenia eliminuje w praktyce błędy techniczne i diagnostyczne,
- przy dwóch i więcej wynikach negatywnych umożliwia znaczące wydłużenie czasu między poszczególnymi wizytami skriningowymi,
- wyniki mają znaczenie prognostyczne.

Niedoskonałością diagnostyki wirusologicznej w skriningu raka szyjki macicy jest niska swoistość badań, szczególnie dla populacji kobiet do 30 roku życia. Wynika to z faktu, że zdecydowana większość kobiet aktywnych płciowo, w wieku do 30 roku życia, jest okresowo zakażona HPV HR, lecz są to w zdecydowanej większości zakażenia incydentalne, bez znaczenia dla rozwoju patologii szyjki macicy.

Kluczowymi zagadnieniami dotyczącymi aplikacji diagnostyki wirusologicznej DNA HPV HR opartej o wykorzystanie narzędzi biologii molekularnej są:

- wykorzystanie oznaczeń DNA HPV HR na etapie podstawowym skriningu, samodzielnie lub w powiązaniu z cytodiagnostyką,
- wykorzystanie oznaczeń DNA HPV HR na etapie pogłębionej interpretacji nieprawidłowych wyników oceny rozmazów cytologicznych jako doprecyzowanie wskazań do kolposkopii.

2.1. Aplikacja testów molekularnych identyfikujących DNA HPV HR w skriningu raka szyjki macicy

Aktualnie na świecie nie zaleca się stosowania diagnostyki DNA HPV HR jako samodzielnego narzędzia diagnostycznego skriningu. Opinię tę podtrzymuje również FDA (US Food and Drug Administration).

Ze względu na wysoką czułość identyfikacji zmian CIN 2+, czyli rzeczywistych stanów przedrakowych, szacowaną na ponad 90% walidowane klinicznie testy molekularne identyfikujące DNA HPV HR są rekomendowane jako element pierwotnego skriningu w powiązaniu z cytodiagnostyką.

Skrining cytologiczny powinien być rozpoczynany między 21 (np. USA), a 25 rokiem życia (np. Polska) i obejmować populację do 65 roku życia.

2.1.1. Aplikacja testów DNA HPV HR w skriningu raka szyjki macicy dla populacji kobiet między 21 a 29 rokiem życia.

Aktualnie, podobnie jak dla całej populacji również dla kobiet między 21 a 29 rokiem życia nie zaleca się stosowania testów DNA HPV HR jako samodzielnego narzędzia badań przesiewowych. Analogiczna opinia dotyczy oparcia skriningu o test połączony, czyli cytodiagnostyka wraz z testem DNA HPV HR.

Zalecane jest wykorzystanie testów DNA HPV HR do diagnostyki kobiet z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US jako narzędzia walidującego to rozpoznanie. Kobieta z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US, DNA HPV HR +/- powinna bezwzględnie być poddana badaniu kolposkopowemu.

3.1.2. Aplikacja testów DNA HPV HR w skriningu raka szyjki macicy dla kobiet między 30 a 65 rokiem życia.

Aktualnie podobnie jak dla całej populacji również dla kobiet między 30 a 65 rokiem życia nie zaleca się stosowania testów DNA HPV HR jako samodzielnego narzędzia badań przesiewowych.

Natomiast dla tej populacji rekomenduje się i zaleca oparcie skriningu o test połączony, czyli wymaz cytologiczny wraz z testem na DNA HPV HR, wykonywane co 5 lat. Poprawną formą jest również postępowanie dotychczasowe czyli wymaz cytologiczny co 3 lata i aplikacja testów DNA HPV HR w sytuacji kobiet z rozpoznaniem ASC-US.

