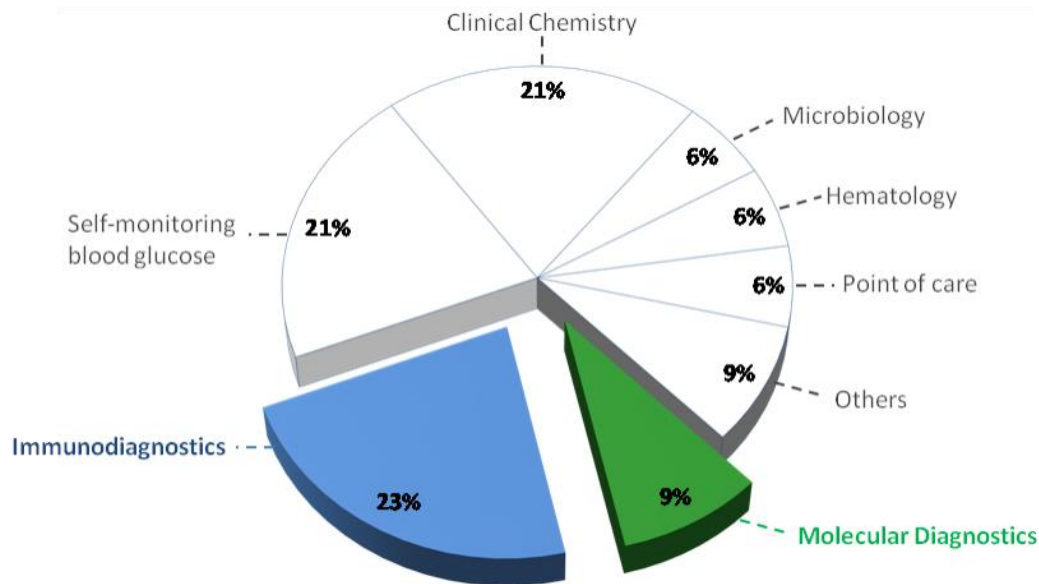


# Zastosowanie metod molekularnych w praktyce klinicznej zakażeń wirusowych

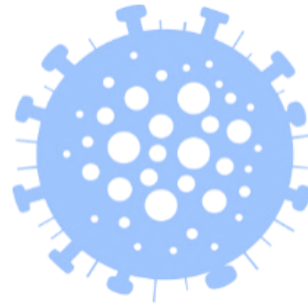
Zakład Immunopatologii Chorób Zakaźnych  
i Pasożytniczych

# Diagnostyka molekularna

Grupa testów diagnostycznych, które określają stan zdrowia pacjenta na poziomie molekularnym, wykrywających specyficzne sekwencje w DNA i RNA.



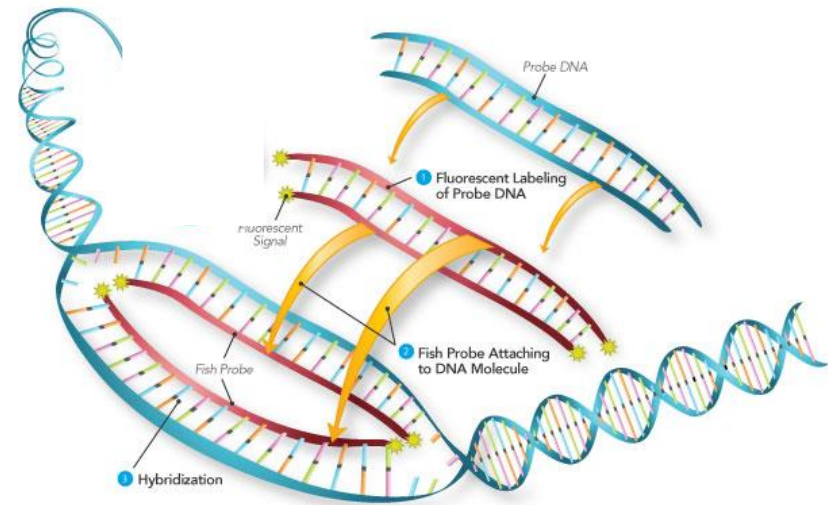
**Diagnostyka molekularna jest jedną z najbardziej dynamicznych dziedzin diagnostyki**



Identyfikacja wirusa w materiale  
klinicznym pacjenta i powiązanie z  
chorobą

# Klasyczne metody molekularne w wirusologii

- Dot-blot, Southern blot, hybrydyzacja in-situ.
- Zależne od specyficznych sond DNA/RNA.
- Specyficzność reakcji jest zależna od warunków hybrydyzacji
- Czułość ograniczona
- Czasochłonne, drogie, wymagające użycia radioaktywnego bądź fluorescencyjnego znacznika
- Znaczenie historyczne, nieużywane w laboratoriach rutynowych



# Metody detekcji kwasów nukleinowych (NAT)



- Bardzo duża czułość i specyficzność
- Szybsze, niż metody hodowli

Method	Target Amplification	Signal Amplification	Thermocycling	Sensitivity	Commercial Examples
PCR	Exponential	No	Yes	High	Roche Amplicor
LCR	No	Exponential	Yes	High	Abbot LCX
NASBA	Exponential	No	No	High	Organon Teknika
TMA	Exponential	No	No	High	Genprobe
Q $\beta$ -Replicase	No	Exponential	No	High	None
Branched DNA	No	Linear	No	Medium	Chiron Quantiplex

# *Metody namnażania materiału genetycznego*

- **Zalety:**
  - Bardzo duża czułość, detekcja od 10 genomów patogenu w ml płynu biologicznego (np. surowicy)
  - Duża specyficzność
  - Łatwe
  - Szybkie
  - Możliwość wykrycia materiału genetycznego patogenu w materiale biologicznym nawet po 1-2 dni od zakażenia (np. HCV RNA)
- **Wady:**
  - Bardzo podatna na zanieczyszczenia: rutynowe testy diagnostyczne (Roche Cobas Amplicor) wymagają minimalnej ingerencji operatora > ograniczenie ryzyka zanieczyszczeń;
  - Trudności interpretacji wyniku: odróżnienie fazy ostrej od przewlekłej zakażenia
  - Testy drogie

# Inhibitory reakcji PCR

- Mocz

- zawiera wiele inhibitorów reakcji PCR,
- wymagane rozcieńczenie materiału badanego.



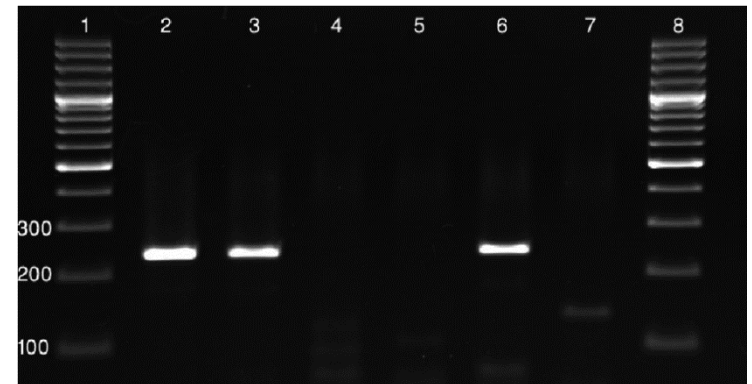
- Krew obwodowa

- antykoagulant – heparyna całkowicie hamuje amplifikację DNA (zalecany antykoagulant EDTA),
- związki porfirynowe pochodzące z hemu inhibitorami reakcji PCR – dobre oddzielenie erytrocytów od leukocytów, liza erytrocytów.



# Detekcja patogenów oparta o wykrywanie ich materiału genetycznego (NAT)

- ochrona krwi w centrach krwiodawstwa (HIV, HBV, HCV);
- potwierdzenie zakażenia (HCV)
- ochrona biorców przeszczepów narządów (CMV, EBV)
- Diagnostyka z wyboru u dzieci matek zakażonych (HIV) oraz osób z niedoborami odporności

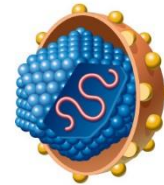


Detekcja fragmentu genomu  
5'UTR wirusa zapalenia  
wątroby typu C na żelu  
agarożowym



# Przykład: Zastosowanie PCR w diagnostyce zakażeń HCV

- Materiał genetyczny wirusa: RNA
- Metoda: ReverseTranscription-PCR (RT-PCR)
- Test: jakościowy



- czułość od 10-50 IU/ml
- HCV RNA wykrywalny w surowicy krwi już od dwóch dni po zakażeniu

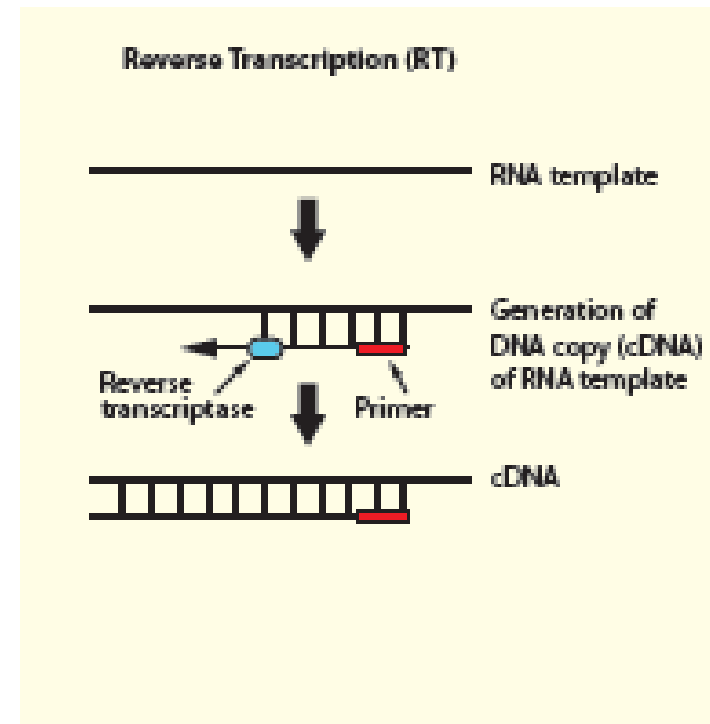
## Zastosowanie:

- Potwierdzenie ostrego lub przewlekłego zakażenia
- Rozróżnienie zakażenia aktywnego od przebytego
- Weryfikacja odpowiedzi na leczenie

## Interpretacja:

HCV RNA + u chorych z ostrym/przewlekłym zakażeniem  
HCV RNA – u niezakażonych, ozdowieńców oraz wyleczonych

Testy: COBAS AMPLICOR HCV TEST (Roche)



