

## **Konečná zpráva hodnocení různých způsobů přípravy vzorků pro AMPLICOR HPV test firmy Roche**

### **Charakteristika testu:**

Set *AMPLICOR HPV* vyráběný firmou Roche je určený pro detekci vysoko-rizikových typů lidských papillomavirů (HR HPV) ve stěrech z hrdla děložního. Test detekuje 13 HR HPV typů, které infikují sliznice anogenitální oblasti. *AMPLICOR HPV* je test založený na amplifikaci fragmentu z vysoce konzervované oblasti L1 genu HPV za použití primerů značených biotinem. V setu jsou zařazené i primery pro amplifikaci vnitřní kontroly – beta-globinového genu. Produkt amplifikační reakce je následně použit k obrácené hybridizaci, při které je oligopróba specifická pro skupinu HR HPV a pro beta-globinový gen pevně ukotvena na jamky mikrotitrační destičky. Po hybridizaci je k zachyceným amplikonům přes biotin navázán konjugát s křenovou peroxidázou. Ta po přidání substrátu indukuje barevnou změnu roztoku, při 450nm je změřena absorbance. Hodnotitelné vzorky musí mít  $OD_{450} \geq 0,2$  pro beta-globinový gen. Pozitivní vzorky jsou takové, jejichž hodnota  $OD_{450} \geq 0,2$  pro HPV HR.

### **Výsledky testování:**

#### **A. Výchozí podmínky:**

Cílem našeho testu bylo porovnat různá odběrová media pro stěry z hrdla děložního a různé způsoby pre-amplifikační přípravy vzorků pro test *AMPLICOR HPV*.

Výrobce doporučuje odběr cervikálních stěrů pro vyšetření HPV do PreservCyt (PC) media od firmy Cytec (20 ml media/stěr). Pro izolaci DNA je následně odebráno 250  $\mu$ l media, izolace se provádí na kolonkách AmpliLute Liquid Media extrakčního kitu.

Další alternativou odběru cervikálních stěrů jsou odběrovky DNA Pap Specimen Transport Medium (STM) od firmy Digene (1 ml media/stěr), které jsou primárně určené pro testování HPV DNA metodou Hybrid Capture. Pro izolaci na kolonkách AmpliLute jsme odebírali z těchto vzorků 200  $\mu$ l STM.

Protože izolace vzorků na kolonkách AmpliLute je o něco zdouhavější než izolace jinými kity firmy Qiagen a v případě rutinního zpracování většího počtu vzorků se doba izolace DNA bude dále prodlužovat, je snaha přípravu vzorků pro PCR co nejvíce usnadnit. Takovou možnost nabízí použití MagNA Pure Compact přístroje pro automatickou izolaci nukleových kyselin s využitím magnetických částic, kde lze najednou zpracovávat 8 vzorků. Pro izolaci DNA jsme používali MagNA Pure Compact NA Isolation Kit I a program DNA Culture Cells, kde je stanoveno jako výchozí množství 100  $\mu$ l buněčné suspenze.

Ve všech případech jsme pro následnou amplifikační reakci použili 50  $\mu$ l eluátu.

#### **B. Vlastní výsledky:**

Testování přítomnosti HR HPV DNA jsme provedli na 50 cervikálních stěrech v odběrovém mediu PreservCyt a 50 stěrech v Specimen Transport Medium, celkem 100 vzorkách. Izolace DNA pro amplifikační reakci byla u všech vzorků provedena manuálně na kolonkách AmpliLute Roche a současně na automatickém přístroji MagNA Pure.

## 1. Výsledky amplifikace a detekce u vzorků izolovaných z PreservCytu:

### AmpliLute Kit:

Izolace DNA z 250µl PC media na kolonkách AmpliLute dle doporučení výrobce avýsledky následné amplifikace byly považovány za standard. Pro 47 vzorků z 50 jsme dostali validní výsledky amplifikace a detekce HPV DNA a beta-globinového genu, 20 vzorků bylo pozitivních na HR HPV a 27 vzorků bylo negativních na HR HPV. Pouze 3 vzorky neposkytly validní výsledek ( $OD_{450} < 0,2$  pro beta-globinový gen), opakovaná izolace těchto vzorků byla úspěšná, všechny 3 vzorky byly negativní na HR HPV.

### MagNA Pure:

Stejně vzorky byly současně použity pro izolaci DNA na automatickém přístroji MagNA Pure Compact. U prvních 24 vzorků bylo po důkladném promíchání odebráno 100 µl PC media jako výchozí množství pro izolaci DNA. Výsledky amplifikace a detekce byly následující: 4 vzorky byly pozitivní na HR HPV, 12 vzorků bylo negativních na HR HPV (z toho byly 3, které byly při izolaci na kolonkách AmpliLute pozitivní na HR HPV) a 7 vzorků, tj. téměř celá 1/3 ze všech, neposkytlo validní výsledek. Zlepšení výsledku jsme nedosáhli ani opakovanou izolací DNA.

