

TEST KITU PRO DETEKCI A GENOTYPIZACI HPV – High a Low Papilloma Strip 8 + 8 strips (Operon S.A., distributor ASCO-MED spol. s.r.o.)

Princip metody

1/ **High a Low PapillomaStrip 8 + 8 strips** je test založený na PCR a následné reverzní hybridizaci určený pro detekci vysokorizikových typů HPV (HR HPV) (HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73 a 82) a nízkorizikových typů HPV (LR HPV) (HPV 6, 11, 34, 40, 42, 43, 44) v izolované DNA z klinických vzorků. PCR je prováděna s využitím individuálních specifických primerů pro každý typ HPV. Výsledné amplikony jsou značené biotinem. Primery jsou cíleny do oblastí virových onkogenů E6 a E7. Společně se specifickými sekvencemi papillomavirů je amplifikován i úsek genu pro lidský betaglobin nebo GAPDH, které slouží jako kontrola integrity a absence inhibitorů PCR reakce ve vzorku. Biotinylované PCR produkty jsou eventuálně navázány na typově specifické DNA próby kovalentně vázané na povrch nylonových stripů. Po odmytí nespecificky navázaných fragmentů jsou vázané amplikony detekované pomocí konjugátu streptavidinu s peroxidázou. Po přidání substrátu pro peroxidázu tetramethylbenzidinu (TMB) dochází k barevné reakci.

Provedení

Dle smlouvy s distributorem jsme provedli testování analytické citlivosti. Použity byly různé koncentrace (5, 50 a 500 IU/reakci) vzorků obsahujících typy HPV 6, 11, 16, 18 a dále vzorky pozitivní na několik HPV typů. Tyto vzorky byly již dříve charakterizované minimálně dvěma dalšími metodami. Testovaný soubor obsahoval 7 vzorků pozitivních na HR a 7 na LR genotypy a to jak v jednočetné, tak v multiplicitní infekci. Pro amplifikaci byl použit termocykler PTC-200 DNA Engine (MJ Research, USA). Hybridizace byla provedena ve vodní třepací lázni GFL 1086 (Innogenetics, Belgium). Testovány byly vzorky s genotypy 6, 11, 16, 18, 35, 39, 42, 51, 53, 59, 66 a 68.

Hodnocení

Příbalový leták je dostupný pouze v angličtině. Je přehledný, rozdělený na počáteční informace o testu, důležitosti testování a bezpečnosti. Manuál doporučuje používat DNA extrakční kit od firmy OPERON S.A. a uvádí další 4 kity pro DNA extrakci, které výrobce testoval a doporučuje je. Dle manuálu je test vhodný pro DNA izolovanou ze stěrů a biopsií odebraných z cervixu, vagíny a penisu. Je doporučeno nepoužívat žádné transportní médium a izolovat DNA do týdne při skladování vzorku při 2-8°C nebo při delší prodlevě je nutné vzorky skladovat při -20°C.

Kit má dvě interní kontroly, které ověřují validitu vzorků, jiná interní kontrola je použita pro HR HPV a jiná pro LR HPV vzorky. Mimo to je v manuálu doporučeno měřit koncentraci vzorků, neboť jak uvádí výrobce, vzorky i s pozitivní vnitřní kontrolou o koncentraci <10 ng/μl mohou být falešně negativní.

Pro PCR není doporučený specifický termocykler, i když v manuálu výrobce uvádí testování třech různých cyklerů s minimálním rozdílem. Pro hybridizaci výrobce doporučuje PST-60HL THERMO-SHAKER a pro postup je dostupný manuál v angličtině i češtině. Výrobce též uvádí jako alternativní možnost použití přístroje Profiblot T48.

PCR směsi jsou barevně odlišené pro amplifikaci LR a HR HPV typů. Reagencií je dostatek. Příprava PCR je velmi jednoduchá. Samozřejmě vyžaduje oddělené prostory pre-PCR pro míchání směsi a přidávání DNA a post-PCR prostor pro hybridizační analýzu.

Stripy jsou rozlišitelné na LR a HR specifické dle červených pruhů na spodním okraji, 2 vs. 1.

Hybridizace je prováděna při jedné konstantní teplotě. Postup je rychlý. Roztoky jsou připravené k použití a není je třeba ředit. Jediným nedostatkem je kvalita hybridizačních destiček na stripu. Výrobce v manuálu sice upozorňuje, že je třeba opatrnosti, aby nedošlo k jejich perforaci, ale i při vědomí tohoto jsme destičku na jednom místě protrhli. Doporučujeme je vyměnit za jiný odolnější materiál.