# Multiplex PCR – wykrywanie wielu patogenów jednocześnie

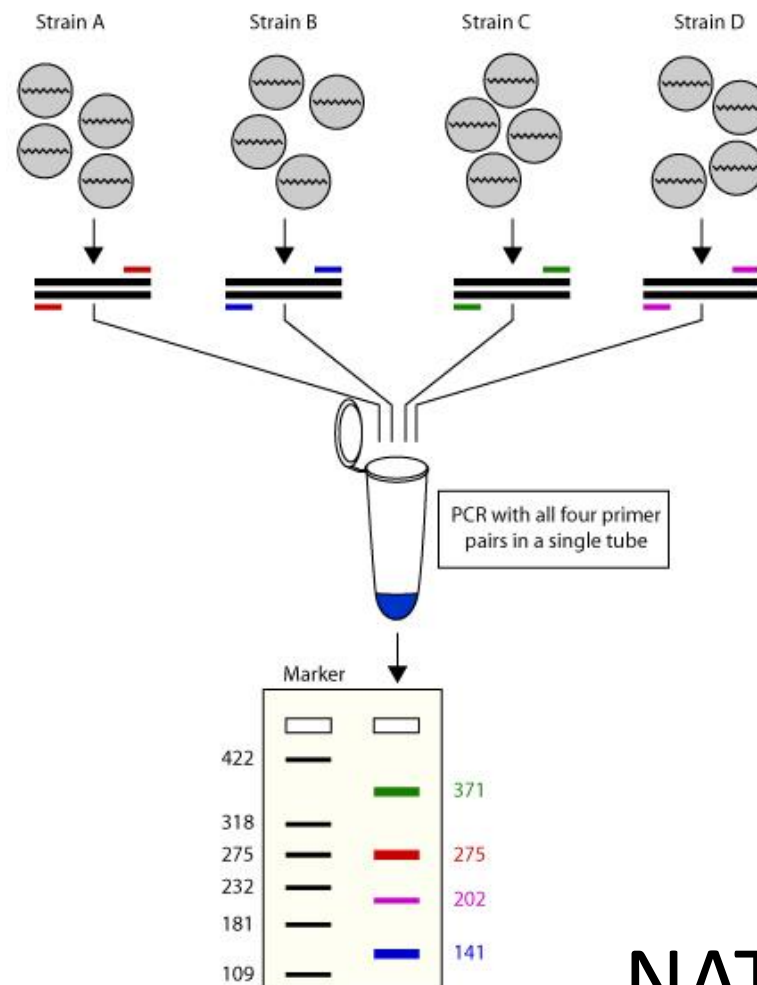
- Jednoczesna detekcja kilku sekwencji docelowych DNA przy użyciu kilku par primerów w tej samej mieszaninie reakcyjnej

Zastosowanie:

- Identyfikacja wielu patogenów w tym samym oznaczeniu PCR
- Zwiększenie szansy szybkiego wykrycia czynnika etiologicznego zakażenia
- Oznaczenia jakościowe/ilościowe

Dostępne oznaczenia komercyjne dla patogenów dróg oddechowych, ośrodkowego układu nerwowego, pokarmowego

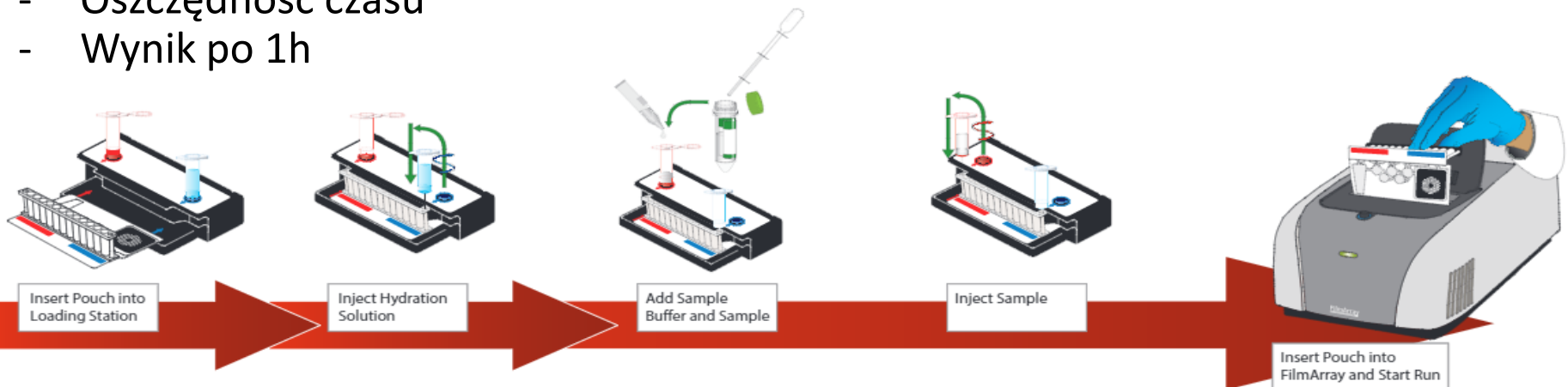
Możliwość jednoczesnego wykrycia bakterii, wirusów, pasożytów



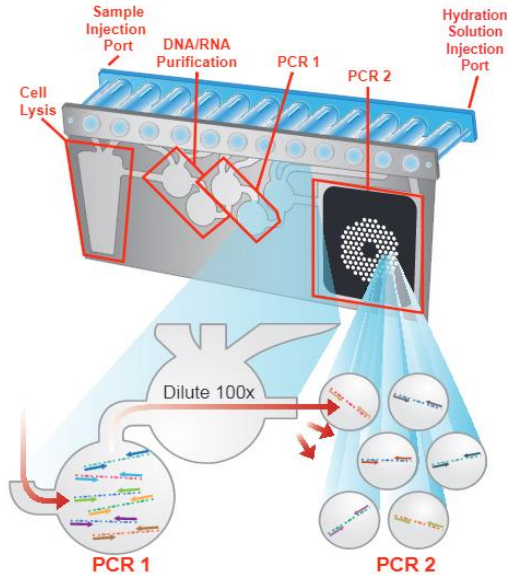
NAT

# Przykład: diagnostyka zapaleń mózgu

- Detekcja materiału genetycznego wirusa w płynie mózgowo-rdzeniowym (CSF) lub w bioptacie z mózgu (niewykorzystywane w rutynowej diagnostyce)
  - PCR/ qPCR: HSV-1, HSV-2, VZV, HHV-6, HHV-7, CMV, EBV, HIV, TBEV
  - Multiplexowy PCR (Array Meningitis / Encephalitis Panel)– jakościowa analiza 16 potencjalnych czynników etiologicznych (bakterie, wirusy, grzyby) w CSF
- Szeroki panel diagnostyczny
  - Brak konieczności izolacji kwasów nukleinowych
  - Procedura zautomatyzowana
  - 200µl CSF niezbędne do analizy
  - Oszczędność czasu
  - Wynik po 1h



# The FilmArray Meningitis / Encephalitis Panel



## FilmArray® Meningitis / Encephalitis (ME) Panel



www.BioFireDx.com

### Run Summary

Sample ID: 0417\_137

Run Date: 21 Apr 2014  
5:34 PM

Detected: Epstein-Barr virus  
Varicella zoster virus

Controls: Passed

**WARNING:** The FilmArray ME panel does not distinguish between latent and active herpesvirus infections (e.g., CMV, EBV, HHV8). Herpesvirus results should be used in conjunction with other clinical, laboratory, and epidemiological data.

### Result Summary

#### Bacteria

Not Detected *Escherichia coli* K1  
Not Detected *Haemophilus influenzae*  
Not Detected *Listeria monocytogenes*  
Not Detected *Neisseria meningitidis*  
Not Detected *Streptococcus agalactiae*  
Not Detected *Streptococcus pneumoniae*

#### Viruses

Not Detected Cytomegalovirus  
Not Detected Enterovirus  
✓ Detected Epstein-Barr virus  
Not Detected Herpes simplex virus 1  
Not Detected Herpes simplex virus 2  
Not Detected Human herpesvirus 6  
Not Detected Human parechovirus  
✓ Detected Varicella zoster virus

#### Yeast

Not Detected *Cryptococcus neoformans/gattii*

### Run Details

Pouch: ME Panel v1.4  
Run Status: Completed  
Serial No.: 01422247  
Lot No.: 140411A

Protocol: CSF v2.0  
Operator: Ashley Hunter (ah)  
Instrument: ITI FA "FA2430"

# Metody molekularne w diagnostyce wirusologicznej chorób układu oddechowego

Etiologia wirusowa ostrego zapalenia dróg oddechowych:

- Wirus grypy typu A
- Wirus grypy typu B
- Wirus paragrypy (wirus grypy rzekomej) – wszystkie typy
- Wirus RSV (Respiratory Syncytial Virus)
- Adenovirusy
- Rhinowirusy
- Koronawirusy
- Human bocavirus (HBoV)
- Enterowirusy


# Metody molekularne w diagnostyce wirusologicznej chorób układu oddechowego

- RT-PCR, NASBA
- LAMP+RT (Loop mediated isothermal amplification)
- RT-PCR – czułość diagnostyczna większa od 5 do 10% w porównaniu do metod hodowlanych (szczególnie w przypadku małej wiremii)
- Szereg testów opartych o metodę multipleks PCR :
  - **ResPlex II assay** (Qiagen); (12 wirusów)
  - **MultiCode-PLx RVP assay**, (EraGen Biosciences); (17 wirusów)
  - **Seeplex RV assay** (Seegene Inc.); (12 wirusów)
  - **NGEN RVA ASR kit** (Nanogen Inc); (12 wirusów)
  - **xTAG RVP assay** (Luminex Molecular Diagnostics); (19 wirusów)
  - **ProFLu+ assay** (Prodesse Inc.); (3 wirusy)

# Metody molekularne w diagnostyce wirusologicznej chorób układu pokarmowego

Wirusowe zakażenia układu pokarmowego:

- Rotawirusy (600 000 zgonów rocznie na świecie!!!)
- Astrowirusy
- Norowirusy
- Adenowirusy
- Human bocavirus, Human coronavirus, Enterovirus, Parechovirus, Aichi virus, Human cosavirus,



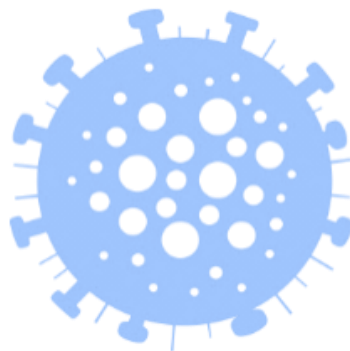
80% bez  
stwierdzonej  
etiologii

# Metody molekularne w diagnostyce wirusologicznej chorób układu pokarmowego

Dostępne na rynku panele diagnostyczne:

- xTAG Gastrointestinal Pathogen Panel:  
(*C. difficile*, **norovirus**, *E. coli*, *Salmonella*, **rotavirus A**, *Campylobacter*, *Shigella*)
- FilmArray Gastrointestinal Panel:  
(22 czynniki zakaźne, w tym **Adenovirus F40/41**, **Astrovirus**, **Norovirus GI/GII**, **Rotavirus A** **Sapovirus (I, II, IV and V)**)

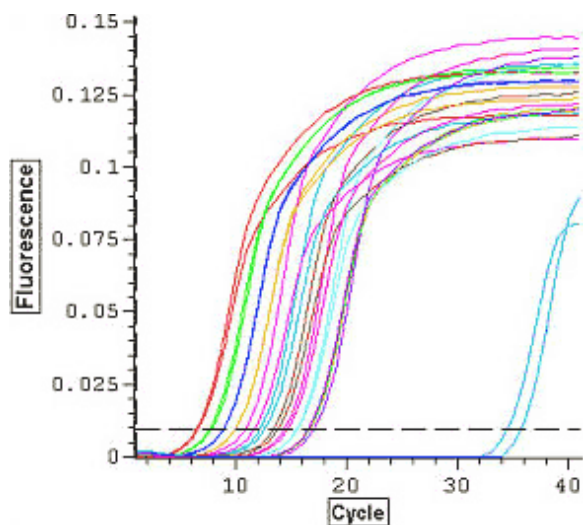




Ocena ilościowa wirusa

# Oznaczanie ilościowe kwasów nukleinowych

- Monitorowanie aktywności zakażenia
- Kwalifikacja do leczenia
- Monitorowanie efektywności leczenia
- Określanie skuteczności leczenia



qPCR – quantitative PCR = real-time PCR

# Przykład: HCV

## Oznaczenie wiremii (liczby kopii HCV RNA) w surowicy krwi

- **Metoda: qPCR**
  - Monitorowanie ostrego lub przewlekłego zakażenia;
  - Rozróżnienie zakażenia aktywnego od przebytego;
  - Kwalifikacja pacjenta do leczenia przeciwwirusowego;
  - Monitorowanie leczenia.

