

## Test kitu Xpert HPV firmy Cepheid, distributor Biovendor

### Princip metody

Xpert HPV test od firmy Cepheid slouží pro kvalitativní detekci HPV DNA pomocí real-time PCR v kazetách na GeneXpert platformě. Test detekuje E6/E7 oblast HPV genomu 14 vysoko-rizikových HPV typů (16, 18, 45, 31, 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 59, 66 a 68). Detekce je zajištěna na pěti fluorescenčních kanálech: (1) HPV 16, (2) HPV 18 a 45, (3) HPV 31, 33, 35, 52 a 58, (4) HPV 51 a 59, (5) HPV 39, 56, 66 a 68. Další šestý kanál (SAC) slouží k detekci lidského referenčního genu a sleduje, zda vzorek obsahuje adekvátní množství lidských buněk sloužících jako hodnocení kvality vzorku. V každé kazetě je také přítomna kontrola sond a reagensů (PCC). Test dokáže odlišit typy 16 a 18/45, u ostatních typů zjišťuje pouze jejich přítomnost.

Jedná se o uzavřený systém, který sám provede izolaci DNA, amplifikaci DNA a detekci v reálném čase po přidání 1 ml vzorku odebraného do transportního média. Test akceptuje pouze vzorky v médiu PreservCyt. Výhodou tohoto systému je snížená možnost křížové kontaminace mezi vzorky a jeho rychlost. Do jedné hodiny již můžeme znát výsledek. Pro uživatele je tento test velmi jednoduchý na provedení. Součástí 10 kusového balení kazet jsou sterilní jednorázové pipety a CD s aktuální verzí softwaru.

### Provedení testu

Pro testování bylo vybráno 30 vzorků cervikálních stěrů v médiu STM (Specimens transport medium) vyšetřených metodou Hybrid capture 2 od firmy Qiagen. Padesát µl vzorku bylo přidáno do 1 ml média PreservCyt a z takto připraveného vzorku byl do reakce přidán 1 ml.

Dále jsme testovali 30 referenčních vzorků se známým HPV typem a známou koncentrací HPV (HPV genomové ekvivalenty (GE)). Iničiálně jsme testovaly vzorky bez pozadí HPV negativních buněk. Výsledky však byly neuspokojivé. Proto jsme v dalším kroku pro tyto vzorky použili HPV negativní buňky HaCat v koncentraci 300 tisíc buněk na 1 ml vzorku jako buněčné pozadí. Referenční vzorky byly testovány v různých koncentracích.

Testovány byly také vzorky s multiplicitní infekcí i dva nízko-rizikové typy HPV 6 a 11 (viz. Tabulka. 2).

### Hodnocení NRL

#### Manuál

Manuál k přístroji je přeložen do češtiny, je velmi přehledný a obsahuje veškeré informace o přístroji. Manuál je členěn do 9 kapitol: Úvod, Instalace, Principy fungování, Charakteristiky a specifikace výkonu, Provozní pokyny, Kalibrace a kontrola kvality, Bezpečnostní opatření a omezení, Bezpečnostní rizika, Oprava a údržba, Přílohy.

K vlastnímu HPV testu je přiložen velmi přehledný anglický návod obsahující dobře popsanou proceduru zpracování vzorku doprovázenou obrazovou dokumentací.



Kapitola interpretace výsledků je dobře srozumitelná. Návod také obsahuje údaje o klinické validitě, limitech detekce a údajích o přesnosti a opakovatelnosti.

V návodu jsou uvedené i detekční limity HPV DNA plazmidů pro jednotlivé typy HR HPV použitých v testu. Tato tabulka není moc srozumitelná a zasloužila by si lepší vysvětlivky.

### HPV detekce

Práce s tímto testem je pro uživatele jednoduchá a relativně rychlá. Software k HPV testu je přehledný a práce s ním je, po přečtení návodu, jednoduchá. V uživatelském rozhraní jsou jednotlivé funkce vyobrazeny ve formě ikon, mezi kterými lze přepínat. Výsledky lze exportovat do csv formátu. Výsledkové protokoly jsou ukládány v pdf formátu. Na výsledkovém protokolu jsou zobrazeny veškeré důležité parametry a je zde i kolonka pro podpis.

Při testování se ze začátku vyskytla chyba 2035 v jednom modulu, dle manuálu lze dobře chybu identifikovat. Jednalo se o chybu sonikátoru. Ve výsledku testu systém chybu také dobře popisuje. Následně byl kontaktován technik, data byla odeslána na podporu do centrály a poté byl celý modul vyměněn za nový.

### Výsledky

#### Testování klinických vzorků

Vnitřní kontroly u klinických vzorků SAC vyšly všechny validně s průměrnou hodnotou Ct = 28,8.

