

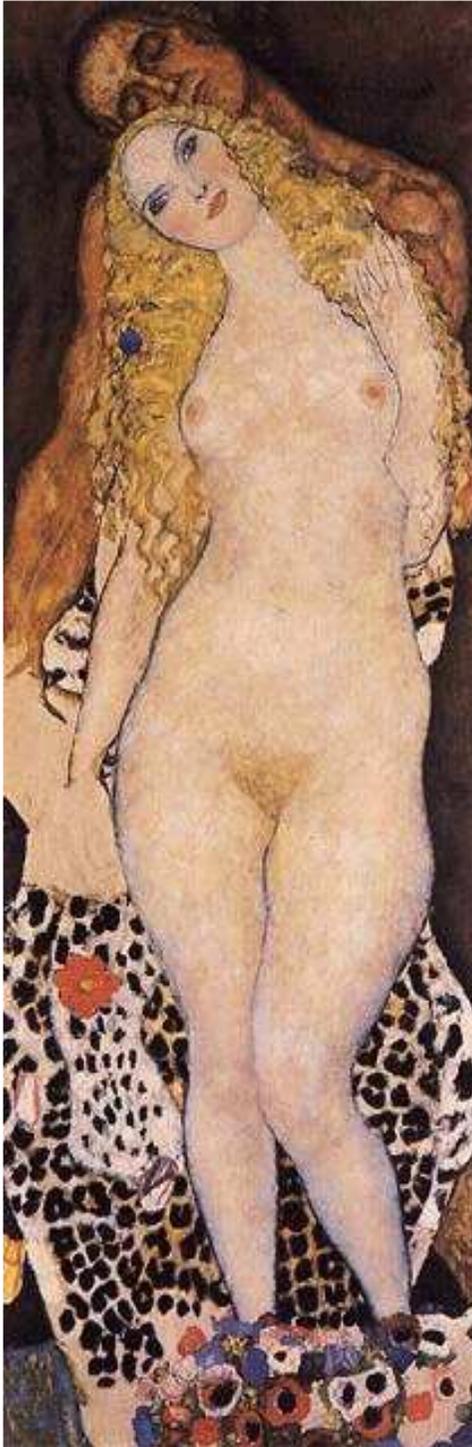
La diagnostica molecolare delle malattie sessualmente trasmesse (non HIV):
nuovi percorsi di appropriatezza analitica e clinica.



“La tecnologia Seegene per la diagnosi delle Malattie Sessualmente Trasmesse in Real Time PCR”



Relatore: Fabio Benzi



La diagnostica molecolare delle malattie sessualmente trasmesse (non HIV):
nuovi percorsi di appropriatezza analitica e clinica.

Il laboratorio di biologia molecolare sempre di più deve cercare di trovare il giusto compromesso tra le richieste dei clinici e quelle dell'amministrazione:

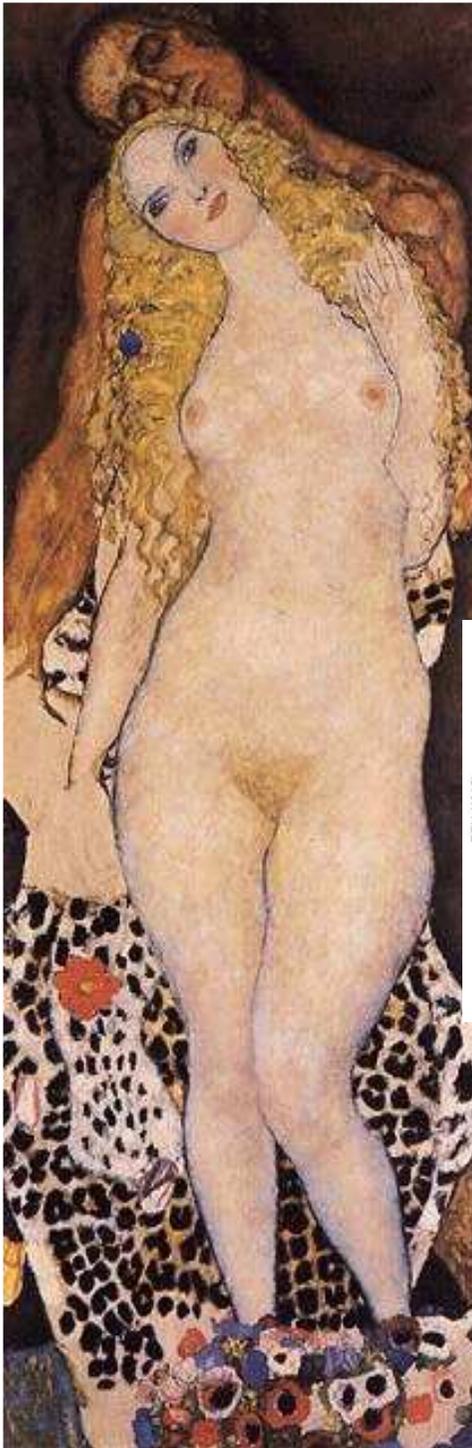


- Aumentare la lista di patogeni identificabili

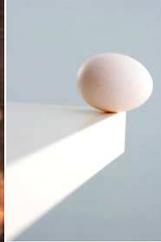


- Contenere o addirittura diminuire i costi

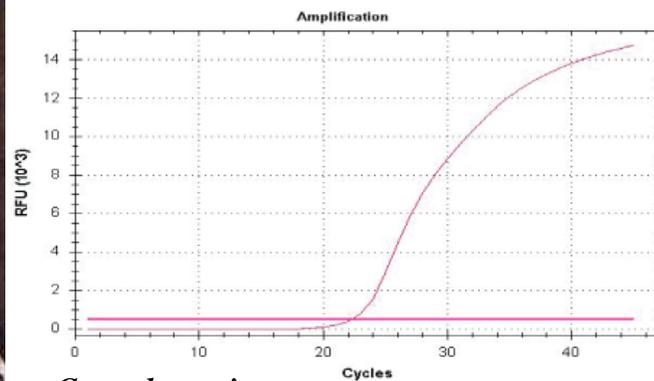
La PCR Real-time aiuta molto il laboratorista in quanto permette di fare diagnosi in tempi brevi, è una metodica molecolare con un'alta sensibilità e riproducibilità, ed inoltre la reazione si svolge in un sistema chiuso, questo diminuisce notevolmente il rischio di contaminazione.



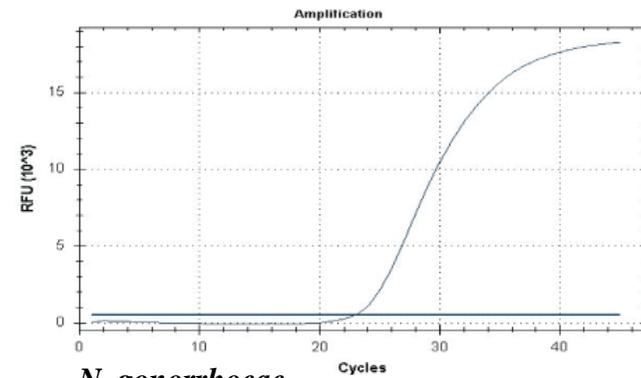
La diagnostica molecolare delle malattie sessualmente trasmesse (non HIV): nuovi percorsi di appropriatezza analitica e clinica.