### ZAKRES BADANIA:

- Cobas Amplicor HCV Monitor v. 2 (qPCR);(Roche): 25 do 390 milionów IU/mL
- Abbott RealTime HCV Assay (qPCR); (Abbott): 12 IU/mL to 100 milionów IU/mL
- hermetyczność systemu (automatyzacja procesu, małe ryzyko zanieczyszczenia próbek)

# Przykład: HCV

## Monitorowanie aktywności zakażenia

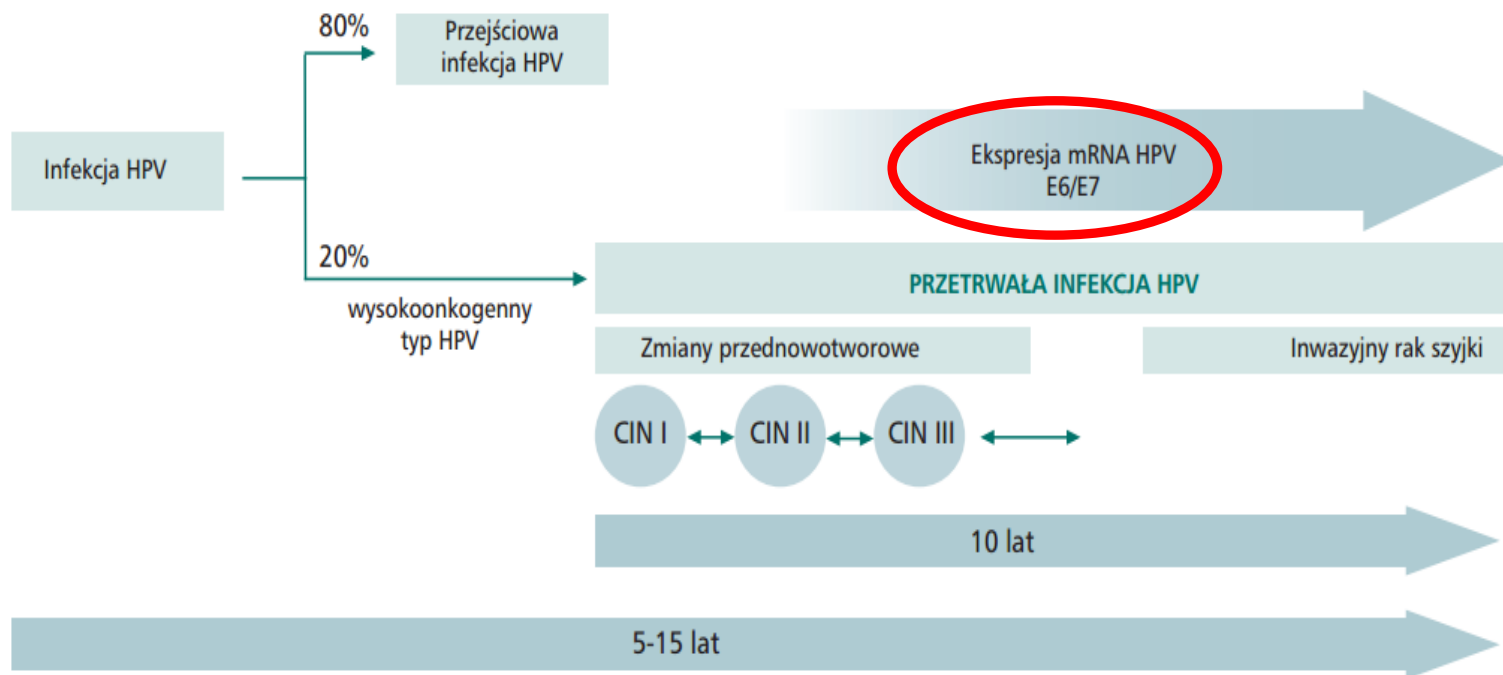
### Znaczenie wartości oznaczeń ilościowych HCV RNA:

1. wartość do  $4 \times 10^5$  IU/ml: poziom wirerii prognozujący możliwość samoistnego wyleczenia w fazie ostrej zakażenia;
2. wartość  $4 \times 10^5$  IU/ml: granica, do której istnieje większe prawdopodobieństwo udanej terapii wzw C;
3. wartość  $1 \times 10^6$  IU/ml: poziom wirerii, od którego istnieje prawdopodobieństwo przechodzenia HCV przez łożysko u matek HCV-dodatnich.

# Przykład: HPV

## Monitorowanie aktywności zakażenia szczepami onkogennymi

### Etapy onkogenezy w szyjce macicy – od zakażenia HPV do raka szyjki macicy



(na podstawie: zur Hausen H. 2002. Nat.Rev. Cancer. 2:342-350; Wheeler C.M. 2007. Nat. Clin. Pract. Oncol. 4(4):224-235)

# Test HPV mRNA

- Różnicowanie **przygodnego i przetrwałego** zakażenia HPV
- Detekcja transkryptów onkogenów **E6 i E7**. Ich obecność świadczy o przetrwałym zakażeniu i możliwym rozpoczęciu procesu karcinogenezy
- Identyfikacja kobiet zakażonych HPV z wysokim ryzykiem rozwoju raka szyjki macicy.
- Wykrywa mRNA dla 5 najczęstszych typów HPV o wysokiej onkogenności
- Kontrola leczenia z powodu zmian dysplastycznych w obrębie szyjki macicy – ocena ryzyka nawrotu CIN.
- Najwyższa wartość diagnostyczna i prognostyczna rozwoju raka szyjki macicy – u kobiet w każdym wieku.

## Przykład: CMV

# Monitorowanie aktywności zakażenia u biorców przeszczepów

- Ocena wiremii CMV w surowicy krwi u biorców przeszczepów jest stosowana do odróżniania postaci aktywnej i latentnej zakażenia
- **czas wykonania badania nie przekracza 24 godzin**  
(COBAS Amplicor CMV Monitor test)
- Wysokie wartości wiremii - zakażenie aktywne –  
leczenie przeciwwirusowe wyprzedzające  
(valganciclovir lub ganciclovir)



# Przykład: EBV

## Monitorowanie aktywności zakażenia po przeszczepie narządu

### Czym jest PTLD?

- posttransplant lymphoproliferative disease - potransplacyjny zespół limfoproliferacyjny
- heterogenna grupa chorób limfoproliferacyjnych o charakterze nowotworowym, rozwijającym się u pacjentów po przeszczepieniu (komórkowym lub narządowym) w wyniku jatrogennej immunosupresji limfocytów T
- **Zwykle choroba pojawia się w ciągu 6 m-cy po przeszczepie (1-20% pacjentów po przeszczepach narządów)**
- **Bardzo agresywny przebieg (jeśli brak leczenia)**
- **Obowiązkowe badanie dawców i biorców przeszczepów – anty-EBV**



# Zapobieganie wystąpienia PTLD

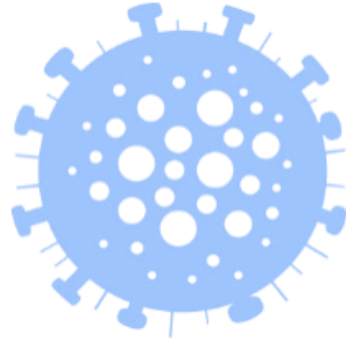
- Monitorowanie EBV-DNA (PCR) – surowica, osocze lub krew pełna
- Początek monitorowania od dnia wykonania przeszczepu
- Pacjenci wysokiego ryzyka:
  - Raz na tydzień – pacjenci EBV-DNA negatywni, dawca EBV+)



WZROST EBV DNA  
 **$10^5$  kopii/ $10^5$  komórek  
jednojądrzastych  
krwi obwodowej**

LECZENIE  
WYPRZEDZAJĄCE

- ZŁAGODZENIE IMMUNOSUPRESJI
- STOSOWANIE RITUXIMABU (ANTY-cd20 MABS)



# **Genotypowanie wirusa**

# Genotypowanie

- Określanie genotypu na podstawie charakterystycznych sekwencji w genomie patogenu
- Wartość prognostyczna i predykcyjna



Ocena naturalnego  
przebiegu  
zakażenia



Ocena szans na  
skuteczność  
leczenia

# Przykład: HCV

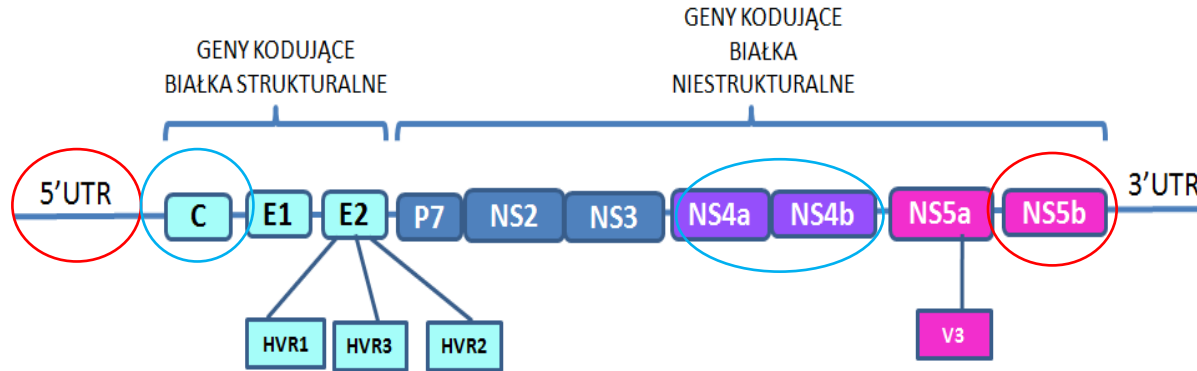
## Występowanie genotypów HCV na świecie



Region	Predominant HCV genotype
Europe, North America, Japan	Genotype 1a, 1b (genotypes 2 & 3 are less common)
Southeast Asia	Genotype 3
Egypt, the Middle East, Central Africa	Genotype 4
South Africa	Genotype 5
Asia	Genotype 6