2.1.3. Aplikacja testów DNA HPV HR jako element diagnostyki pogłębionej u kobiet DNA HPV HR +/-, PAP +/- (dodatni wynik na obecność DNA wirusa HPV, prawidłowy wynik oceny rozmazu cytologicznego)

Rekomendowane są dwie możliwości diagnostyczne:

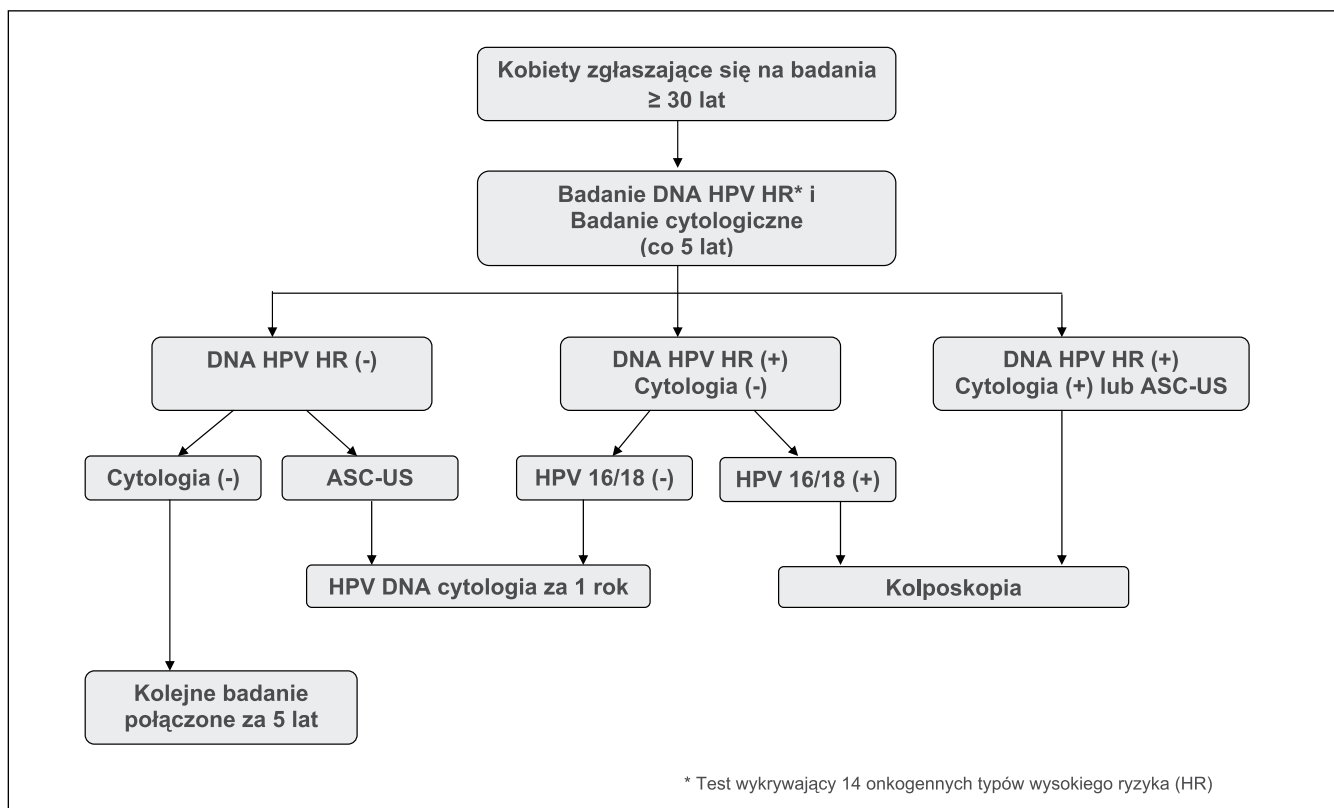
- powtórny test połączony za 12 miesięcy, w sytuacji DNA HPV HR +/- i co najmniej ASC-US należy wykonać kolposkopię, przy DNA HPV HR +/- i PAP +/- powrót do skriningu,
- wykonać genotypowanie typów HPV, w sytuacji 16, 18 HPV +/- należy wykonać kolposkopię, przy braku DNA HPV 16 i 18 powrót do skriningu.