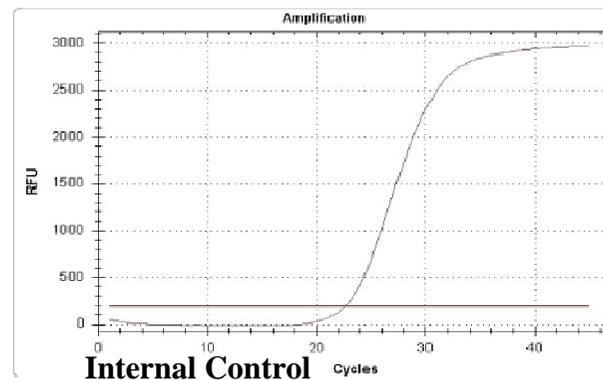
Con la PCR Real-Time si ha la possibilità di identificare un patogeno target su ogni canale di fluorescenza e quindi, grazie ai più moderni termociclatori in real-time, si ha la possibilità di lavorare in multiplex sfruttando le diverse lunghezze d'onda. Purtroppo la PCR Real-Time “classica” ha già raggiunto il top, e per limiti fisici della tecnologia non può evolversi oltre.



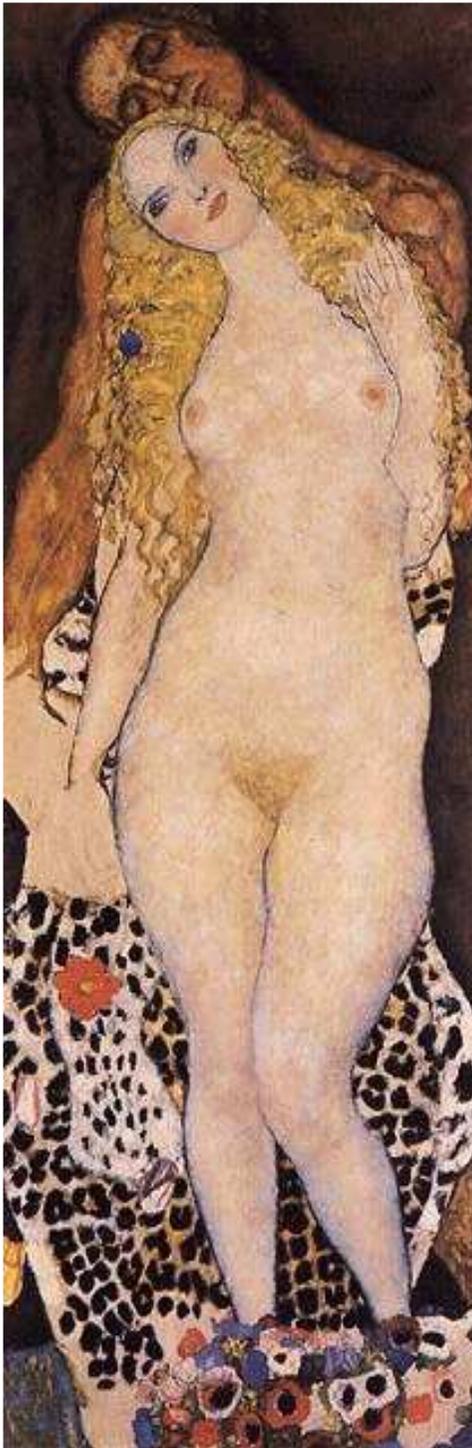
C. trachomatis



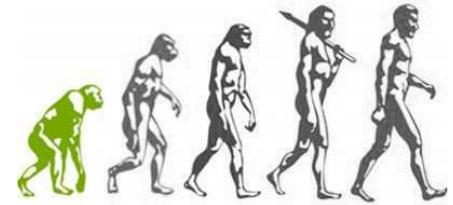
N. gonorrhoeae



Internal Control



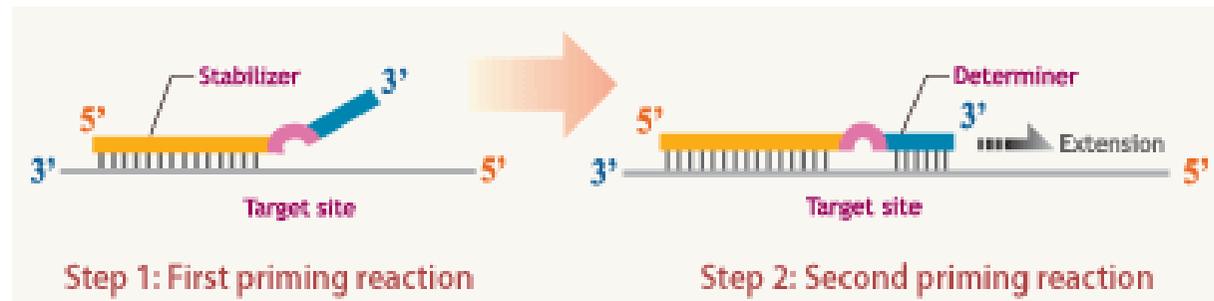
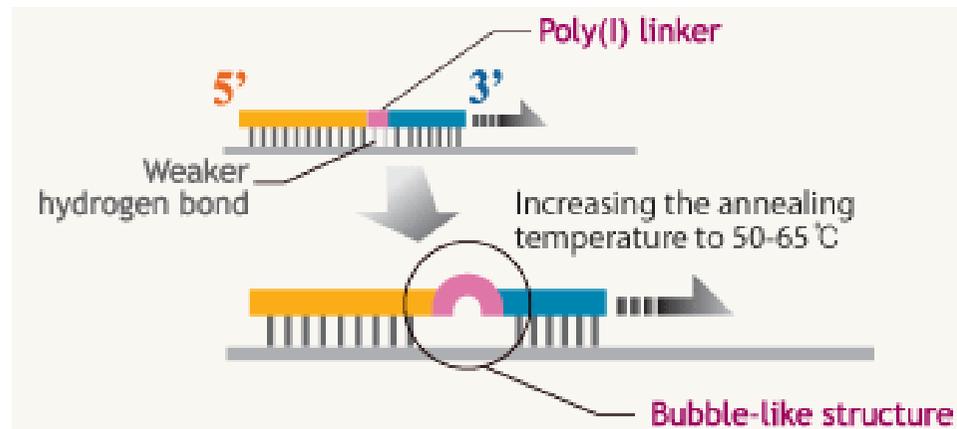
Primer DPO

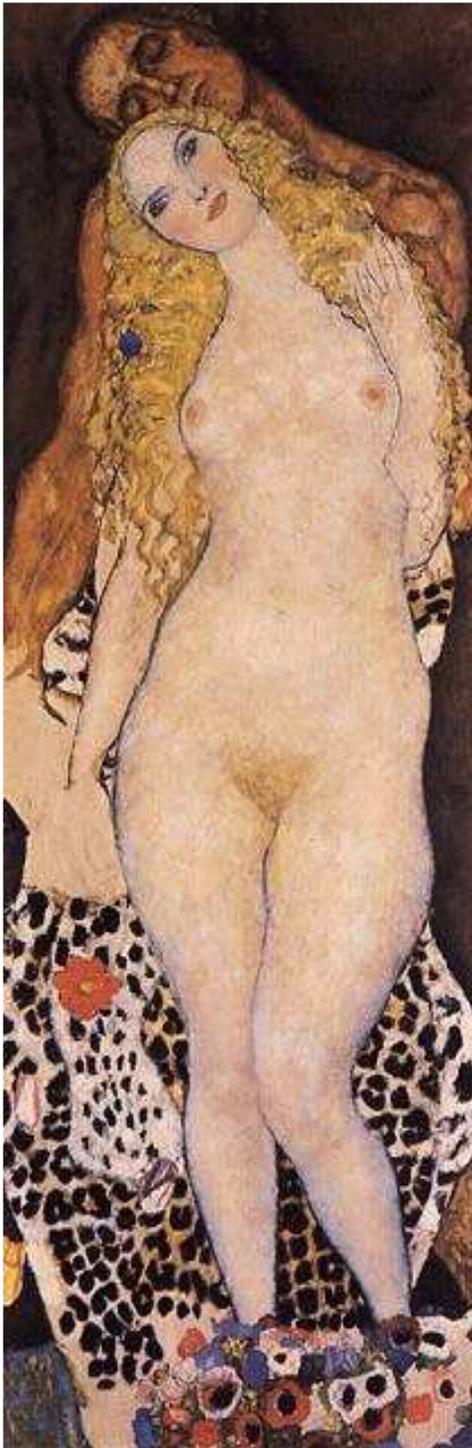


DPO: Dual Priming Oligo

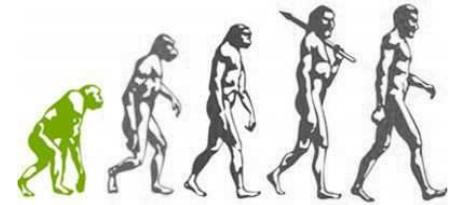
Il **primer DPO™** ha due regioni funzionali, di diversa lunghezza, separate da un linker di poli-deossiinosine., chiamato poly(I).