*Genotyp HCV - kryterium różnicujące postępowanie terapeutyczne (stosowane leki i czas trwania terapii)*

# Genotypowanie HCV



- Oznaczenie qPCR przy użyciu genotypowo-specyficznych oligonukleotydów (Abbott RealTime HCV Genotype II assay ), 5'UTR, NS5b
- Hybrydyzacja produktu PCR przy użyciu genotypowo-specyficznych sond nukleotydowych (InnoLipa, Innogenetics), 5'UTR
- Genotypowanie serologiczne: RIBA HCV 3.0 SIA, Chiron corporation

# Skuteczność leczenia WZW C – SCHEMAT PODSTAWOWY: PEG-IFN- $\alpha$ + RYBAWIRYNA

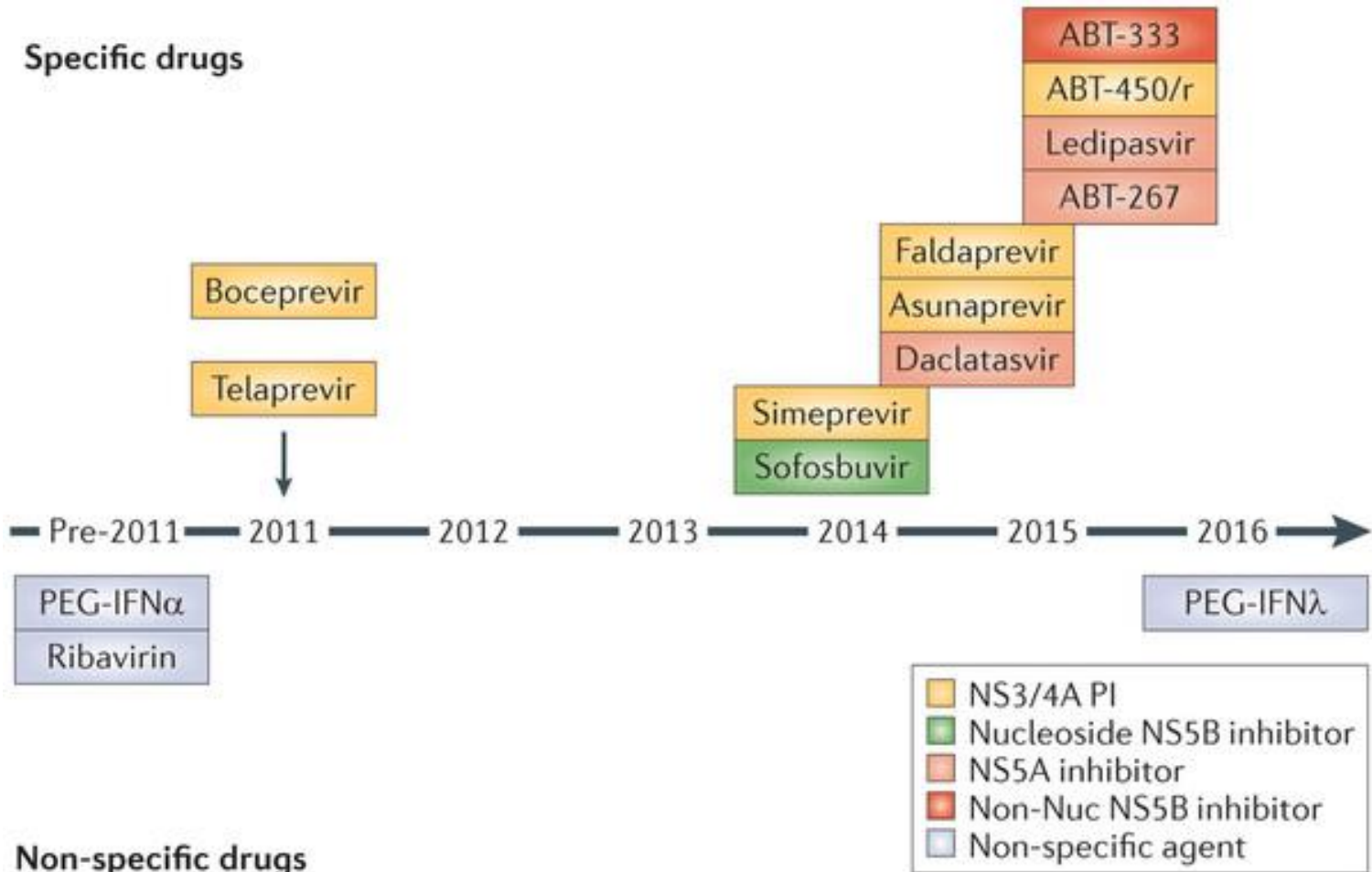
SKUTECZNOŚĆ LECZENIA W ZALEŻNOŚCI OD GENOTYPU:

HCV 1: 42-52%

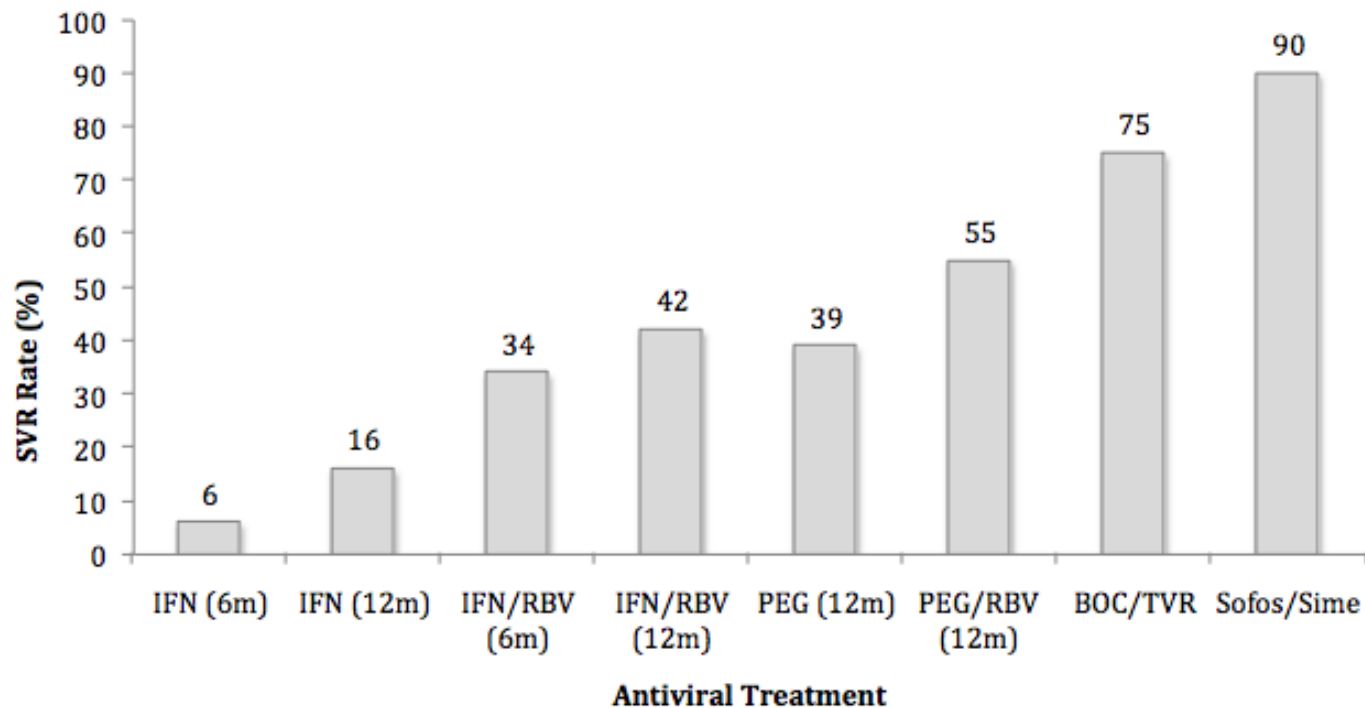
HCV 2, 3: 78-86 %

HCV 4, 5, 6: 50-77%

## Specific drugs



## Non-specific drugs



**W ostatnich latach, dzięki wprowadzeniu specyficznych leków, skuteczność leczenia wzw C między genotypami porównywalna**



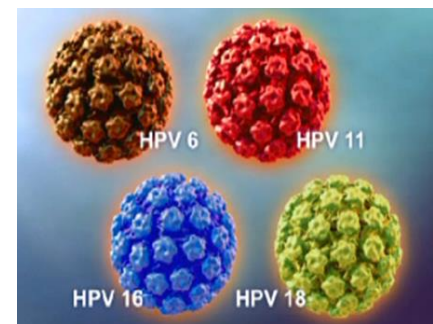
# Przykład: HPV

Typy 16 i 18 wirusa brodawczaka ludzkiego są związane z wysokim ryzykiem raka szyjki macicy (**HR, high risk**)

Typy 6 i 11 są związane z brodawkami płciowymi

Typowanie szczepów HPV za pomocą NAT (detekcja HPV DNA) – stosowane w celu wykrycia szczepów związanych ze zmianami nowotworowymi.

W przypadku wykrycia szczepów wysoce onkogennych pacjentki są kierowane na kolposkopię i cytologię

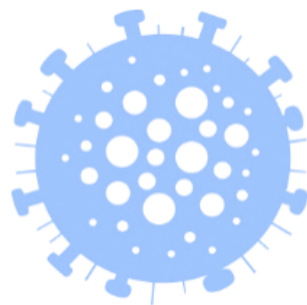


LINEAR ARRAY® HPV Genotyping Test  
– Wykrywanie 37 typów HPV,  
detekcja zakażeń mieszanych

# Największy potencjał onkogenny szczepów HPV

- HPV 16
- HPV 18
- HPV 31
- HPV 33
- HPV 45
- HPV35
- HPV 39

- HPV 51
- HPC 52
- HPV 56
- HPV 58
- HPV 59
- HPV 66
- HPV 68

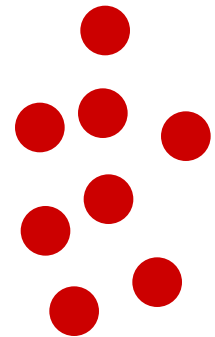
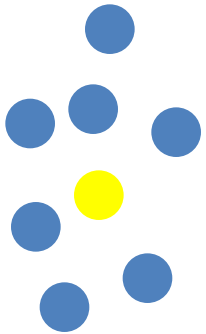