Dospěli jsme k závěru, že pro tuto metodu izolace bude limitním výchozí množství vzorku pro izolaci, a rozhodli se 4 nevalidní vzorky (vzorky č. 5,8,13,15) před izolací zakonzentrovat centrifugací buněk. Nejprve jsme centrifugovali 250 µl PC (stejně množství jako pro izolaci na kolonkách), protože ani poté nedošlo k výraznému zlepšení výsledků amplifikace a detekce (hodnoty  $OD_{450}$  pro beta-globinový gen byly jen těsně nad hranicí positivity, 1 vzorek zůstal nevalidní), u dalších 4 vzorků (vzorky č. 16,17,18,20) jsme zakonzentrovali celý objem 20 ml odběrového media do 1ml PC a pro izolaci následně odebrali 100 µl. Výsledky amplifikace pro tyto 4 vzorky byly shodné jako při izolaci přes kolonky. U všech následujících vzorků jsme dále postupovali tímto způsobem.

Výsledky jsou shrnuty v následujících tabulkách (Tabulka 1, 2). Shodný výsledek *AMPLICOR HPV* setu jsme dostali u 46/50 vzorků.

Tabulka 1. Srovnání výsledků testu Amplicor Roche na HR HPV pro vzorky odebrané do PreservCyt media a izolované na kolonkách AmpliLute a automatickém přístroji MagNA Pure.

PC – PreservCyt  
NA – neamplifikovatelný vzorek  
+ - pozitivní  
výsledek amplifikace  
a detekce HR HPV  
- negativní  
výsledek amplifikace  
a detekce HR HPV

PreservCyt po zakonzentrování		Izolace MagNA Pure			celkem
		+	-	NA	
Izolace Ampli Lute	+	16	4	0	20
	-	0	30	0	30
	NA	0	0	0	0
celkem		16	34	0	50

Tabulka 2. Srovnání výsledků testu AmpliCor Roche na HR HPV pro vzorky odebrané do PreservCyt media a izolované na kolonkách AmpliLute a automatickém přístroji MagNA Pure – pro vzorky před zakoncentrováním PreservCytu.

ID	Izolace AmpliLute 250µl			Izolace MagNAPure 100µl			Izolace MagNA Pure opakovaná 100µl			MagNA Pure 20ml → 1ml → 100µl		
	PCR	BG	HPV	PCR	BG	HPV	PCR	BG	HPV	PCR	BG	HPV
1PC	POZITIVNÍ	+	+	POZITIVNÍ	+	+						
2	NEGATIVNÍ	+	-	NEGATIVNÍ	+	-						
3	NEGATIVNÍ	+	-	NEGATIVNÍ	+	-						
4	NEGATIVNÍ	+	-	NEGATIVNÍ	+	-						
5	POZITIVNÍ	+	+	NA	-	-	NEGATIVNÍ	+	-	NEGATIVNÍ	+	-
6	NEGATIVNÍ	+	-	NEGATIVNÍ	+	-						
7	NEGATIVNÍ	+	-	NEGATIVNÍ	+	-						
8	POZITIVNÍ	+	+	NEGATIVNÍ	+	-				NEGATIVNÍ	+	-
9	NEGATIVNÍ	+	-	NEGATIVNÍ	+	-						
10	NEGATIVNÍ	+	-	NEGATIVNÍ	+	-						
11	POZITIVNÍ	+	+	POZITIVNÍ	+	+						
12	POZITIVNÍ	+	+	POZITIVNÍ	+	+						
13	NEGATIVNÍ	+	-	NA	-	-	NA	-	-	NEGATIVNÍ	+	-
14	NEGATIVNÍ	+	-	NEGATIVNÍ	+	-						
15	NEGATIVNÍ	+	-	NA	-	-	NA	-	-	NA	-	-
16	NEGATIVNÍ	+	-	NA	-	-	NA	-	-	NEGATIVNÍ	+	-
17	POZITIVNÍ	+	+	NEGATIVNÍ	+	-				POZITIVNÍ	+	+
18	NEGATIVNÍ	+	-	NA	-	-	NA	-	-	NEGATIVNÍ	+	-
19	NEGATIVNÍ	+	-	NEGATIVNÍ	+	-						
20	NEGATIVNÍ	+	-	NA	-	-	NA	-	-	NEGATIVNÍ	+	-
21	NEGATIVNÍ	+	-	NA	-	-						
22	POZITIVNÍ	+	+	NEGATIVNÍ	+	-						
23	POZITIVNÍ	+	+	POZITIVNÍ	-	+						
24	NEGATIVNÍ	+	-	NA	-	-						

PC – PreservCyt

NA – neamplifikovatelný vzorek

+ - pozitivní výsledek amplifikace a detekce

- negativní výsledek amplifikace a detekce

BG – detekce beta-globinového genu

HPV – detekce lidského papillomaviru

## 2. Výsledky amplifikace a detekce u vzorků izolovaných z STM:

### AmpliLute Kit:

K izolaci DNA ze stěrů děložního hrdla odebraných do STM jsme použili 200 $\mu$ l odběrového media. Z 50 testovaných vzorků bylo 11 pozitivních na HR HPV, 24 negativních na HR HPV a u 4 vzorků nedošlo k amplifikaci kontrolního beta-globinového genu. Pro tyto 4 vzorky nebylo možné izolaci DNA opakovat, protože se jedná o vzorky pacientů, které již byly následně použity pro vyšetření HR HPV metodou Hybrid Capture.