Alla temperatura di annealing, il poly(I) linker, a causa dei deboli legami idrogeno che crea con la sequenza templato, tende a formare una struttura definita *bubble-like*, la quale necessita di avere un intorno ad alta stabilità ottenibile esclusivamente da un perfetto allineamento sul templato delle due strutture di priming.

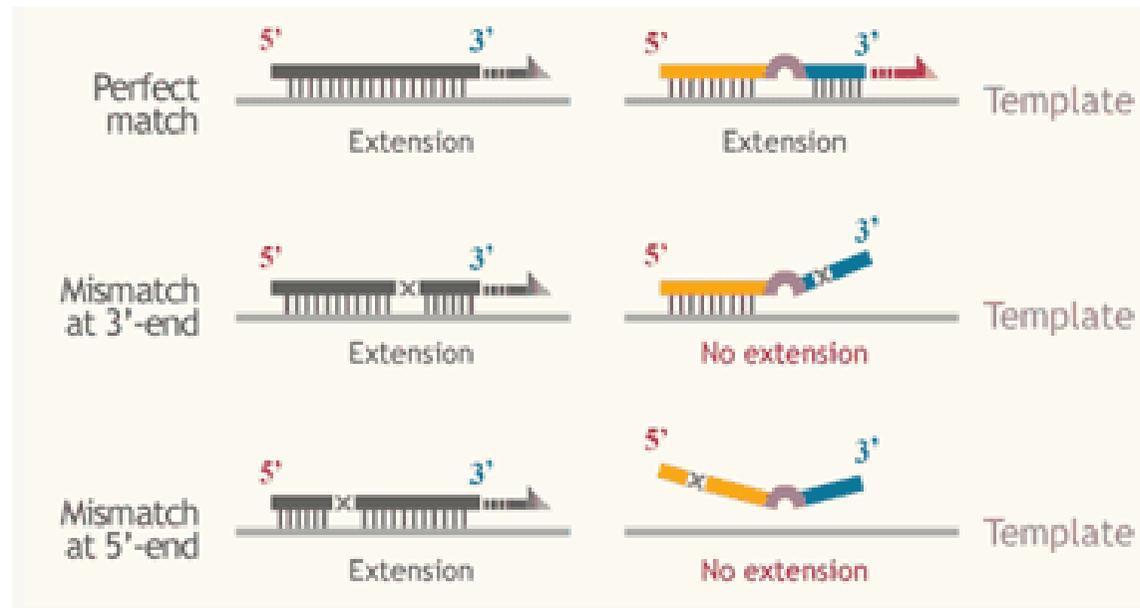


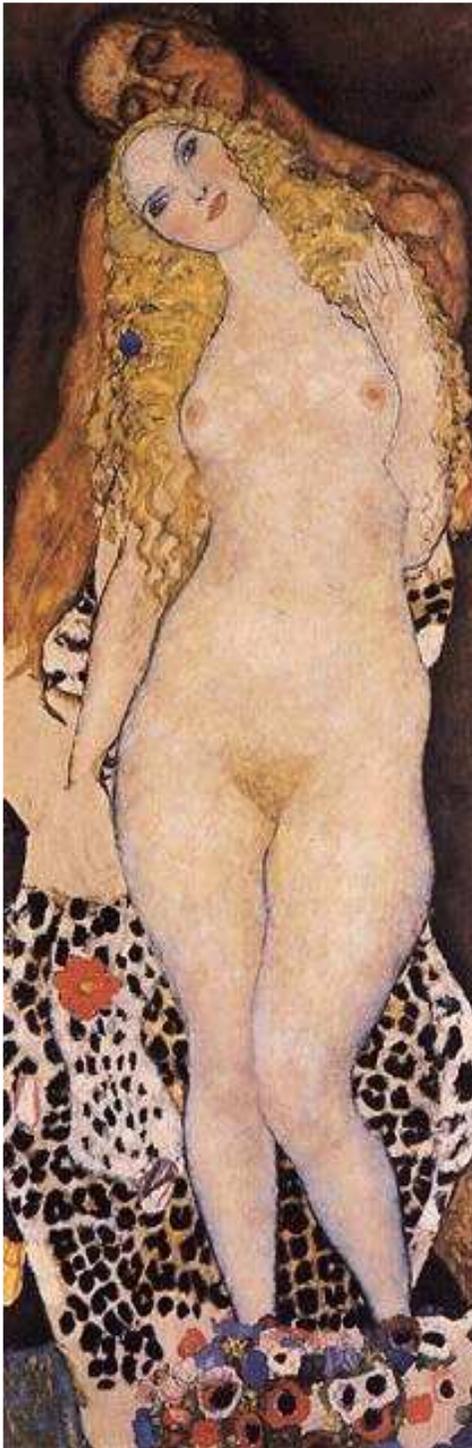


Primer DPO

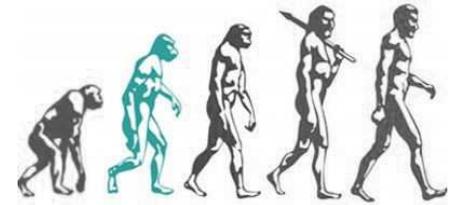


Se entrambe le due condizioni di priming non vengono soddisfatte, non si ha l'estensione del filamento (al contrario dei primers convenzionali, i quali sono in grado di innescare una reazione di PCR anche se presentano mismatch nella sequenza).