# **Badanie lekooporności**

# Wykształcenie oraz ewolucja oporności

Selekcja lekoopornych wariantów

Ewolucja w kierunku wysokiej oporności oraz kompensacji kondycji



Pojedynczy mutant

Podwójny mutant

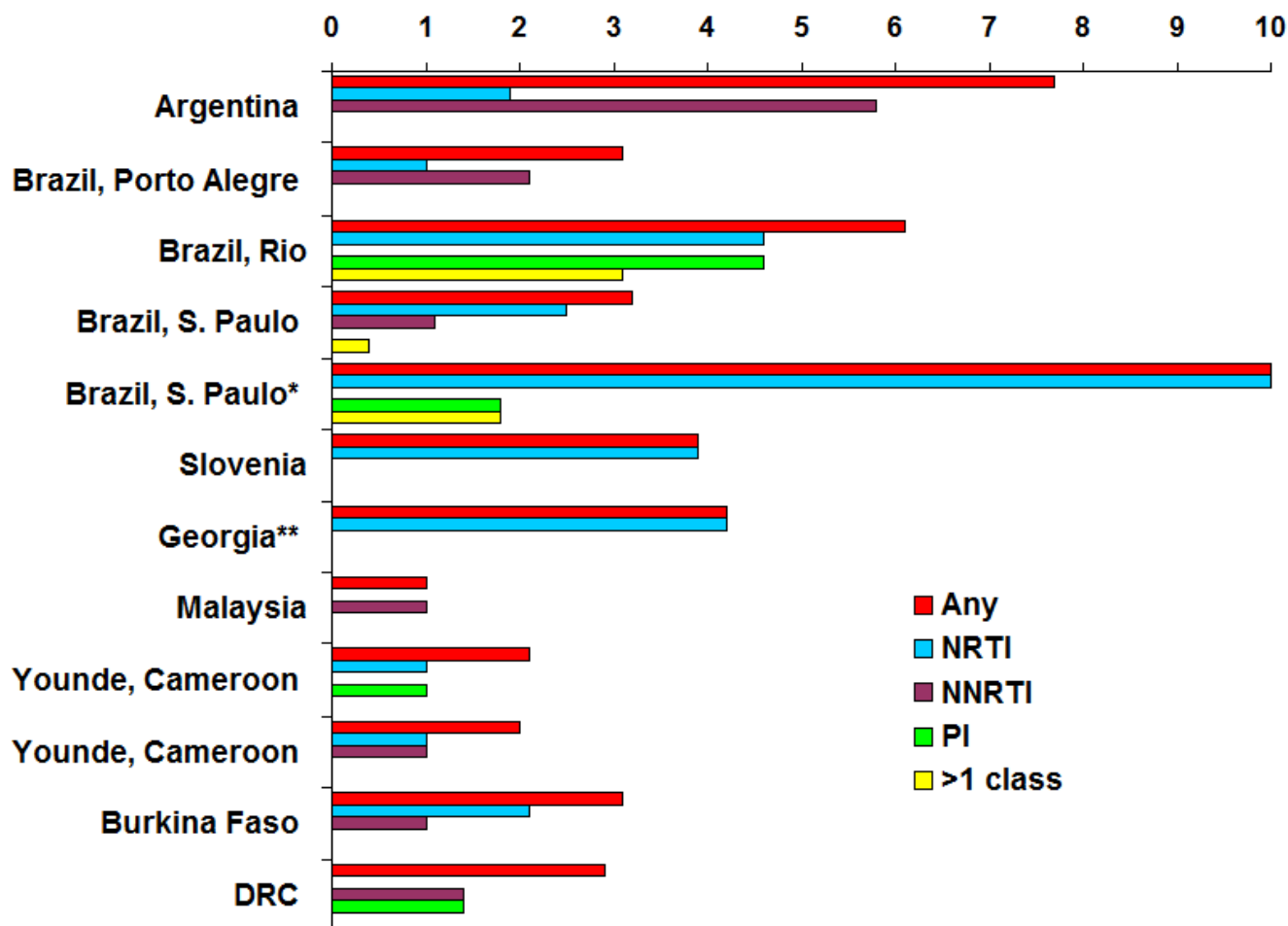
Potrójny mutant

obecność leku

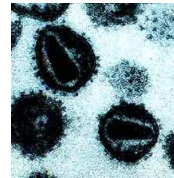
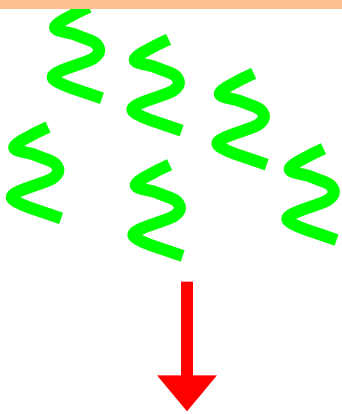


# Przykład: HIV-1 – badanie lekooporności na leki antyretrowirusowe

Występowanie szczepów lekoopornych HIV-1 u pacjentów nieleczonych antyretrowirusowo



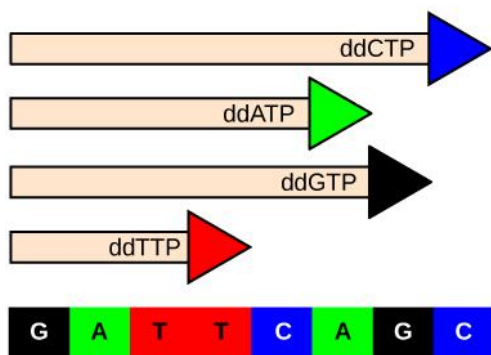
# Oznaczanie cech lekooporności – mutacje warunkujące lekooporność HIV-1



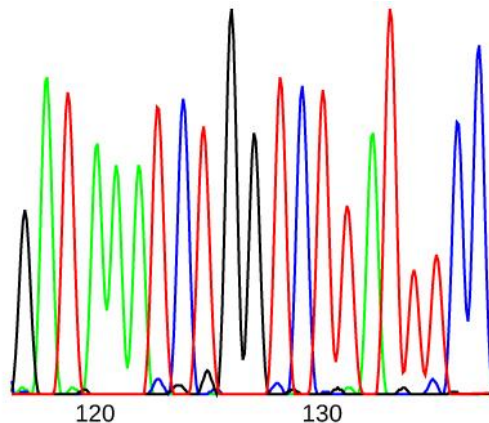
Osocze/surowica

HIV RNA

Sekwencjonowanie genów proteazy i polimerazy wirusowej



Dye-labeled dideoxynucleotides are used to generate DNA fragments of different lengths



G A T A A A T C T G G T C T T A T T T C C



RT M184V  
Met → Val  
kodon 184 RT

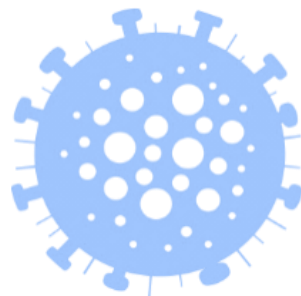
# Przykład: CMV – badanie lekooporności na leki antywirusowe u pacjentów z niedoborami odporności

- ryzyko nosicielstwa szczepu lekoopornego
- sekwencjonowanie genów wirusa z surowicy (jeśli zbyt mała wiremia – hodowla wirusa i namnożenie miana)
- UL97 (phosphotransferase gene), UL54 (DNA polymerase gene)



Oporność na gancyklowir: mutacje w kodonach 460, 594 595 UL97, rzadko w UL54

Mutacje te powodują lekooporność krzyżową na cidofovir, lecz nie foscarnet

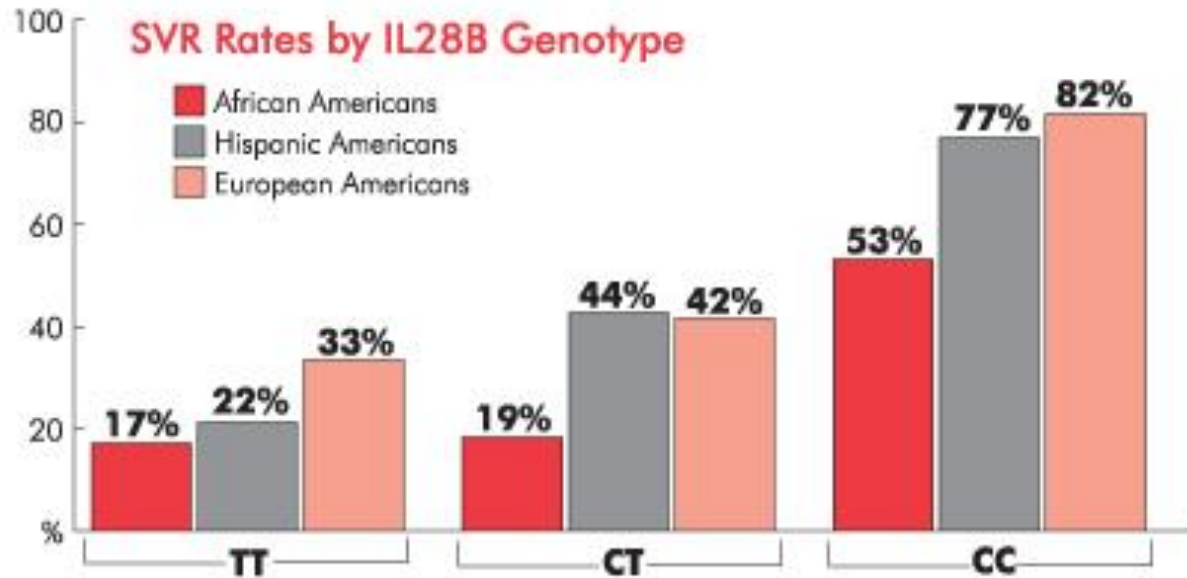


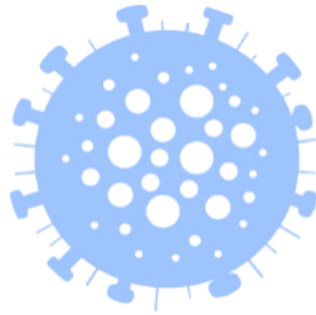
# Ocena genetycznych parametrów gospodarza



# Przykład: HCV

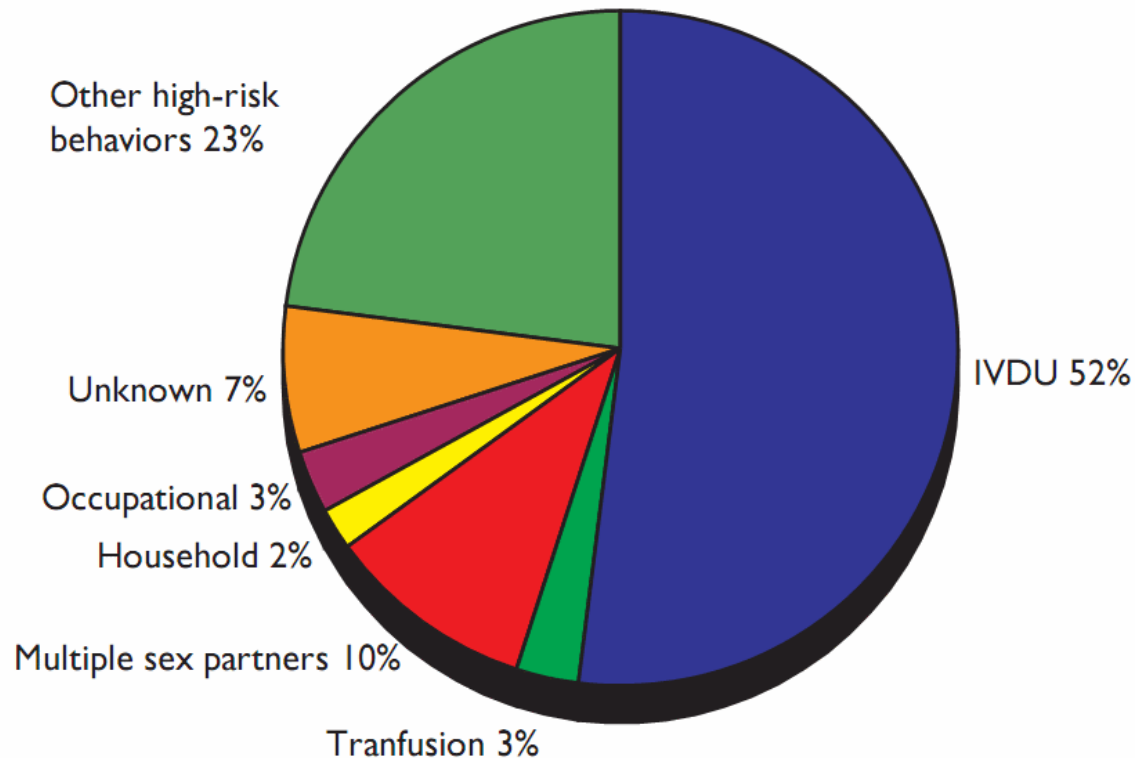
Polimorfizm interleukiny 28B a odpowiedź na terapię  
wzw C interferonem alfa i rybawiryną