2.2. Postępowanie w sytuacji wyniku testu połączonego DNA HPV HR +/- i rozpoznaniu cytologicznym ASC-US.

Zgodnie z obowiązującymi obecnie rekomendacjami zaleca się wykonanie wymazu cytologicznego za 12 miesięcy.

2.3. Aplikacja testów DNA HPV HR w wybranych sytuacjach klinicznych nieopisanych powyżej

- kobiety w wieku 65+, które mają dobrze udokumentowany udział w skriningu cytologicznym, bez incydentów rozpoznania patologii szyjki macicy lub czynników ryzyka jej wystąpienia, mogą być wyłączone z dalszego udziału w badaniach przesiewowych i nie wymagają aplikacji testów DNA HPV HR.
- kobiety w wieku 65+, które mają udokumentowany incydent rozpoznania patologii szyjki macicy, powinny brać udział w skriningu z wykorzystaniem testu połączonego przez okres 20 lat po zakończeniu leczenia lub samoistnej regresji zmiany, nawet jeśli ukończyły 65 lat.
- kobiety po operacji usunięcia macicy wraz z szyjką powinny być wyłączone z rutynowego skriningu, nie wymagają rutynowej aplikacji testów DNA HPV HR.
- kobiety, które przebyły leczenie CIN 2+ wymagają 5-letniej kontroli. Jednym z elementów tej kontroli powinien być test połączony wykonany podczas pierwszej wizyty, 3 miesiące po zakończeniu leczenia. Każdy wynik, co najmniej ASC-US lub DNA HPV 16 i/lub 18 +/- powinien być wskazaniem do wykonania badania kolposkopowego. Wykrycie zakażenia wywołanego innym typem wirusa powinno być wskazaniem do skrócenia czasu przerwy między poszczególnymi kontrolami.
- kobiety szczepione przeciwko HPV podlegają rutynowemu skriningowi według opisanych powyżej zasad dla poszczególnych populacji wiekowych.



3. Standardy jakości w zakresie diagnostyki DNA HPV, oceny jej jakości i wartości diagnostycznej oraz laboratoryjnej interpretacji i autoryzacji wyniku badań laboratoryjnego

3.1 Badania laboratoryjne

Wynik badania laboratoryjnego ma istotne znaczenie w wyborze dalszego postępowania z pacjentką. Stąd 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.

3.2. Pobieranie i transport wymazu szyjki macicy materiału do badań DNA HPV

Formularz zlecenia badania, szczegółowe instrukcje dotyczące pobierania, przechowywania i transportu próbek dostarcza laboratorium wykonujące badanie DNA HPV. Zaleca się by w formularzu zlecenia umieścić wynik badania cytologicznego i/lub histopatologicznego.

3.2.1. Pobieranie wymazu

Zaleca się by wymaz z szyjki macicy został pobrany jałową szczoteczką, obejmującą strefę przekształceń i wchodzącą częściowo 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, zebrany materiał najlepiej zawiesić w podłożu transportowym do płynnej cytologii i testu HPV

oraz starannie wypluć, uciskając o dno pojemnika celem pozostawienia możliwie jak największej ilości materiału komórkowego do badania. Nie należy pozostawiać szczoteczki w podłożu do badania. Tak pobrane komórki z szyjki macicy są bardzo dobrze zakonserwowane, co umożliwia przechowywanie materiału w temperaturze pokojowej (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 musi zawsze być walidowany ze stosowanym testem diagnostycznym, celem uniknięcia błędów przedanalizacyjnych i zapewnienia wiarygodnych wyników.

Pojemnik z pobranym wymazem powinien zawierać następujące dane pacjenta: Imię Nazwisko, PESEL oraz datę pobrania lub kod paskowy.