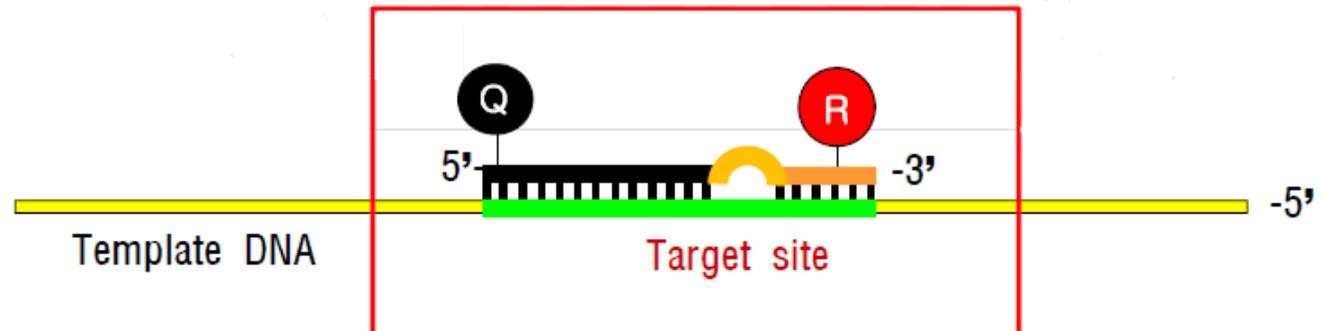
Sonde READ

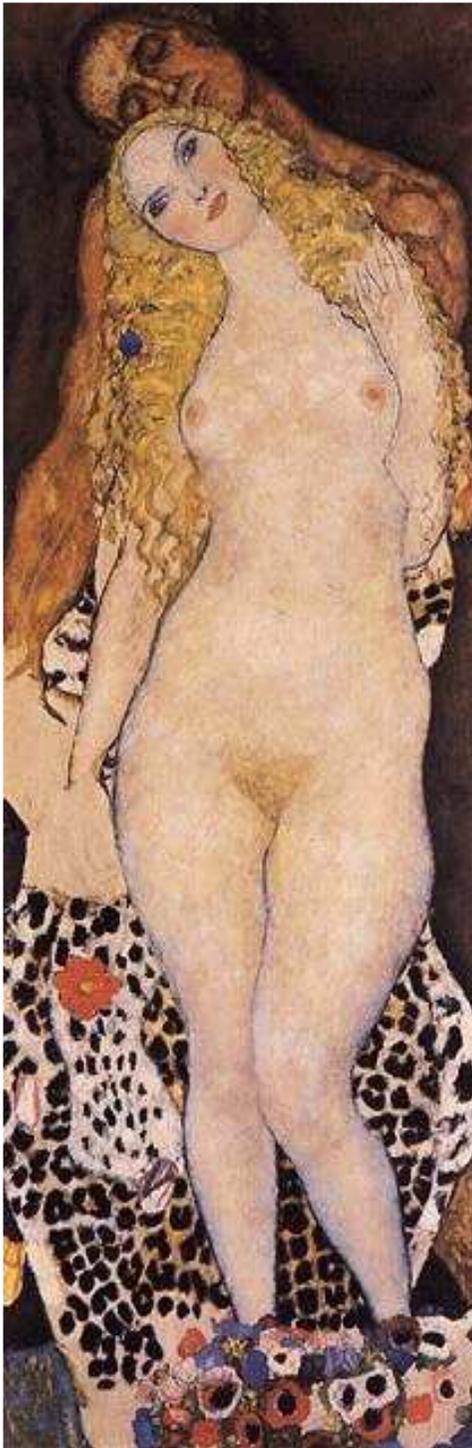


READ: Real Amplicon Detection

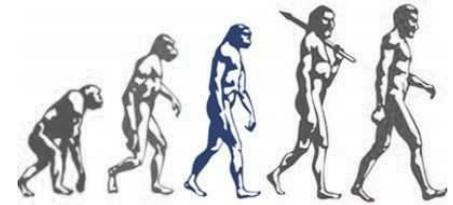
Le sonde READ sono differenti dalle classiche sonde, sono infatti sonde che sfruttano la tecnologia dei primer DPO.

Con queste sonde Seegene si affaccia alla PCR Real-time ed inizia la sua crescita in questo campo.





Tecnologia TOCE

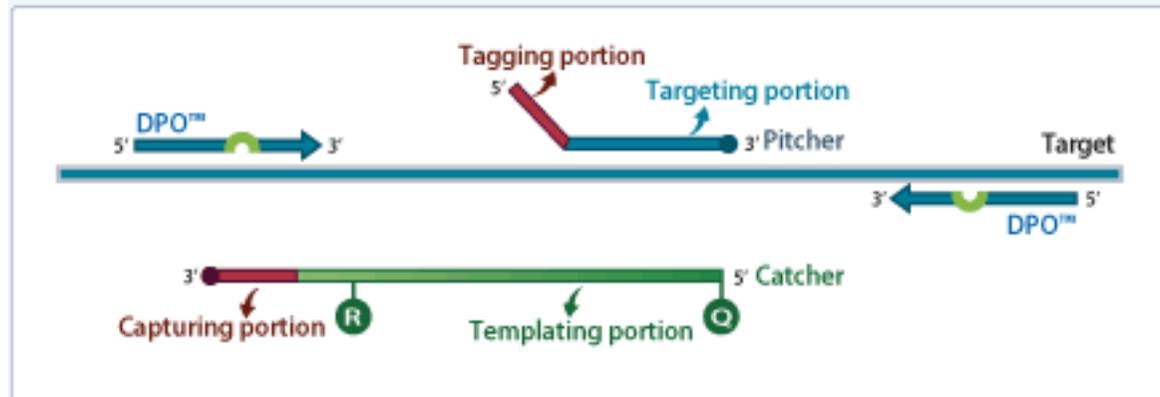


TOCE: Tagging Oligonucleotide Cleavage and Extension

I **pitcher** sono oligonucleotidi “taggati” che si ibridizzano specificamente alla regione target durante la fase di annealing.

La porzione “Tag” del pitcher è disegnata in modo da non ibridizzarsi a con il campione

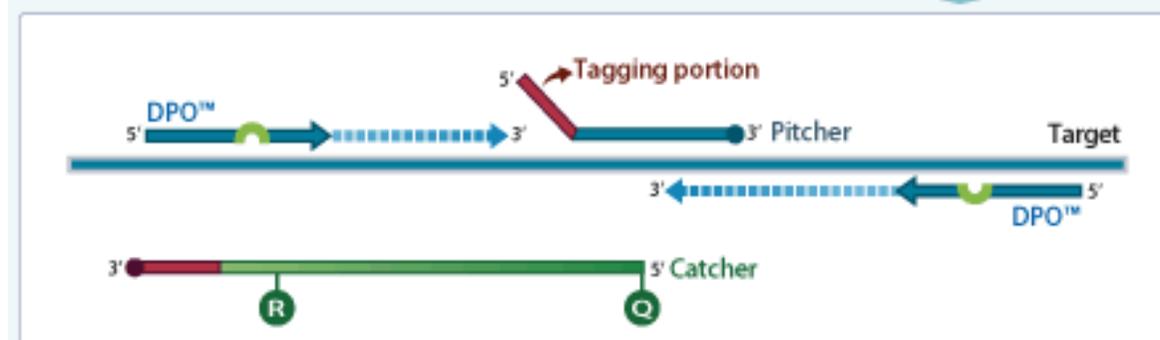
A. Annealing of DPO™ & Pitcher

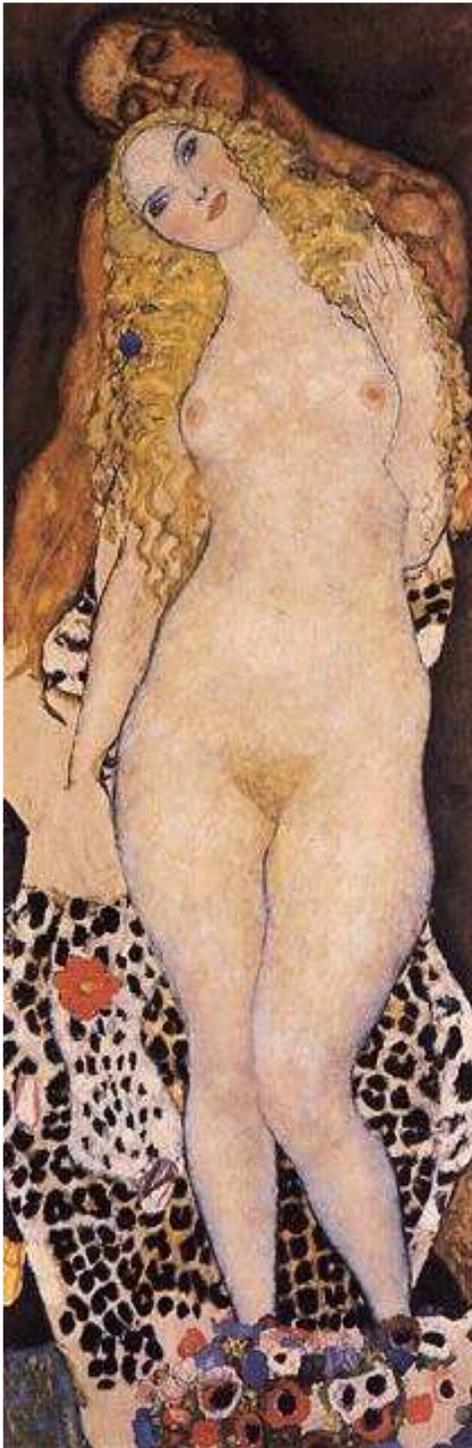


Durante la fase di estensione dei primer DPO l'attività esonucleasica della DNA polimerasi va a staccare dal pitcher la porzione “Tag”.