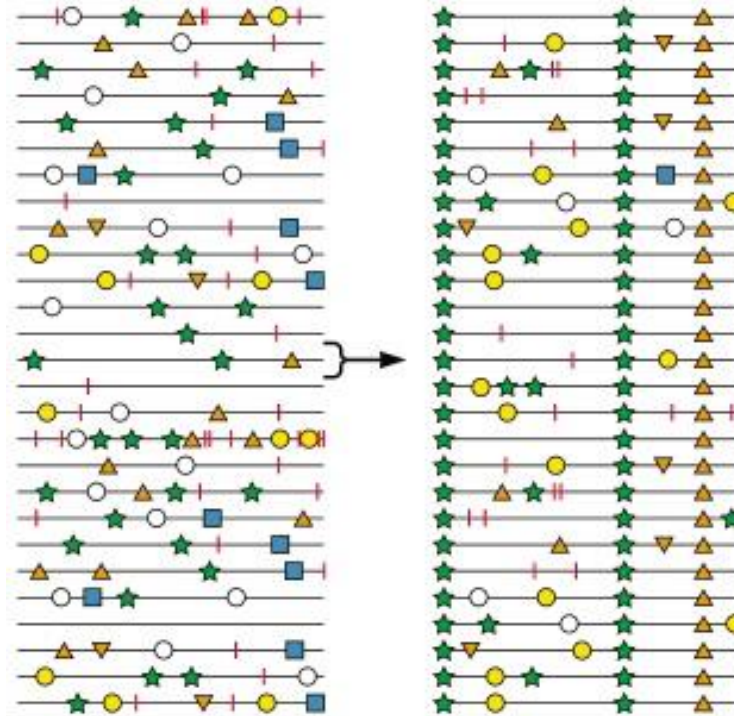


# Badania epidemiologiczne

# Zastosowanie badań zmienności wirusa zapalenia wątroby typu C do określania transmisji HCV



# Model transmisji HCV



transmisja

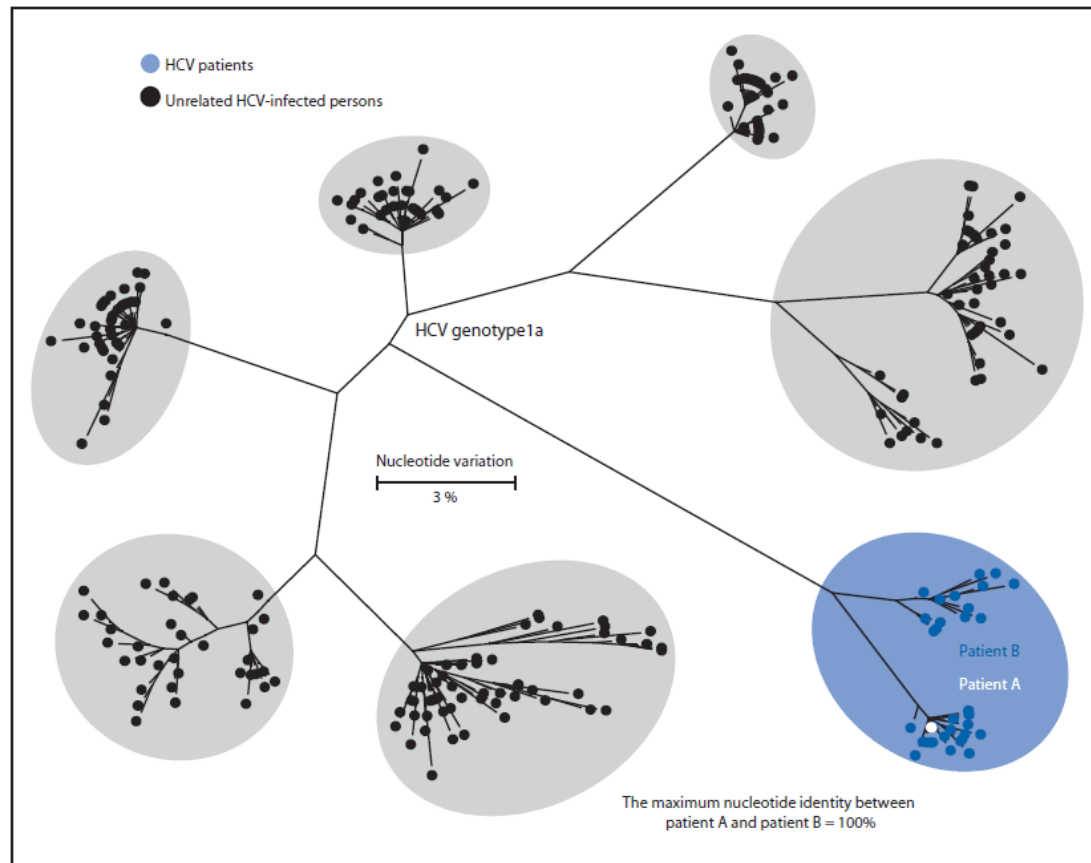


Efekt „wąskiego gardła”