Ve srovnání s velmi rozšířenou platformou hc2 pro detekci HR HPV typů tento systém poskytuje srovnatelné výsledky (viz Tabulka. 1). Obě metody shodně z 29 vzorků detekovali 20 pozitivních na HR HPV (68,9 %) a 3 (10,4 %) negativní. Tři vzorky pozitivní (10,4 %) v Hc2 HR HPV byly na Xpert negativní, ve 2 z těchto případů se jednalo o vzorky hraničně pozitivní na Hc2. Navíc se jednalo o typy 53 a 82, které HPV Xpert nedetekuje. Další tři vzorky (10,4 %) negativní na Hc2 HR HPV byly na Xpert pozitivní, což může být způsobeno vysokou citlivostí metody real-time PCR. Pokud vyřadíme z analýzy dva vzorky s HPV typy, které testovaný systém nedetekuje, je shoda mezi oběma systémy HPV detekce téměř perfektní (Kappa=0,869).

Tabulka 1. Srovnání HPV Xpert testu a HR Hc2 testu

		HR Hc2		
		+	-	
Xpert	+	20	3	23
	-	1	3	4
		21	6	

#### Testování referenčních vzorků

Při testování referenčních vzorků byly zpočátku vyzkoušeny vzorky extrahované DNA pouze v PreservCyt bez buněčného pozadí. U těchto vzorků nebyla detekována SAC a systém je vyhodnotil jako nevalidní.



Vnitřní kontroly u DNA referenčních vzorků s pozadím HaCat vyšly správně, s průměrnou hodnotou Ct = 28,2. Pro detekci jednotlivých typů HPV test detekuje HPV 16 v koncentraci 500 GE a HPV 18 v koncentraci 50 GE. HPV typ 39 nebyl detekován ani v koncentraci 2000 GE. Každý z jednotlivých typů byl detekován ve správném fluorescenčním kanálu. U multiplicitní infekce HPV 31 a 52 není možné typy odlišit z důvodu toho, že jsou detekovány na stejném fluorescenčním kanálu. Výrobce v návodu uvádí detekční limity pro HPV pozitivní buněčné linie, a detekční limit pro HPV 18 (46 buněk na 1 ml) ve srovnání HPV 16 (81 buněk na 1 ml) je nižší, což dokládají i naše výsledky (viz. Tabulka. 2). V návodu jsou uvedené i detekční limity HPV DNA plazmidů pro jednotlivé typy HR HPV použitých v testu. Uvedený detekční limit je 10-30 kopií plazmidu na reakci. Při našem testování jsme detekovali HPV 16 v koncentraci 500 GE (uvedeno výrobcem 10 GE/vzorek) a HPV 18 v koncentraci 50 GE (10 GE/vzorek) (viz. Tabulka. 2), což je nižší citlivost, než uvádí výrobce. Výrobce však v tomto testu citlivosti místo pozadí HPV negativních buněk použil lidskou DNA. Zda je pozorovaná nižší citlivost daná touto změnou, jsme netestovali.

Tabulka 2. Detekční limity pro jednotlivé HPV typy

Typ HPV	GE/vzorek						
	jeden typ HPV					více typů HPV	
	50	200	500	1000	2000	50	500
6*			-				
11*			-				-
16	-		+			-	+
18	+						+
31				-	+		+/-
33			+			-	+
35			+				
39			-	-	-		
45		+				-	+
51			-	+		-	+
52							+
56			-	+			
58			-	-	+		
59			+				
66							
68a			-				
68b			-		-		


\* Tyto HPV typy systém nedetekuje

**Závěr**

Ověřování setu Xpert HPV firmy Cepheid v naší laboratoři ukázalo dobrou shodu s výsledky testování klinických vzorků FDA povoleným kitem pro detekci vysoko-rizikových typů HPV (Hc2 HR HPV, Qiagen). Při testování referenčních vzorků jsme zjistili různou citlivost testu pro různé HPV typy. V naší laboratoři vycházela citlivost testování těchto referenčních vzorků nižší, než uvádí výrobce, což mohlo být způsobené použitím odlišného HPV negativního pozadí. Systém je uzavřený, provedení testu jednoduché, vhodné pro rutinní využití a velmi rychlé. Publikovaná studie (Einstein a spol., 2014) srovnávající klinickou relevanci Xpert HPV testu a dvou FDA povolených testů pro detekci HR HPV ve screeningu; testů Cobas a Hc2 HR HPV; ukázala srovnatelné parametry pro detekci žen v riziku prekanceróz hrdla děložního. Test je tedy vhodný pro použití v primárním screeningu hrdla děložního.

**Literatura**

Clinical Evaluation of the Cartridge-Based GeneXpert Human Papillomavirus Assay in Women Referred for Colposcopy. Mark H. Einstein, Katherine M. Smith, Thomas E. Davis, Kathleen M. Schmeler, Daron G. Ferris, Ashlyn H. Savage, Jermaine E. Gray, Mark H. Stoler, Thomas C. Wright, Jr., Alex Ferenczy, Philip E. Castle. Journal of Clinical Microbiology, 2014, 52, 6, 2089 –2095.



RNDr. Ruth Tachezy, Ph.D.  
vedoucí NRL pro papillomaviry

V Praze, dne 2.2.2016