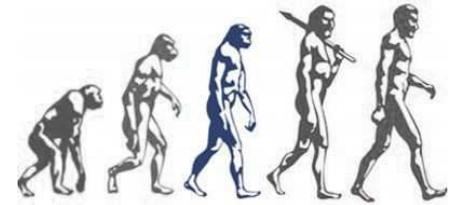
A questo punto la porzione “Tag” è libera nella miscela di reazione.

B. Extension





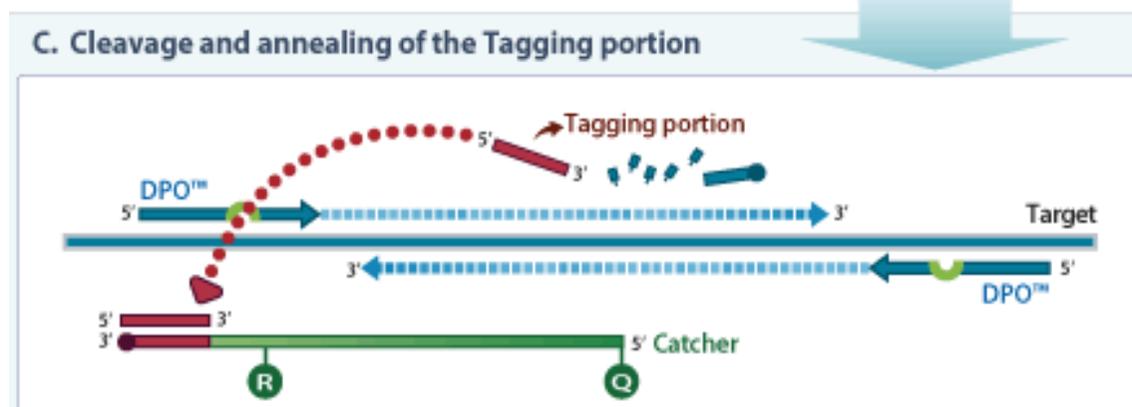
Tecnologia TOCE



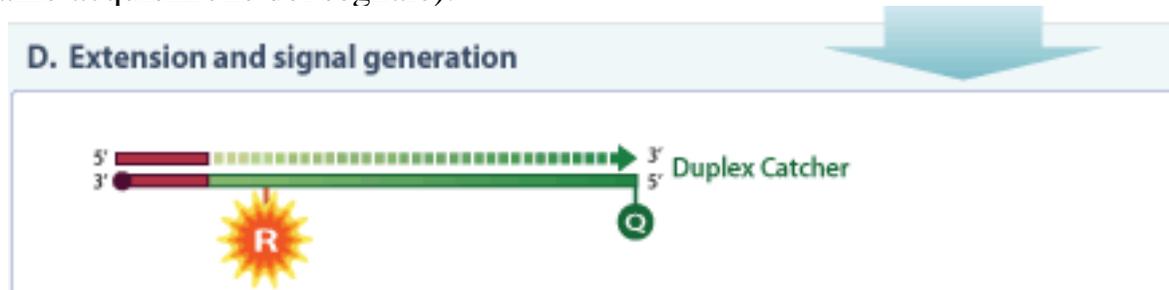
I **catcher** sono template artificiali marcati in fluorescenza che si trovano liberi nella miscela di reazione.

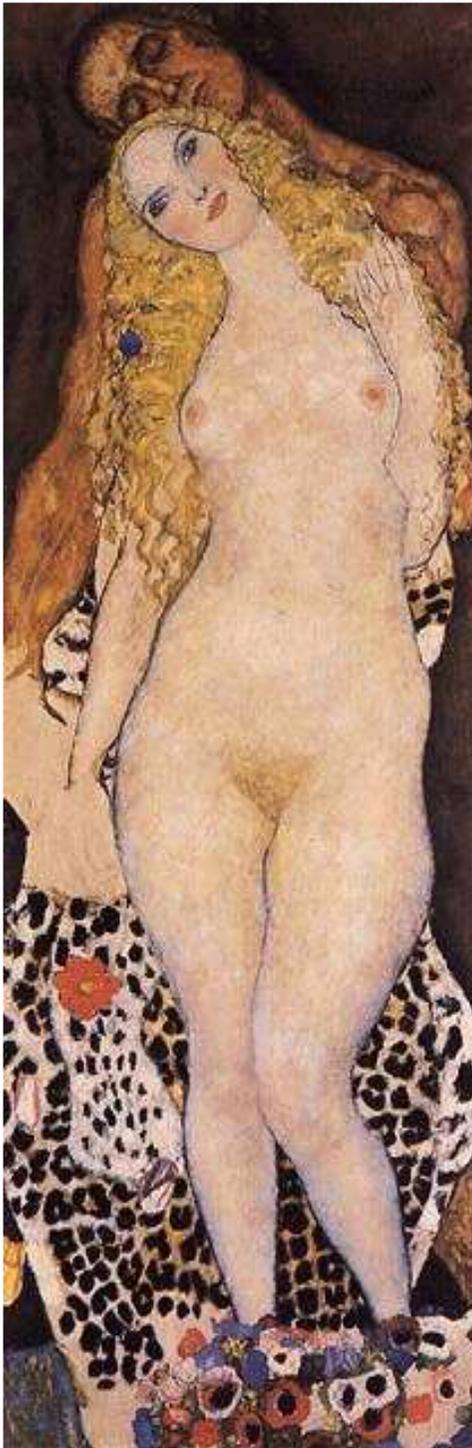
Le regioni “Tag” libere si ibridizzano ciascuna con il suo catcher complementare e specifico per ciascun patogeno.

1 “Tag” = 1 catcher = 1 patogeno

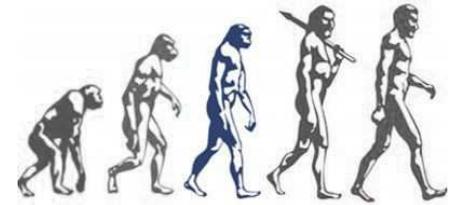


Durante i cicli della PCR si avrà l'estensione di ciascun catcher e durante l'estensione il quencher e il reporter (fluoroforo) si allontanano emettendo fluorescenza (in questa fase non abbiamo acquisizione del segnale).





Tecnologia TOCE



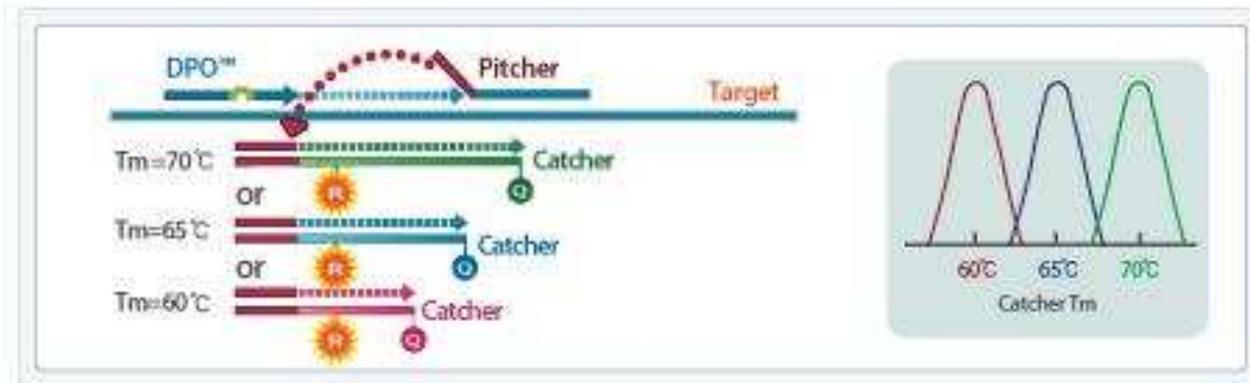
Dopo i cicli di PCR si ha la fase di analisi con le temperature di Melting, dove abbiamo acquisizione del segnale.