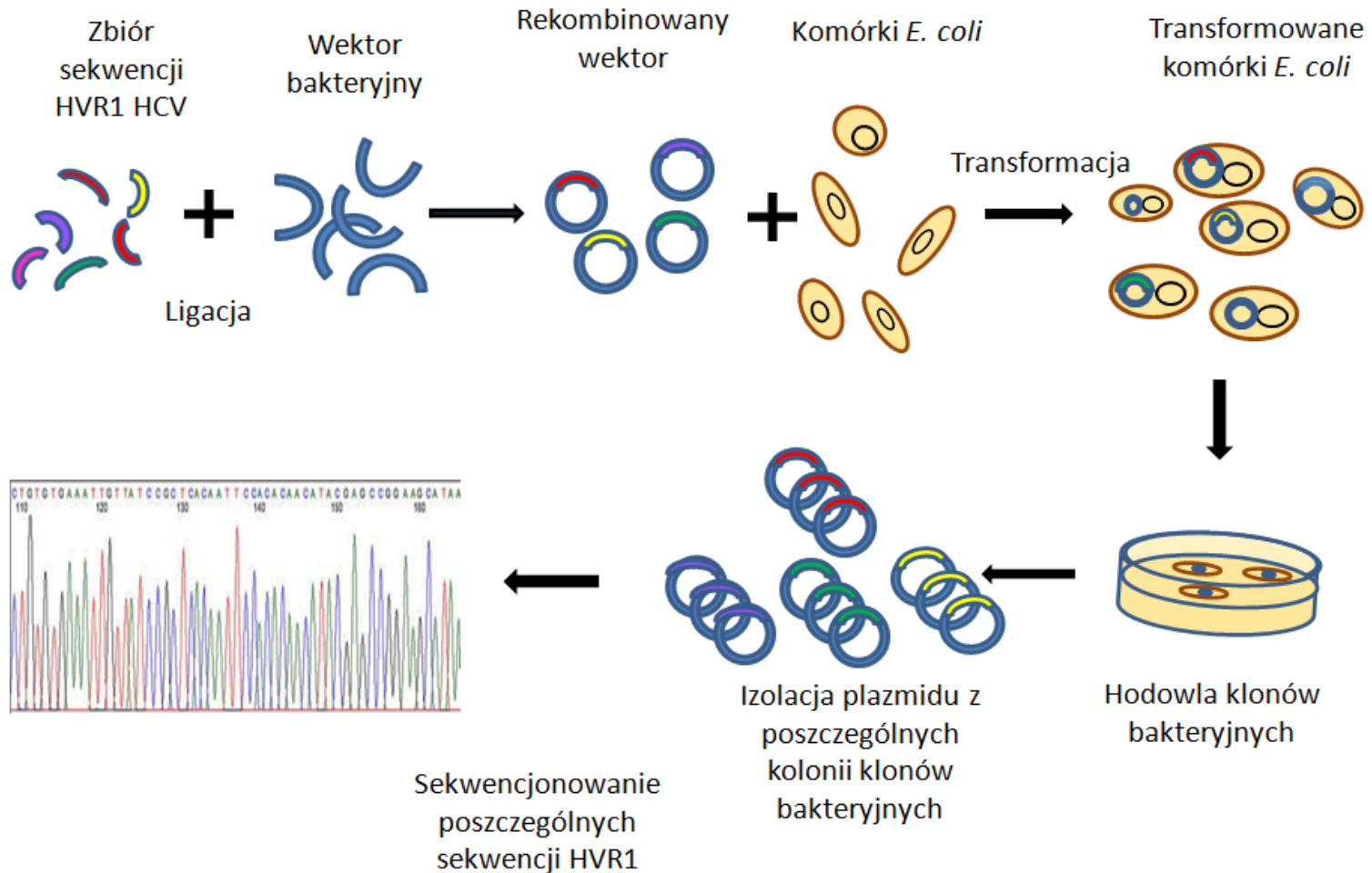
Osoba zakażająca

Osoba uległa zakażeniu

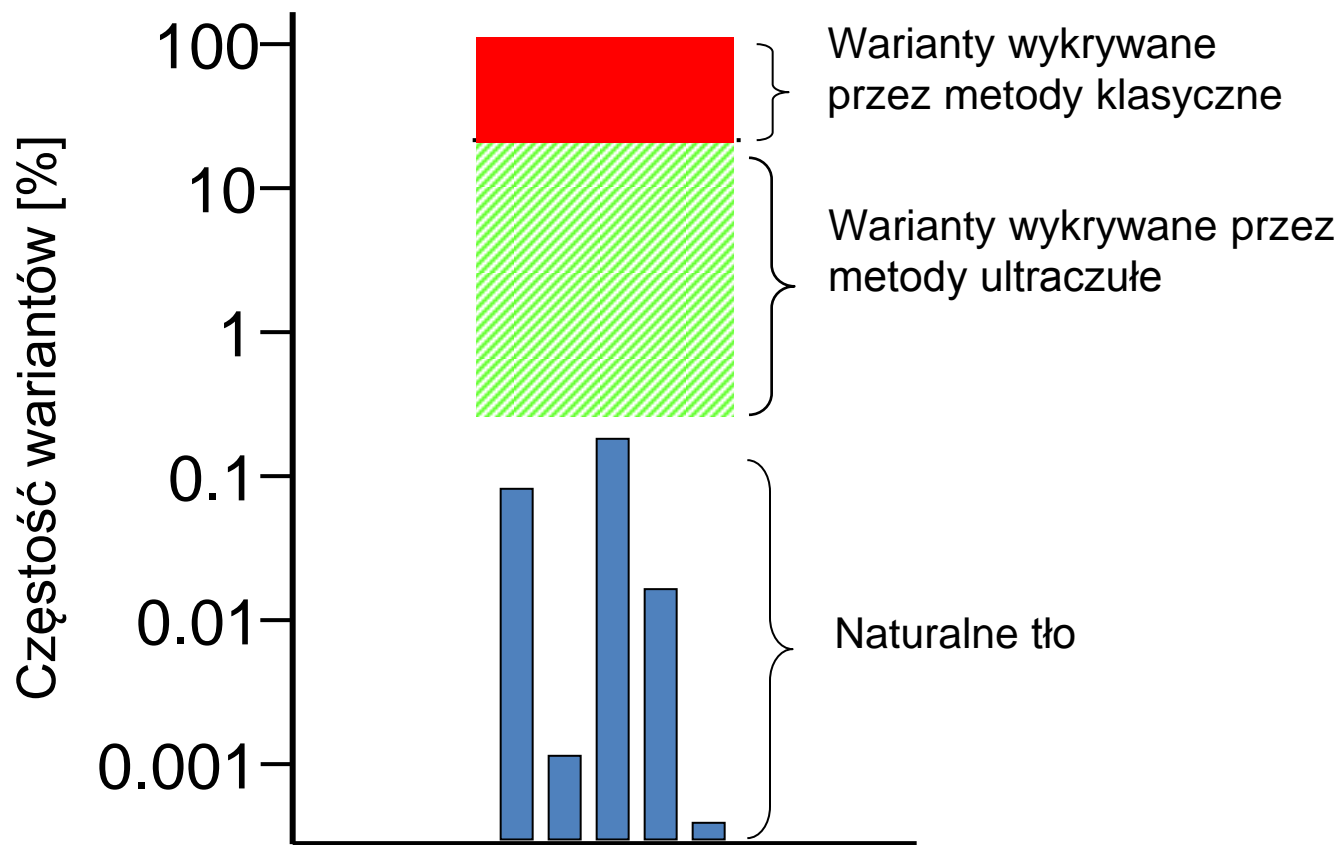
# Poszukiwanie źródła transmisji HCV – analiza filogenetyczna wariantów genetycznych



# Schemat przebiegu klonowania oraz sekwencjonowania regionu HVR1

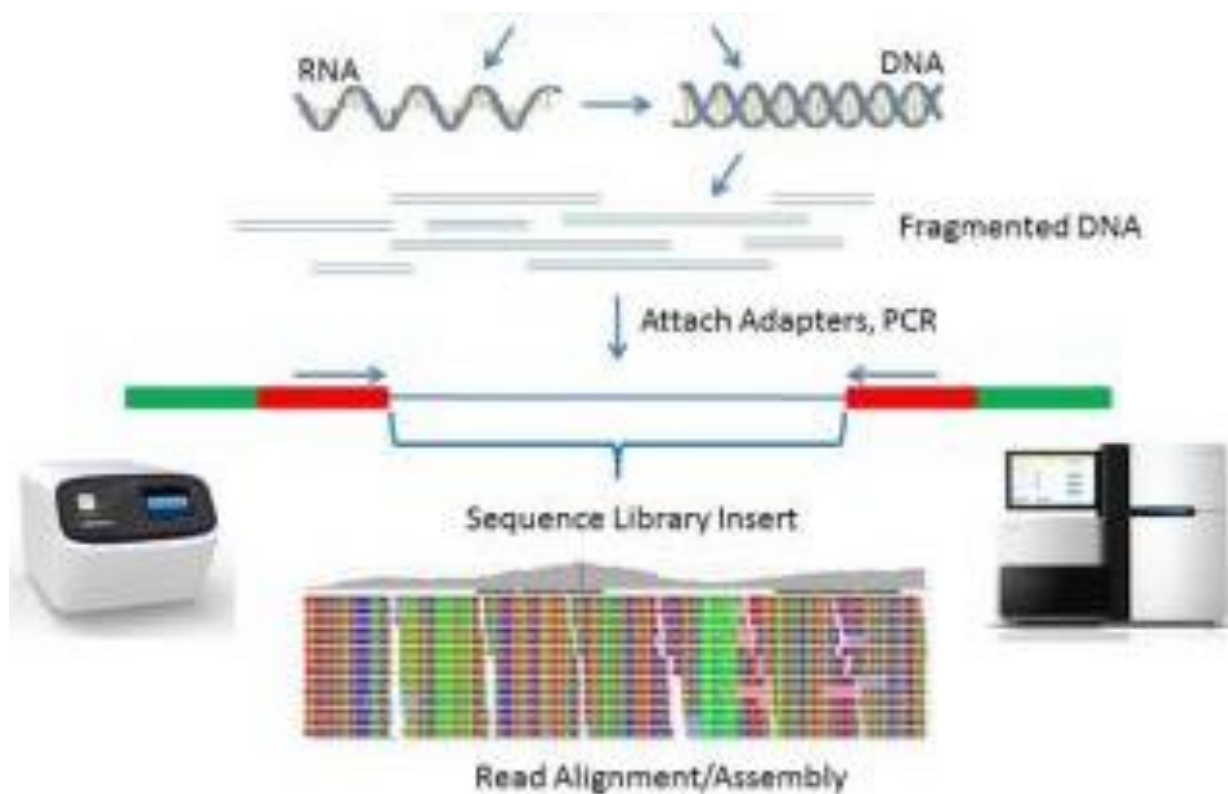


# Detekcja wariantów wirusa – ograniczenia metod klasycznych



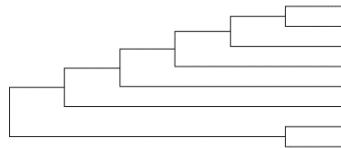
# Nowe metody sekwencjonowania DNA

## NGS (Next-generation sequencing)

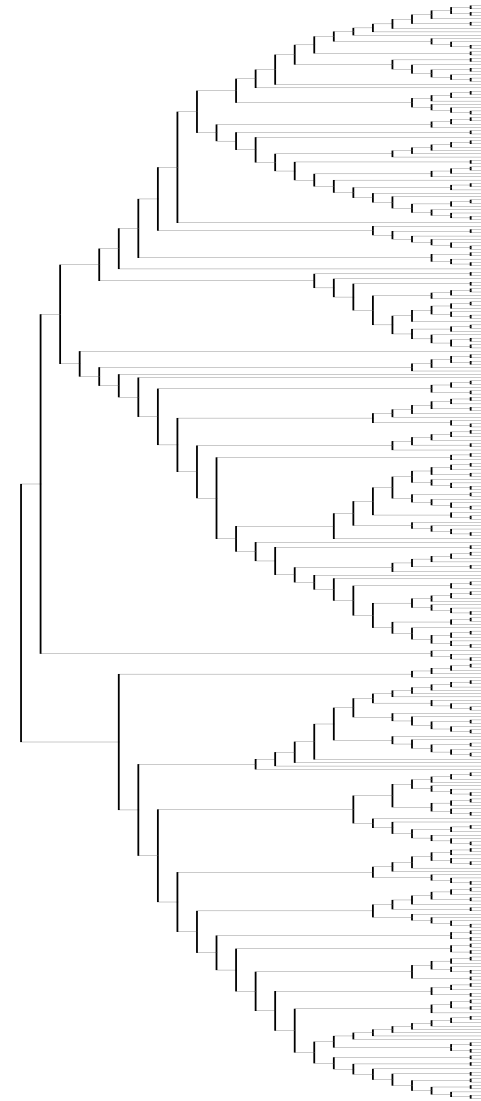




# Warianty HCV u zakażonego gospodarza w fazie przewlekłej zakażenia



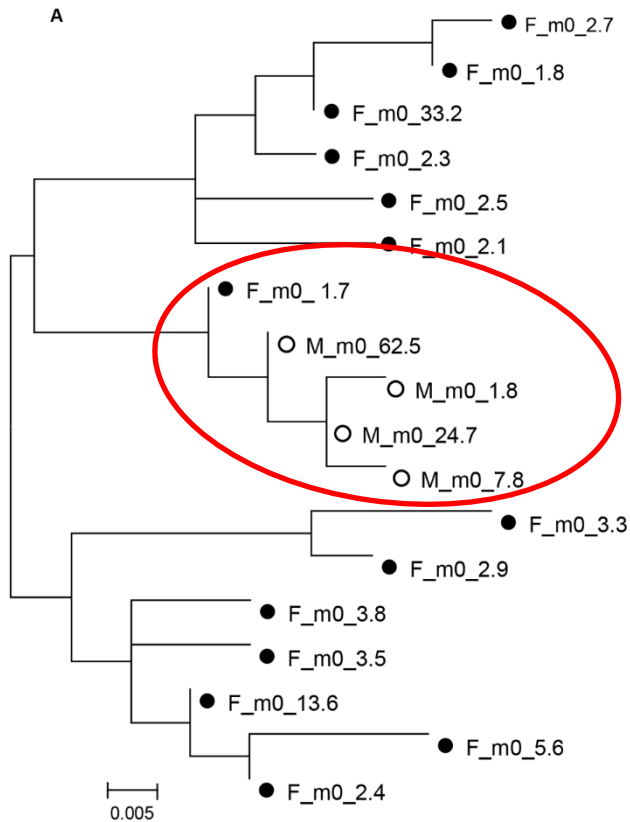
**klonowanie oraz „klasyczne”  
sekwencjonowanie**



