

EHK - 534 Detekce papillomavirů

V roce 2007 se do okruhu EHK - 543 Detekce papillomavirů přihlásilo 30 laboratoří, z nich 29 vrátilo vyplněné výsledkové protokoly. Každá laboratoř dostala 5 vzorků, které simulují klinické vzorky pro stanovení přítomnosti a případně určení typu lidských papillomavirů (HPV). Vzorky obsahují různé koncentrace klonů HPV DNA nebo HPV pozitivních buněčných linií na pozadí HPV negativních lidských buněk.

HODNOCENÍ

Každý vzorek je hodnocen na přítomnost nízkorizikových (LR) a vysokorizikových (HR) typů HPV. Správné vyhodnocení vzorku v obou parametrech je ohodnoceno 2 body, maximální možný zisk je tedy 10 bodů. Při hodnocení výsledků vždy přihlížíme k detekčním možnostem jednotlivých diagnostických setů, zejména u systémů založených na PCR. Pokud tyto sety umožňují typování HPV, posuzujeme i správné určení jednotlivých typů HPV.

Požadované výsledky EHK – 534 stanovené v NRL PV ukazuje tabulka 1:

Tabulka 1:

Vzorek č.	LR HPV		HR HPV	
	výsledek	typ HPV	výsledek	typ HPV
1	pozitivní	6	pozitivní	33
2	pozitivní	42	negativní	-
3	negativní	-	pozitivní	16,18
4	negativní	-	negativní	-
5	negativní	-	pozitivní	16

VÝSLEDKY

Neamplifikační metody detekce HPV

Nejčastěji využívaným testem detekce HPV v diagnostických laboratořích je Hybrid Capture 2 (hc2; Digene) - 17 laboratoří - a HR hc2 - 4 laboratoře. Celkem 20 laboratoří vyhodnotilo vzorky správně, pouze jedna si vyžádala opravnou sérii. Použití této metody detekce HPV se ukazuje jako bezproblémové.

Amplifikační metody detekce HPV

Amplifikační metody detekce HPV, různé komerčně dostupné i „in house“, využilo celkem 9 laboratoří. Jedna laboratoř vyšetřila vzorky souběžně pomocí hc2 i amplifikační metodou.

U vzorku č. 1 se typ HPV 6 nepodařilo zachytit 2 laboratořím (metoda „in house“ nested PCR, Gentech HPV Test) a typ HPV 33 jedné laboratoři (Gentech HPV Test).

Největší problémy s detekcí HPV jsme zaznamenali u vzorku č. 2. U laboratoří používajících PCR metody jsme zjistili, že pouze systém využívající primery GP5+/6+, který i my užíváme jako referenční, detekoval LR typ HPV 42. Vzorek jsme dále analyzovali pomocí dalších systémů PCR. Použitá koncentrace 100 pg DNA HPV 42 ve vzorku č.2 se ukázala jako hraniční pro detekci pomocí PCR systémů založených na primerech MY09/11. V naší laboratoři jsme touto PCR s následnou Southern blot hybridizací se značenými próbami detekovali koncentraci 1 ng DNA HPV 42/reakci, systémem GP5+/6+ s následnou obrácenou hybridizací ještě koncentraci 1 fg/reakci. Tento výsledek potvrzuje již dříve pozorovanou skutečnost, že různé systémy PCR detekují jednotlivé typy HPV s různou „ochotou“ [1, 2]. Při dodatečném

ověřování systému primerů SPF (INNO-Lipa, Innogenetics), který použily dvě laboratoře, byl vzorek č. 2 v našich podmínkách hodnocen jako HPV 42 pozitivní. V tomto případě se zdá pravděpodobné, že pro správnou diagnostiku mohla být rozhodující pre-amplifikační fáze přípravy vzorku, zejména zvolená metoda izolace DNA a případné naředění cílové virové DNA. Je zajímavé, že koncentrace HPV DNA, která byla hraniční pro některé PCR systémy, se jako hraniční neprojevila pro neamplifikační metodu detekce HPV hc2. U všech laboratoří byl proto z výše uvedených důvodů i negativní výsledek vyšetření posuzován jako správný.

Vzorek č. 3, který byl LR HPV DNA negativní, určila jedna laboratoř jako pozitivní (metoda „in house“ nested PCR). Dvě laboratoře nedetekovaly HPV 16 a 18 a určily vzorek jako HR HPV negativní (metoda „in house“ nested PCR GALI Biotech HPV Chip), což z hlediska klinické významnosti těchto typů považujeme za zvlášť závažnou chybu.

Vzorek č. 4, který byl HPV LR i HR negativní, chybně vyhodnotila jako HR HPV pozitivní jedna laboratoř (Roche Amplicor HPV Test). Zřejmě se jednalo o kontaminaci vzorku při vyšetření.

Přítomnost HR HPV 16 ve vzorku č. 5 určily všechny laboratoře správně.

Souhrn celkových výsledků EHK – 534 a počet chybujících laboratoří uvádí tabulka 2:

Tabulka 2:

Počet chyb	Počet laboratoří	
	Neamplifikační metody detekce	Amplifikační metody detekce
0	20	5
1	0	2
2	0	1
3	0	1
4	1	0
Celkem	21	9

Podrobné tabulky výsledků EHK – 534 jsou zveřejněny na internetových stránkách na adrese: www.papillomavirus.cz/cinnost_ehk.html.

ZÁVĚR

Okruhu EHK – 534 Detekce papillomavirů se zúčastnilo 29 laboratoří. Certifikát jsme doporučili vydat 24 laboratořím, z toho jedné pro neamplifikační i amplifikační metodu detekce HPV. Ostatním laboratořím jsme doporučili vyžádání opravné série EHK.

Z našich zkušeností vyhodnocování výsledků EHK vyplývá, že zejména při použití PCR systémů detekce je nutné dbát na dodržování zásad správné laboratorní praxe.

LITERATURA

- Gillio-Tos A., De Marco L., Ghisetti V., Snijders P. J., Segnan N., Ronco G., Merletti F. Human papillomavirus typing with GP5+/6+ polymerase chain reaction reverse line blotting and with commercial type-specific PCR kits. *J. Clin. Virol.* 2006; 36: 126-132.
- Remmerbach T. W., Brinckmann U. G., Hemprich A., Chekol M., Kuhndel K., Liebert U. G. PCR detection of human papillomavirus of the mucosa: comparison between MY09/11 and GP5+/6+ primer sets. *J. Clin. Virol.* 2004; 30: 302-308.

RNDr. Jana Šmahelová
RNDr. Ruth Tachezy, Ph.D.
NRL pro papillomaviry
Ústav hematologie a krevní transfuze
U Nemocnice 1, 128 20 Praha 2
www.papillomavirus.cz