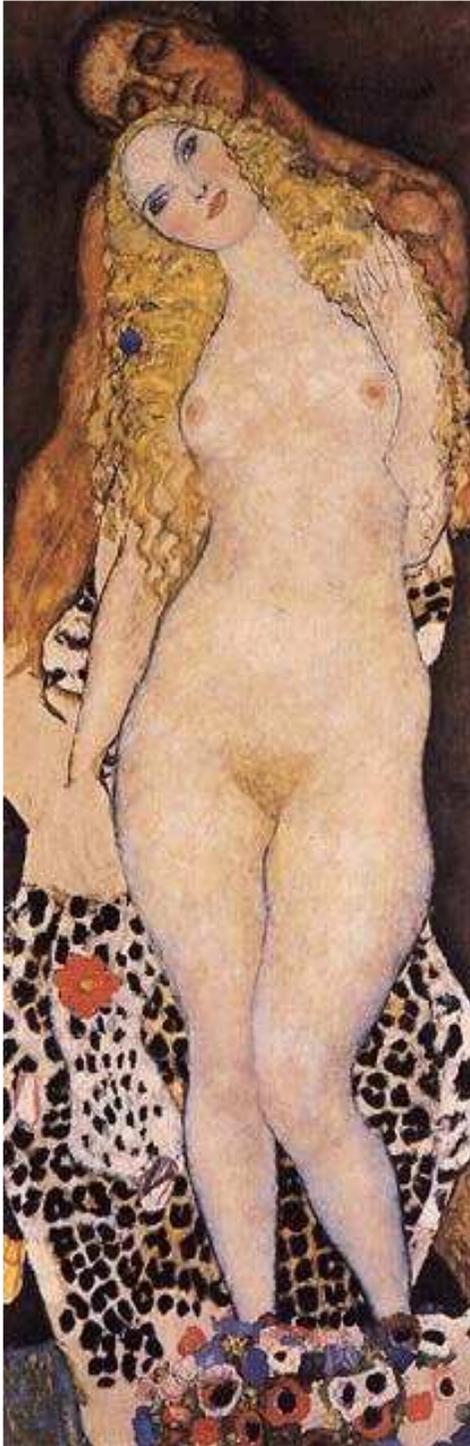
Da definizione la temperatura di Melting (T_m) è la temperatura alla quale la metà del DNA si trova nello stato a doppia elica, e la metà in quello denaturato.

La T_m quindi varia in base alla sequenza e alla lunghezza dell'amplicone.

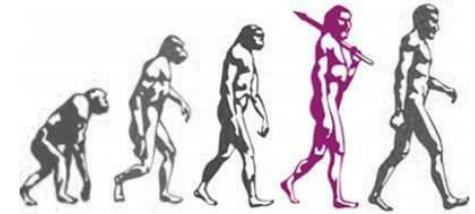
Il **catcher** è una caratteristica unica della TOCE, essendo un template artificiale, il suo valore di T_m può essere controllato regolando la sequenza e la lunghezza del catcher stesso. In questo modo si riescono a determinare più patogeni in uno stesso canale di fluorescenza.