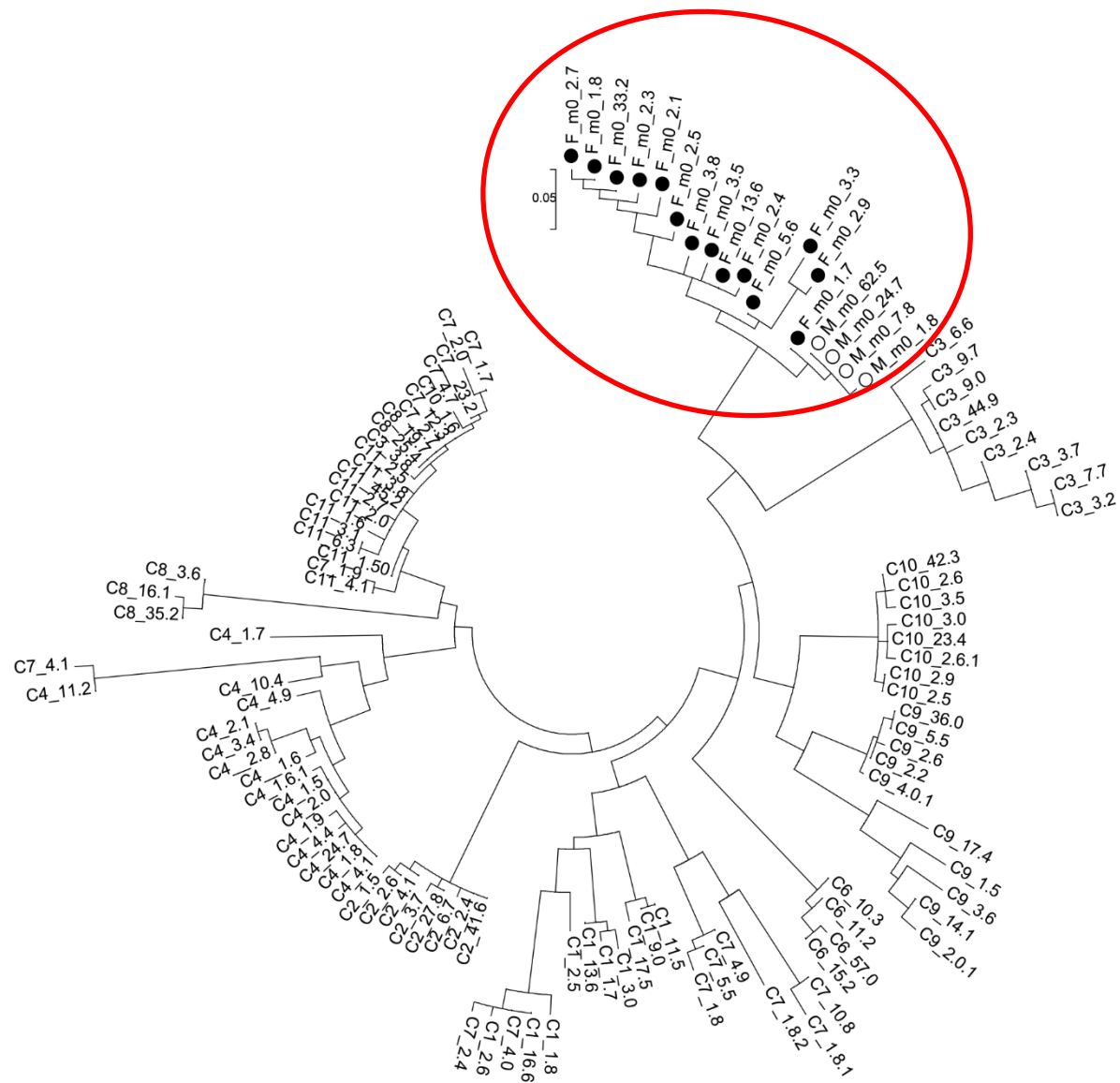
**sekwencjonowanie następnej generacji (NGS)**

# Opis przypadku

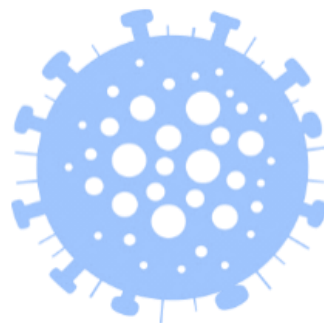
Mężczyzna, lat pięćdziesiąt osiem – zgłosił się do Szpitala Zakaźnego z objawami ostrego zapalenia wątroby typu C, a jego 53 -letnia małżonka od ponad 10 lat wykazywała obecność przeciwciał anti-HCV. Próbki surowicy krwi zebrano zarówno od mężczyzny jak i kobiety. Region hiperzmienny 1 (HVR1) poddano sekwencjonowaniu następnej generacji (NGS) przy użyciu platformy pirosekwencjonowania. Warianty genetyczne odtworzono metodą rekonstrukcji Shorah i porównano przy pomocy analizy filogenetycznej i analizy różnorodności sekwencji.



F- kobieta; M- mężczyzna



Analiza filogenetyczna sekwencji wirusa od pary małżonków oraz od 10 niespokrewnionych nosicieli HCV



# **Przyszłość diagnostyki molekularnej**

## Identyfikacja nowych lub niespodziewanych patogenów wirusowych

- Badanie „na gorąco” ognisk zakażeń: (np. szczep *E. coli* O104:H4);
- Badanie etiologii zakażeń wirusowych przy użyciu podejścia metagenomicznego (np. identyfikacja czynnika etiologicznego zapalenia mózgu);
- Odkrycie nowych wirusów onkogennych (np. Merkel Cell polyomavirus, czynnik etiologiczny raka z komórek Merkla);
- Odkrycie nowych wirusów patogennych (np. astrowirusy).

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Oct. 2011, p. 3714–3716  
0095-1137/11/\$12.00 doi:10.1128/JCM.05062-11  
Copyright © 2011, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 49, No. 10

### Fast-Track Communication

#### Rapid Identification and Validation of Specific Molecular Targets for Detection of *Escherichia coli* O104:H4 Outbreak Strain by Use of High-Throughput Sequencing Data from Nine Genomes<sup>∇†</sup>

Received 11 July 2011/Returned for modification 9 August 2011/Accepted 17 August 2011

#### Diagnosis of Neuroinvasive Astrovirus Infection in an Immunocompromised Adult With Encephalitis by Unbiased Next-Generation Sequencing

Samia N. Naccache,<sup>1,2</sup> Karl S. Peggs,<sup>3</sup> Frank M. Mattes,<sup>4</sup> Rahul Phadke,<sup>5</sup> Jeremy A. Garson,<sup>7</sup> Paul Grant,<sup>4</sup> Erik Samayoa,<sup>1,2</sup> Scot Federman,<sup>1,2</sup> Steve Miller,<sup>1,2</sup> Michael P. Lunn,<sup>6</sup> Vanya Gant,<sup>4</sup> and Charles Y. Chiu<sup>1,2,8</sup>

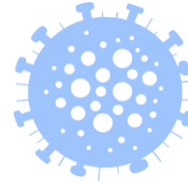
<sup>1</sup>Department of Laboratory Medicine, University of California, San Francisco, and

<sup>2</sup>UCSF-Abbott Viral Diagnostics and Discovery Center, San Francisco, California;

## *Zastosowanie NGS w wirusologii*

### **Sekwencjonowanie całego genomu znanych patogenów**

- Analiza ewolucji genomu (HIV, HCV, wirus grypy);
- Analiza mutacji wpływających na patogenność i fitness (HIV, HCV, HSV, HBV, CMV);
- Wykrywanie wariantów unikających odpowiedzi humoralnej, badanie efektywności szczepionek (HIV i inne)
- Analiza filogenetyczna (wirus grypy, HIV);
- Badanie czynników etiologicznych epidemii w historii (wirus ospy prawdziwej)

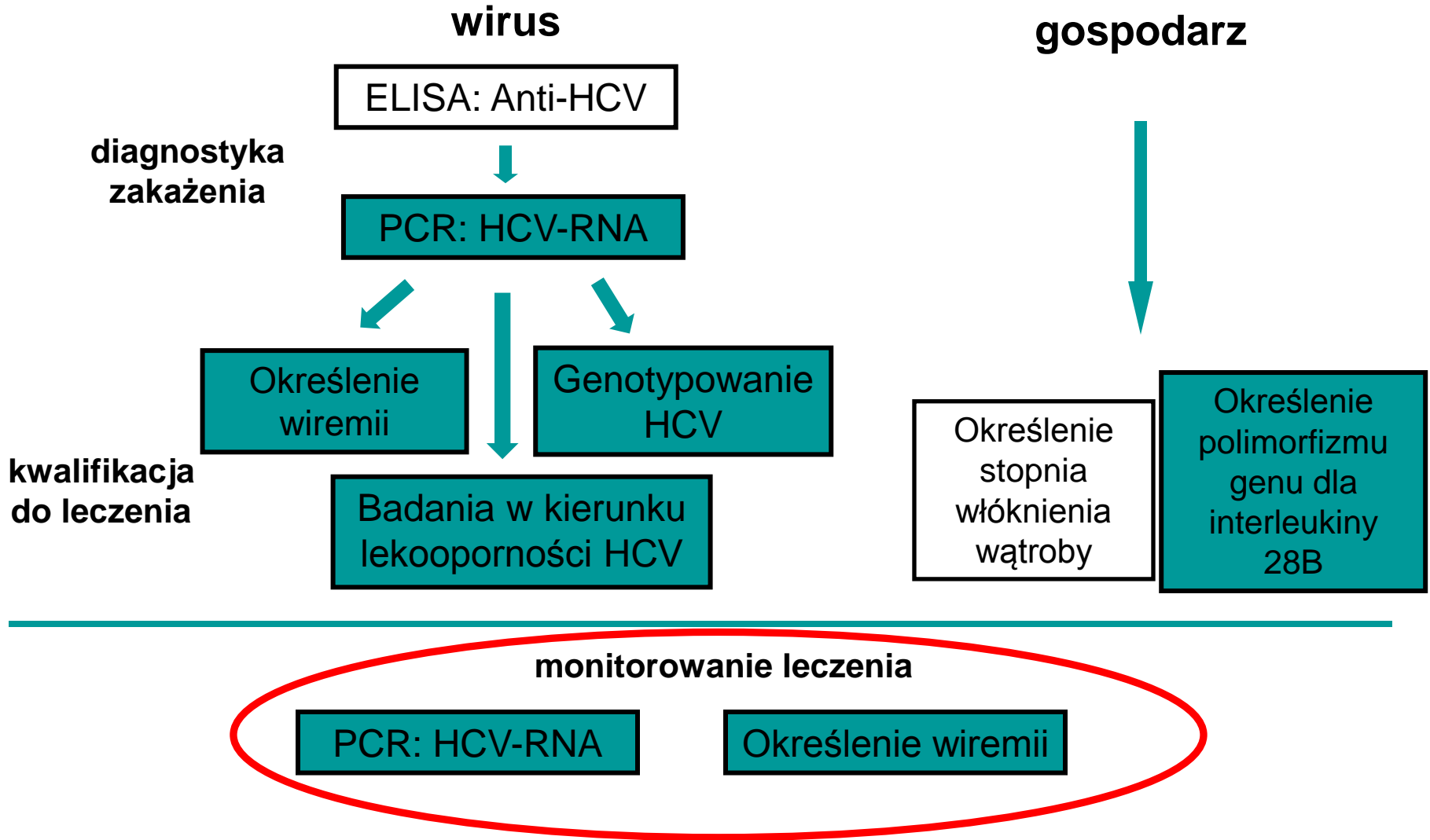


# Zastosowanie metod molekularnych w diagnostyce wirusologicznej – część praktyczna

**Monitorowanie przebiegu leczenia na  
podstawie obecności HCV RNA w surowicy u  
dzieci przewlekle zakażonych genotypem 1 HCV**



# Wirusowe zapalenie wątroby typu C - diagnostyka



# Ćwiczenia

- Technika: RT-PCR (odwrotna transkrypcja+PCR)
- amplifikacja 5'UTR (fragment 270 bp)
- Metoda weryfikacji: elektroforeza w żelu agarozowym
- Próbki pobrane: przed leczeniem (w0), w 4. , 12 tyg. leczenia (w4, w12), na zakończenie leczenia (w48) oraz 6 miesięcy od zakończenia leczenia (m6).

