

# TEST KITU PRO DETEKCI HPV – Seeplex® HPV4A ACE Screening, Seegene

## Princip metody

Test je určen pro detekci HPV DNA ve vzorcích cervikálních stěrů. Test detekuje HPV typy 16 a 18 a dále je schopen rozlišit skupinu 16 velmi rizikových typů HPV (HPV 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82) a málo rizikové typy HPV 6 a 11. HPV4A ACE Screening je test založený na amplifikaci fragmentu HPV za použití specifických oligonukleotidů – „dual priming oligonucleotide“. Produkt této reakce je následně vizualizován na elektroforéze. Velikost PCR produktů HPV se pohybuje od 230 pb do 588 pb. Současně s typem HPV je amplifikována interní kontrola o velikosti 1000 pb pro kontrolu amplifikace a integrity testované DNA. Výsledek se odečítá na základě barevné reakce. Test je určen pro 50 reakcí. Součástí kitu je negativní a pozitivní kontrola PCR a hmotnostní marker pro kontrolu elektroforézy.

## Provedení

K testování kitu firmy Seegene jsme použili DNA vzorků, u nichž byla přítomnost HPV DNA ověřena řadou komerčních testů pro detekci HPV a u většiny byla známa virová nálož (počet genomických jednotek v  $\mu$ l vzorku). Dále byly testovány vzorky z banky NRL pro PV izolované pomocí Qiagen DNA mini kitu. Tyto vzorky byly ověřeny a genotypovány pomocí komerčního testu Hybrid capture a in-house metody založené na PCR a reverzní hybridizace s próbami specifickými pro 37 typů HPV. Celkem jsme testovali 48 vzorků. PCR reakci podle firemního protokolu prováděl vždy stejný pracovník na cykleru firmy Seegene. První dvě PCR byly provedeny stejným způsobem se stejnou sadou vzorků v různý den s kity různé šarže pro zjištění reprodukovatelnosti testu. Třetí kit byl rozdělen na polovinu a PCR s 23 vzorky společně s kontrolami byla amplifikována v termocykleru firmy Seegene a zároveň druhá polovina vzorků v cykleru MJ Research firmy Perkin Elmer. Po reakci bylo provedeno ozáření UV, neboť výrobce deklaruje tento krok jako prevenci proti kontaminaci vzorků a po provedené elektroforéze již tento krok preventivní charakter nemá. Po PCR reakci byla provedena elektroforéza na 2% agarózovém gelu NuSieve 3:1 (Lonza, Švýcarsko) s barvičkou GelRed™ (Biotium) a hmotnostním markerem Low range firmy Fermentas a HPV4A ACE Markerem firmy Seegene. Na elektroforézu bylo pipetováno 5  $\mu$ l vzorku. Některé vzorky byly naneseny společně s barvičkou na 3% agarózovém gelu NuSieve 3:1 s barvičkou GelRed™ a hmotnostním markerem Low range firmy Fermentas a HPV4A ACE Markerem firmy Seegene pro snadnější odečet výsledků. Výsledky elektroforézy odečítaly nezávisle na sobě dva různí pracovníci. Na žádost distributora byla na závěr provedena ještě jedna PCR s 11 vzorky s vícečetnou infekcí v cykleru MJ Research firmy Perkin Elmer, bez UV ozařování a elektroforézou na 2% a 3% agarózovém gelu NuSieve 3:1 (obr.1.).

## Hodnocení

### Příbalový leták

Příbalový leták v češtině i angličtině je přehledný, rozdělený na počáteční informace o testu, důležitosti testování a bezpečnosti. Protokol obsahuje část odběr, skladování a transport vzorků, část izolace nukleové kyseliny, část amplifikace a detekce pomocí automatických systémů nebo elektroforézy. Na konci příbalového letáku je analýza výsledků a řešení problémů. V příbalovém letáku je uvedena certifikace EU pro in vitro diagnostiku, pro ostatní země pouze pro výzkumné účely. Nebezpečí kontaminace PCR produktů a PCR mixů je v příbalovém letáku popsáno, ale není úplně jasně zdůrazněná nutnost oddělit provádění pre- a post PCR postupů, aby nedošlo ke zkreslení výsledků. Metoda izolace NK automatickým purifikačním systémem není dostatečně popsána. Také není v protokolu na začátku uvedeno, zda lze použít jiný cykler k amplifikaci cílové DNA (např. cykler firmy Seegene). Nutnost ozáření vzorků po detekci je popsána jen v poznámce, na str. 16 chybí doba nutná k ozáření UV. Pro detekci na automatickém systému se přidává barvička (loading buffer, dye) ke vzorku. Pro detekci pomocí elektroforézy v agarózovém gelu tato barvička není specifikovaná.