3. Catcher- T_m : Flexibility in the adjustment of T_m value





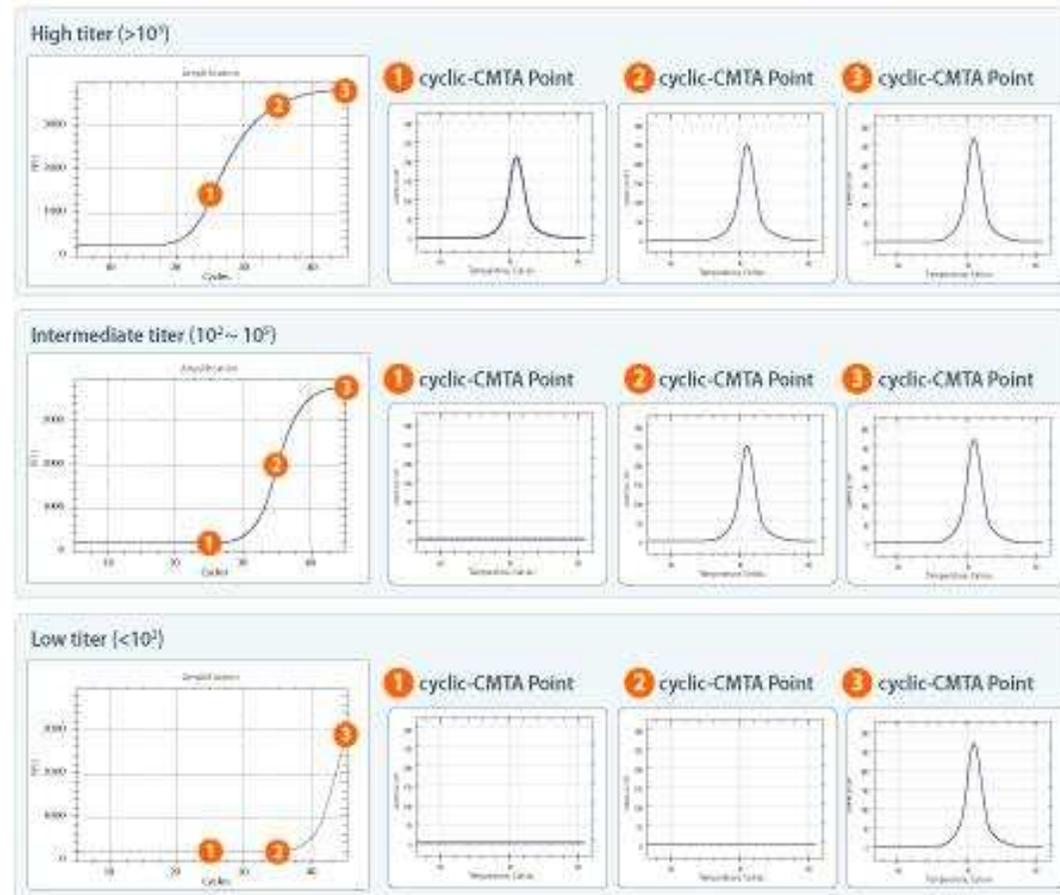
TOCE CCMTA

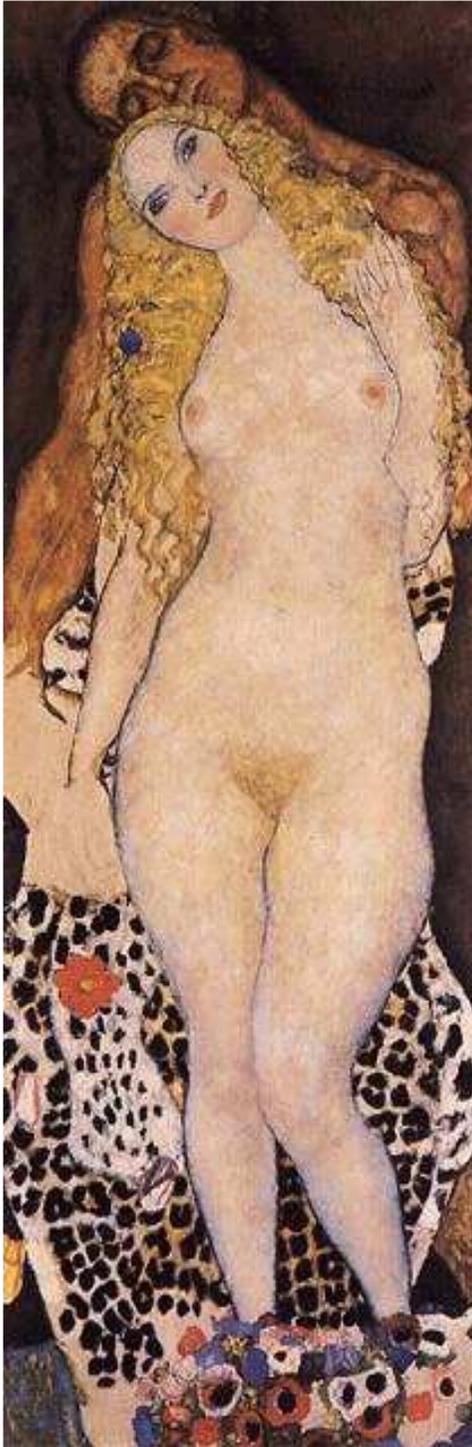


La TOCE è una tecnologia robusta, omogenea e ad elevata flessibilità per la creazione di multiplex quantitative.

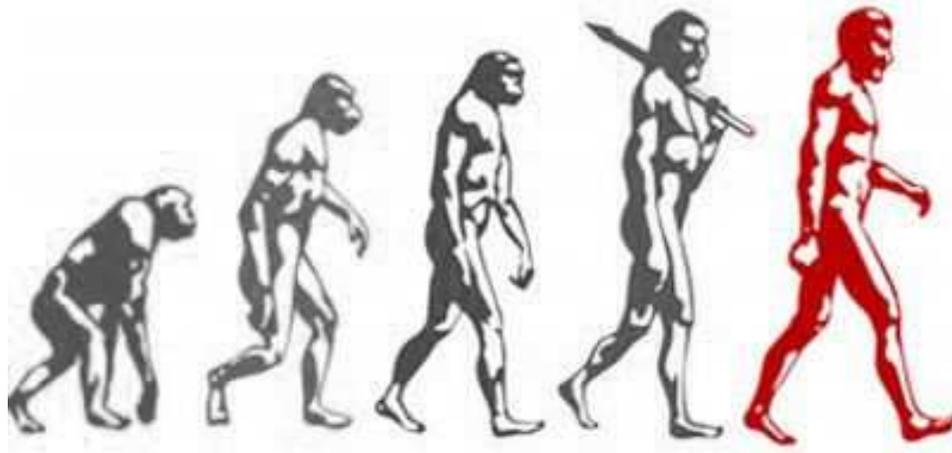
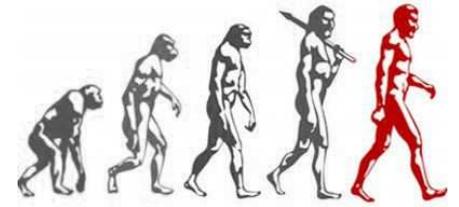
La **qTOCE** sfrutta l'analisi ciclica delle temperature di Melting dei catcher (cycle catcher melting temperature analysis CCMTA).

Le temperature di Melting vengono misurate più volte a cicli stabiliti durante il processo di PCR.

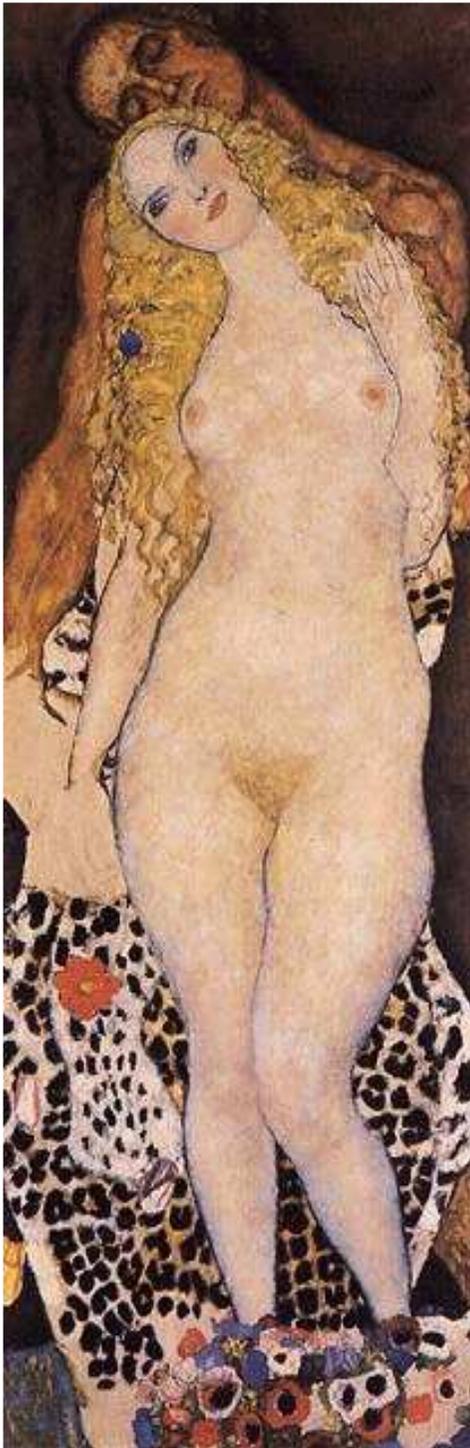




Quale sarà la prossima?



Seegene Anyplex II



Simultaneous detection & genotyping of 28 Human papillomaviruses

Anyplex™ II HPV28 Detection

19 High-risk HPV genotypes

16, 18, 26,
31, 33, 35, 39, 45,
51, 52, 53, 56, 58, 59,
66, 68, 69, 73, 82

9 Low-risk HPV genotypes

6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70



Validated specimen types

- Cervical brush/swab specimen
- Liquid based cytology specimen (e.g., ThinPrep®)

Features

- Detection and differentiation of 28 HPV genotypes from a single sample in a single reaction
- Quantitative analysis by cyclic-CMTA

Multiple detection of 7 STI pathogens

Anyplex™ II STI-7 Detection



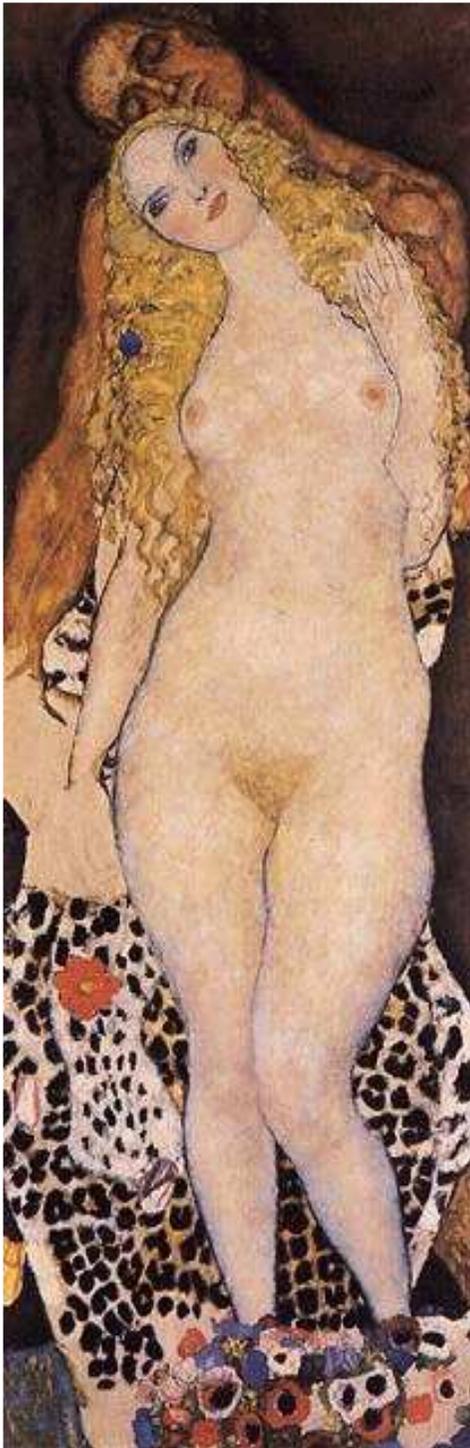
Validated specimen types

- Urine
- Swab specimens (urethral, vaginal and cervical)
- Liquid based cytology specimen (e.g., ThinPrep® and SurePath™)