3.2.2. Transport materiału do badań laboratoryjnych

Materiał jest transportowany w zamkniętych próbkach lub pojemnikach, w zamkniętym opakowaniu zbiorczym, oznakowanym „materiał zakaźny”.

3.3. Metody badawcze

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

3.3.1. 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 16 i 18.

Genotypy HPV niskiego ryzyka często wiążą się z łagodnymi zmianami śród nabłonkowymi niższego stopnia lub z rozwojem kłykciny kończystych, dlatego też w badaniach profilaktycznych raka szyjki macicy nie stosuje się testów HPV wykrywających typy niskiego i średniego ryzyka.

3.3.2. Czułość kliniczna testu DNA HPV

Cechą większości testów do wykrywania DNA HPV HR jest wysoka czułość analityczna, ale niska swoistość w wykrywaniu \geq CIN2. Z tego powodu pozytywny wynik DNA HPV nie pozwala odróżnić 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 był walidowany klinicznie i posiadał potwierdzoną czułość i swoistość kliniczną w wykrywaniu zmian \geq CIN2, ze skutecznością równą lub wyższą niż 90%. Czułość kliniczna potwierdza, że test wykrywa typy wysokiego ryzyka na klinicznie istotnych poziomach zakaźności.

Testy nie spełniające powyższych kryteriów walidacji klinicznej nie powinny być używane, co pozwoli ograniczyć przypadki wykrycia DNA HPV na klinicznie nieistotnych poziomach zakaźności i uniknąć nieuzasadnionej kolposkopii.

3.3.3. Wyniki fałszywie negatywne

Zbyt mała ilość komórek pobranych do badania lub nieprawidłowe przechowywanie i warunki transportu próbek oraz błędy analityczne mogą prowadzić do uzyskania wyniku fałszywie negatywnego. W molekularnej diagnostyce DNA HPV należy stosować testy posiadające wewnętrzną kontrolę komórkową (np. amplifikacja i detekcja genu β -globiny), która stanowi ocenę poprawności: pobrania wymazu, przeprowadzenia procesu ekstrakcji oraz amplifikacji DNA i zabezpieczenia przed wydaniem wyniku fałszywie ujemnego.

3.3.4. 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 wydaniem wyniku fałszywie pozytywnego w następstwie kontaminacji (np. UNG i dUTP).

3.4. Wymagania dotyczące testów diagnostycznych i aparatury

Testy stosowane do wykrywania DNA HPV, system do pobierania wymazu i podłoże transportowe, oraz aparatura wykorzystywane do diagnostyki medycznej *in vitro* 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 wartości bazy na wniosek producenta lub laboratorium, stąd zaleca się weryfikację czy usługodawca spełnia wymagania gwarantujące jakość oferowanego produktu.

3.4.1. Zlecenie badania

Podmiot leczniczy jest obowiązany stosować wyroby medyczne, a lekarz może zlecać badania diagnostyczne przeprowadzane za pomocą wyrobów medycznych.

3.4.2. 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) wykonuje ocenę precyzji i poprawności.

Użytkownik jest obowiązany 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 laboratorium.

3.4.3. 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 zasadniczych, określonych 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.

3.5. Przedstawianie i wydawanie wyników badań DNA HPV

Formularz sprawozdania z badania DNA HPV, prowadzony jest zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia i autoryzowany przez diagnostę laboratoryjnego, posiadającego tytuł specjalisty z laboratoryjnej genetyki medycznej lub mikrobiologii medycznej i legitymujących się co najmniej 2 letnim doświadczeniem w diagnostyce molekularnej.

Wytyczne dotyczące aplikacji testów molekularnych identyfikujących DNA HPV HR w profilaktyce raka szyjki macicy. Stanowisko ekspertów PTG i KIDL.

Formularz sprawozdania z badania laboratoryjnego może być przekazany w formie elektronicznej z zachowaniem wymagań prawnych.