Reprodukovatelnost, analytická citlivost, klinická citlivost a specifická testu:

Reprodukovatelnost nebyla po dohodě s distributorem testována, stejně tak nemohla být testována klinická citlivost a klinická specifická.

Analytická citlivost a specifická **High a Low PapillomaStrip 8 + 8 strips** kitu byla testovaná za použití různých koncentrací vzorků a vzorků se smíšenou LR a HR HPV pozitivitou. Kit detekoval HPV 6 a HPV 11 velmi silným signálem v koncentraci 50 i 500 IU na reakci, v multiplicitní infekci správně detekoval HPV 6 a HPV 42 bez zkřížených reaktivit s dalšími HR HPV typy obsaženými ve vzorku. HR HPV 16 detekoval kit velmi slabým signálem v koncentraci 5 IU/reakci, v koncentraci 50 IU/reakci byl signál silný. Stejně tak detekoval kit HPV 18 v koncentraci 50 IU/reakci silným signálem. Všechny vzorky s multiplicitní infekcí detekoval kit správně bez zkřížených reaktivit. Kit nedetekoval pouze HPV 68A (Tabulka 1).

Tabulka 1. Analytická citlivost High a Low PapillomaStrip 8 + 8 strips testu

| # vzorku | Strip | HPV typy | Koncentrace IU/reakci | Interní kontrola | Výsledek High nebo Low PapillomaStrip 8 + 8 strips kitu |
|----------|-------|--------------|-----------------------|------------------|---|
| 1 | LR | 6 | 50 | 1 | 6 velmi slabě |
| 2 | LR | 6 | 500 | 1 | 6 |
| 3 | LR | 11 | 50 | 1 | 11 |
| 4 | LR | 11 | 500 | 1 | 11 |
| 5 | LR | 6,39,53 | * | 1 | 6 |
| 6 | LR | 6,16,18,51 | 50 | 1 | 6 |
| 7 | LR | 42,16 | ** | 1 | 42 |
| 8 | HR | 16 | 5 | 1 | 16 |
| 9 | HR | 16 | 50 | 1 | 16 |
| 10 | HR | 18 | 50 | 1 | 18 |
| 11 | HR | 6,16,18,51 | 50 | 1 | 16,18,51 |
| 12 | HR | 6,39,53 | * | 1 | 39,53 |
| 13 | HR | 42,16 | ** | 1 | 16 |
| 14 | HR | 35,59,66,68A | 500 | 1 | 35,59,66 |

Pozn.

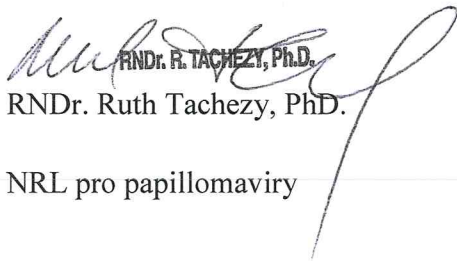
*100 pg/ml HPV6, 1 ng/ml HPV 53 (před izolací)

**100 pg/ml HPV 42, 500 tis. SiHA/ml (HPV 16) (před izolací)

Závěr:

Při testování kitu v omezeném souboru lze uzavřít, že z hlediska analytické citlivosti testovaný set splňuje kritéria deklarovaná výrobcem. Co se týká specificity byly všechny vzorky správně hodnocené bez zkřížených reaktivit. Falešná negativita byla zaznamenána pouze pro typ HPV 68A. Klinickou citlivost kitu jsme nemohli hodnotit a nejsou nám známe publikace ukazující klinickou citlivost kitu. Tento kit ale není cílený pro použití pro primární screening karcinomu hrdla děložního, ale pro určení genotypu HPV pozitivních vzorků. Kit má značku CE pro IVD.

S kitem se dobře pracuje. Cílení PCR do E6 a E7 genu by mělo přinést zvýšení citlivosti průkazu HPV u pacientek s pokročilejším onemocněním (možná falešná negativita testů založených na detekci L1 ORF, která může být při integraci u některých vzorků deletována, či modifikována). Dosud nejsou publikované údaje o klinické citlivosti a specificitě kitu, proto ho nelze doporučit pro rutinní testování pacientek v primárním screeningu pro karcinom hrdla děložního. Nicméně může být dobrou alternativou pro diferenciální diagnostiku HPV infekcí v některých speciálních případech. Kit lze doporučit k použití pouze pro laboratoře disponujícími prostorovým, technickým a personálním vybavením pro provádění molekulárně biologických vyšetření s certifikátem o úspěšném absolvování periodických programů externího hodnocení kvality pro amplifikační metody.


RNDr. R. TACHEZY, Ph.D.
RNDr. Ruth Tachezy, PhD.

NRL pro papillomaviry

V Praze, dne 1.4.2014