Features

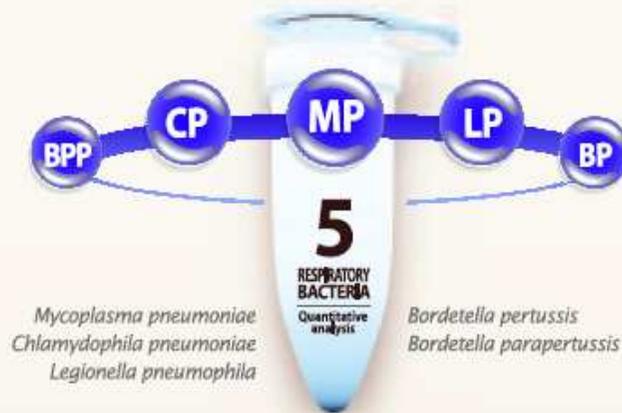
- Detection and differentiation of 7 major STI causing pathogens in a single reaction
- Quantitative analysis by cyclic-CMTA

Seegene Anyplex II



Multiple detection of 5 Respiratory Bacteria

Anyplex™ II RB5 Detection



Mycoplasma pneumoniae
Chlamydia pneumoniae
Legionella pneumophila

Bordetella pertussis
Bordetella parapertussis

Validated specimen types

- Nasopharyngeal swabs
- Nasopharyngeal aspiration
- Sputum (not applicable on Nimbus IVD)
- Bronchoalveolar lavage

Multiple detection of 16 Respiratory Viruses

Anyplex™ II RV16 Detection



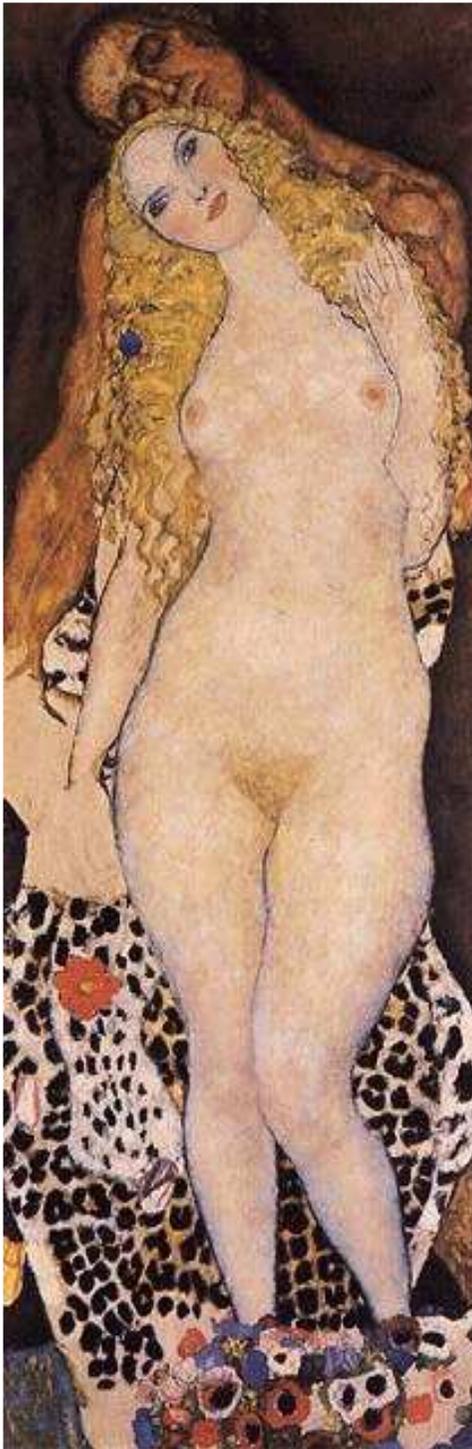
Metapneumovirus
Bocavirus 1/2/3/4
Respiratory syncytial virus A
Respiratory syncytial virus B
Coronavirus 229E
Coronavirus NL63
Coronavirus OC43
Enterovirus

Influenza A virus
Influenza B virus
Parainfluenza virus1
Parainfluenza virus2
Parainfluenza virus3
Parainfluenza virus4
Rhinovirus A/B/C
Adenovirus

Validated specimen types

- Nasopharyngeal swabs
- Nasopharyngeal aspirates
- Bronchoalveolar lavage

Seegene Anyplex II



Simultaneous screening for MTB infection and anti-TB drug resistance

Anyplex™ II MTB / MDR / XDR Detection

MTB

25 Multi-Drug Resistance

- Isoniazid-resistance (7 mutations)
- Rifampicin-resistance (18 mutations)

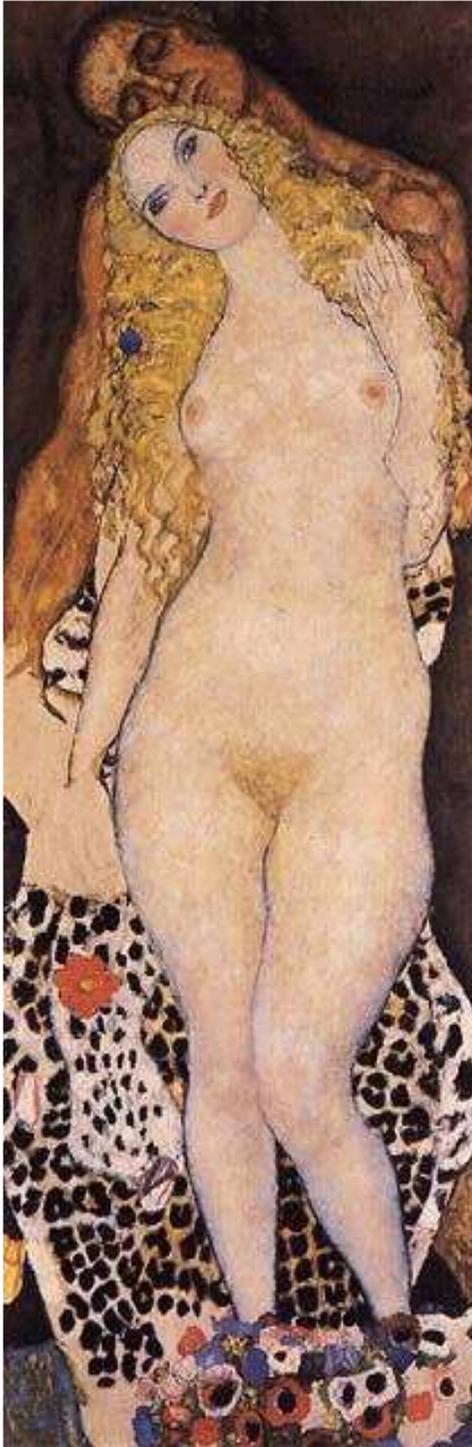
13 Extensively Drug Resistance

- Fluoroquinolone-resistance (7 mutations)
- Injectable drug-resistance (6 mutations)



Validated specimen types

- Sputum
- Fresh tissue
- Cultured cell
- Bronchial washing



Grazie per
l'attenzione!



arrow
diagnostics