3.6. Wymagania dotyczące laboratorium

Laboratorium musi spełniać standardy jakości podane w rozporządzeniu Ministra Zdrowia w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych, w szczególności:

- opracowuje, wdraża i stosuje procedury przyjmowania, rejestrowania i laboratoryjnego oznakowywania materiału do badań oraz udostępnia je zleceniodawcom, którzy potwierdzają zapoznanie się z tymi procedurami,
- prowadzi wewnętrzną kontrolę jakości badań i uczestniczy w zewnętrznej kontroli jakości, zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia.
- dla zapewnienia wymaganej jakości wykonywanych badań laboratorium jest obowiązane do wykonania minimum 100 badań DNA HPV rocznie.

13. Stoler M, Castle P, Solomon D, [et al.]. 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.* 2007, 127, 335-337.
14. Stoler M, Wright T, Sharma A, [et al.]. The Interplay of age stratification and HPV testing on the predictive value of ASC-US cytology. *Am J Clin Pathol.* 2012, 137, 295-303.
15. Walboomers J, Jacobs M, Mason M, [et al.]. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cancer worldwide. *J Pathol.* 1999, 189, 12-19.
16. Ustawa o działalności leczniczej z dnia 15 kwietnia 2011 r.
17. Ustawa o zawodach lekarza i lekarza dentystry z dnia 5 grudnia 1996 r.
18. Ustawa o wyrobach medycznych z dn. 20 maja 2010 r.
19. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 12 stycznia 2011 r. w sprawie wymagań zasadniczych oraz procedur oceny zgodności wyrobów medycznych do diagnostyki in vitro.
20. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 3 marca 2004 r. w sprawie wymagań, jakim powinno odpowiadać medyczne laboratorium diagnostyczne.
21. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 21 stycznia 2009 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych.

Piśmiennictwo

1. Anttila A, Kotaniemi L, Leinonen M, [et al.]. 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.* 2012, 340, 1804.
2. Carozzi F, DelMistro A, Confortini M, [et al.]. Reproducibility of HPV DNA testing by Hybrid Capture 2 in screening setting. *Am J Clin Pathol.* 2005, 124, 716-721.
3. Castle P, Wheeler C, Solomon D, [et al.]. ALTS Group Interlaboratory reliability of Hybrid Capture 2. *Am J Clin Pathol.* 2004, 122, 238-245.
4. Dillner J, Roboli M, Birembaut P, [et al.]. A long-term predictive values of cytology and human papillomavirus testing in cervical cancer screening: joint European cohort study. *BMJ.* 2008, 337, 1754.
5. Katki H, Kinney W, Fettman B, [et al.]. Cervical cancer risk for women undergoing concurrent testing for human papillomavirus and cervical cytology: a population-based study in routine clinical practice. *Lancet Oncol.* 2011, 12, 663-672.
6. Kinney W, Stoler M, Castle P. Special commentary: patient safety and the next generation of DNA HPV tests. *AMJ Clin Pathol.* 2010, 134, 193-199.
7. Meijer C, Berkhof J, Castle P, [et al.]. Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. *Int J Cancer.* 2009, 124, 516-520.
8. Munoz N, Bosch X, de Sanjose S, [et al.]. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003, 348, 518-527.
9. Pruski D, Frąszczak J, Iwaniec K, [et al.]. Assessment of frequency of regression and progression of mild cervical neoplasia – LG SIL in women with positive high-risk HPV DNA test result. *Ginekol Pol.* 2012, 83, 572-575.
10. Rokita W, Kędzia W, Pruski D, [et al.]. Comparison of the effectiveness of cytodiagnostics, molecular identification of HPV HR and CINtecPLUS test to identify LG SIL and HG SIL. *Ginekol Pol.* 2012, 83, 894-898.
11. Ronco G, Giorgi-Rossi P, Carozzi F, [et al.]. 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.* 2010, 11, 249-257.
12. Saslow D, Solomon D, Lawson H, [et al.]. 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.* 2012, 136, 516-542.