Při izolaci na kolonkách AmpliLute dochází po přidání lyzačního roztoku k STM k vytvoření sraženiny, která se následně rozpustí, vzorky při nanášení na kolonky pomaleji protékají filtrem.

### MagNA Pure:

Současně jsme izolovali DNA na automatickém přístroji MagNA Pure, pro izolaci jsme odebírali 100 $\mu$ l STM media. Ve všech 50 případech jsme získali validní výsledky amplifikace a detekce *AMPLICOR ROCHE* setu: 17 vzorků bylo pozitivních na HR HPV, 33 vzorků bylo negativních na HR HPV. Při porovnání výsledků stanovení HR HPV pro obě metody izolace bylo dosaženo dobré shody. Pouze ve dvou případech byly vzorky stanoveny jako HR HPV negativní, oproti vzorkům vyizolovaným na kolonkách Ampli Lute, které byly HR HPV pozitivní (Tabulka 3.). Shodný výsledek *AMPLICOR HPV* jsme dostali u 44/50 vzorků.

Tabulka 3. Srovnání výsledků testu Amplicor Roche na HR HPV pro vzorky odebrané do STM media a izolované na kolonkách AmpliLute a automatickém přístroji MagNA Pure ukazuje následující tabulka:

STM		Izolace MagNA Pure			celkem
		+	-	NA	
Izolace Ampli Lute	+	15	2	0	17
	-	0	29	0	29
	NA	2	2	0	4
celkem		17	33	0	50

STM –  
Specimen Transport  
Medium

NA – neamplifikovatelný vzorek

+ pozitivní výsledek amplifikace a detekce HR HPV

- negativní výsledek amplifikace a detekce HR HPV

### Závěr:

Celkem jsme provedli testování 50 vzorků odebraných do odběrového media PreservCyt a 50 vzorků odebraných do Specimen Transport Media firmy Digene, všechny vzorky byly izolovány na kolonkách AmpliLute a současně na přístroji MagNA Pure Compact. Dále jsme prováděli testování přítomnosti HR HPV při použití setu *AMPLICOR HPV*.

Metodou AmpliLute byla DNA úspěšně extrahována u 96% vzorků (96/100; 50 z media PC a u 46 vzorků v STM). Získané výsledky ukazují, že izolace DNA na kolonkách AmpliLute je metoda spolehlivá

zejména pro vzorky odebrané do PC, nevýhodou této metody je její časová náročnost. Vzorky skladované v STM lze také izolovat na kolonkách AmpliLute, ale tyto vzorky hůře protékají přes kolonku než vzorky odebrané do PC. Navíc u 4/50 vzorků v STM došlo k selhání extrakce DNA, tyto vzorky nebyly dále hodnotitelné metodou *AMPLICOR HPV*.

Použití automatické izdace na přístroji MagNA Pure Compact bylo úspěšné u 100% (50/50) vzorků odebraných do STM, u cervikálních stěrů odebraných do PC jsme úspěšnou izolaci u všech 50 vzorků dosáhli až po zakoncentrování 20ml odběrového mediado 1ml. Pouhé navýšení nanášeného objemu ze 100 µl na 250 µl není dostačující. Tato modifikace postupu vyžaduje zařazení dalšího kroku do postupu pre-amplifikační přípravy vzorku a předpokládá určité přístrojové vybavení laboratoře. Lze tedy říci, že izolace DNA na přístroji MagNA Pure Compact ze vzorků odebraných do PC je méně spolehlivá než izolace na kolonkách AmpliLute. Jistého zlepšení lze dosáhnout zakoncentrováním vzorku z 20 ml na 1 ml.

Využití STM jako odběrového médiapro cervikální stěry pro stanovení HPV dává jednoznačně lepší výsledky při přípravě DNA na přístroji MagNA Pure Compact. Mimo kvantitativního efektu (odběr do 1 ml versus odběr do 20 ml PC), může určitý význam hrát i volba doporučeného odběrového kartáčku. Zde je třeba podotknout, že k efektivnímu odběru materiálu z endocervixu je zapotřebí použít kartáček, který je součástí odběrového setu firmy Digene.

RNDr. Ruth Tachezy, Ph.D.  
Národní referenční laboratoř pro papillomaviry  
Ústav hematologie a krevní transfuze  
U Nemocnice 1  
128 20 Praha 2  
tel.: 420-221977222  
fax: 420-221977392  
email: rutach@uhkt.cz

V Praze, dne 20. září, 2006