Příbalový leták v češtině obsahuje nepřesné či nesprávně přeložené termíny (liquid based cervical cytology specimen – tekutý cytologický cervikální vzorek, správně cytologie na tenké vrstvě, hypochlorid – hypochlorid, v češtině správně chlornan, cervical cancer – rakovina cervixu, správně karcinom děložního čípku nebo hrdla, collumnar – kolumnárních, správně cylindrických). Pro detekci pomocí automatických systémů není moc postup jasně popsán, hmotnostní marker je jednou označován jako marker jednou jako ladder, barvička jako loading buffer.

### Amplifikace a elektroforéza

Příprava PCR reakce proběhla bez problémů, všech reagensů je dostatek na 52 vzorků. Je nutná opatrnější manipulace s 2x Multiplex Master Mixem, který může pěnit. Amplifikace na cykleru firmy Seegene trvala delší dobu než predikoval cykler (4h místo 3,5h). Z protokolu není zřejmé, zda je možnost během testování proces přerušit a vzorky uložit na -20°C po PCR amplifikaci a jak dlouho firma garantuje stabilitu PCR produktů.

Problémem může být vizualizace PCR produktů na elektroforéze. Vzorky v našem systému, bez přidané barvičky, špatně držely v jamičce a snadno difundovaly do roztoku TBE. Proto jsme některé vzorky opakovali s přidanou barvičkou na elektroforézu. Problémem bylo i rozdělení HPV4A ACE Markeru a některých vzorků převážně s vícečetnou infekcí HPV. Identifikace výsledků tedy nebyla jasná a jednoznačná, a i když jsme nakonec měli mezi dvěma operátory 100% shodu odečtu výsledků, ale zvláště u hraničně pozitivních vzorků byl odečet obtížný. Pro práci v laboratoři je proto případně nutná optimalizace laboratorního detekčního systému tak, aby identifikace vzorků byla jednoznačná.

### Citlivost, specifita testu a reprodukovatelnost:



Reprodukovatelnost testu při použití dvou setů s různým Lot číslem byla 94% (vzorky, které vykazovaly diskrepantní výsledky obsahovaly hraniční množství viru nebo obsahovaly více typů HPV), u vzorků s malou virovou náloží se projevila mírně vyšší citlivost při amplifikaci na termocykleru Seegene. Všechny negativní vzorky byly negativní, v jednom vzorku jsme detekovali hraniční množství HPV 18, které jinými metodami detekováno nebylo. Vzhledem k tomu, že se jednalo o vzorek s vícečetnou infekcí, nelze vyloučit, že vzorek HPV 18 skutečně obsahoval a různé testy ho detekují s různou citlivostí.

Výrobce deklaruje citlivost 100 kopií virové DNA/reakci. Testovaný set prokázal velmi dobrou citlivost 50-500 kopií virové DNA/reakci a to i v multiplicitní infekci. Detekce HPV 16 a 18 s virovou náloží 5/kopií na reakci je již pod detekčním limitem metody. U vzorků se znalostí semikvantitativní nálože test detekoval vzorky s vyšší virovou náloží. Vzorky slabě pozitivní v metodě BS RLB byly testovaným kitem negativní.

### **Závěr:**

Testovaný set splňuje kritéria deklarovaná výrobcem, hlavním problémem je detekce PCR produktů na gelu a jednoznačnost odečtu při manuálním zpracování. Český příbalový leták je třeba ještě podrobit korektuře. Práce s kitem je bezproblémová, vlastní provedení je časově nenáročné. Test prokázal velmi dobrou analytickou citlivost. Pro rutinní použití pro testování žen v primárním screeningu a sledování žen po léčbě či po nálezů suspektního cyto- a/nebo kolposkopického nálezů je třeba ověřit i jeho klinickou citlivost.

RNDr. Martina Saláková, PhD.

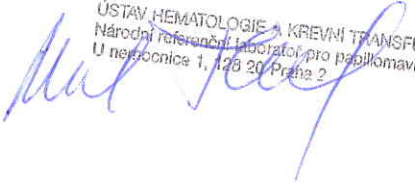
V Praze, dne 6.6.2012

RNDr. Ruth Tachezy, PhD.

RNDr. Jana Šmahelová

NRL pro papillomaviry

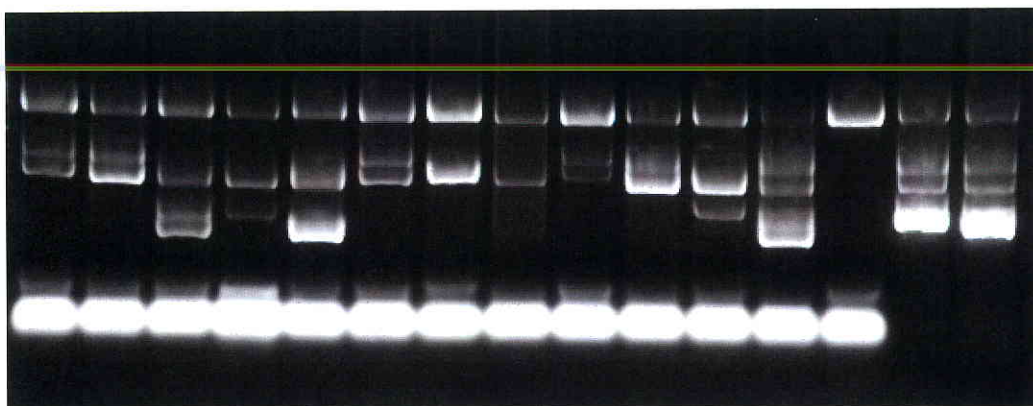
ÚSTAV HEMATOLOGIE A KREVŇÍ TRANSFUZE  
Národní referenční laborator pro papillomaviry  
U nemocnice 1, 128 20 Praha 2



Obr. 1.: Porovnání PCR se vzorky s vícečetnou HPV infekcí na 2% agarózovém gelu (A) a 3% agarózovém gelu (B)

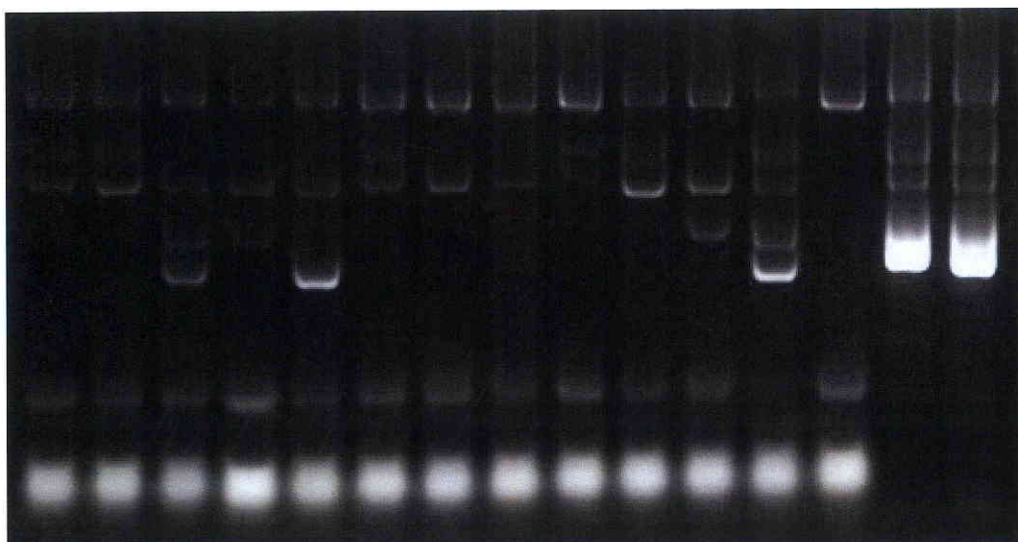
A

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



B

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



Legenda: 1 #6, 2 #23, 3 #24, 4 #25, 5 #34, 6 #35, 7 #36, 8 #37, 9 #38, 10 #39, 11 #40, 12 pozitivní kontrola firmy Seegene, 13 negativní kontrola firmy Seegene, 14 hmotnostním markerem HPV4A ACE Marker 1 firmy Seegene, 15 hmotnostním markerem HPV4A ACE Marker 2 firmy Seegene