

1° Congresso NEWMICRO

Biotechnologie e Diagnostica molecolare
nella diagnosi delle malattie infettive

**Workshop teorico pratico:
«Nuovo approccio di screening e
tipizzazione del Papilloma Virus Umano»**

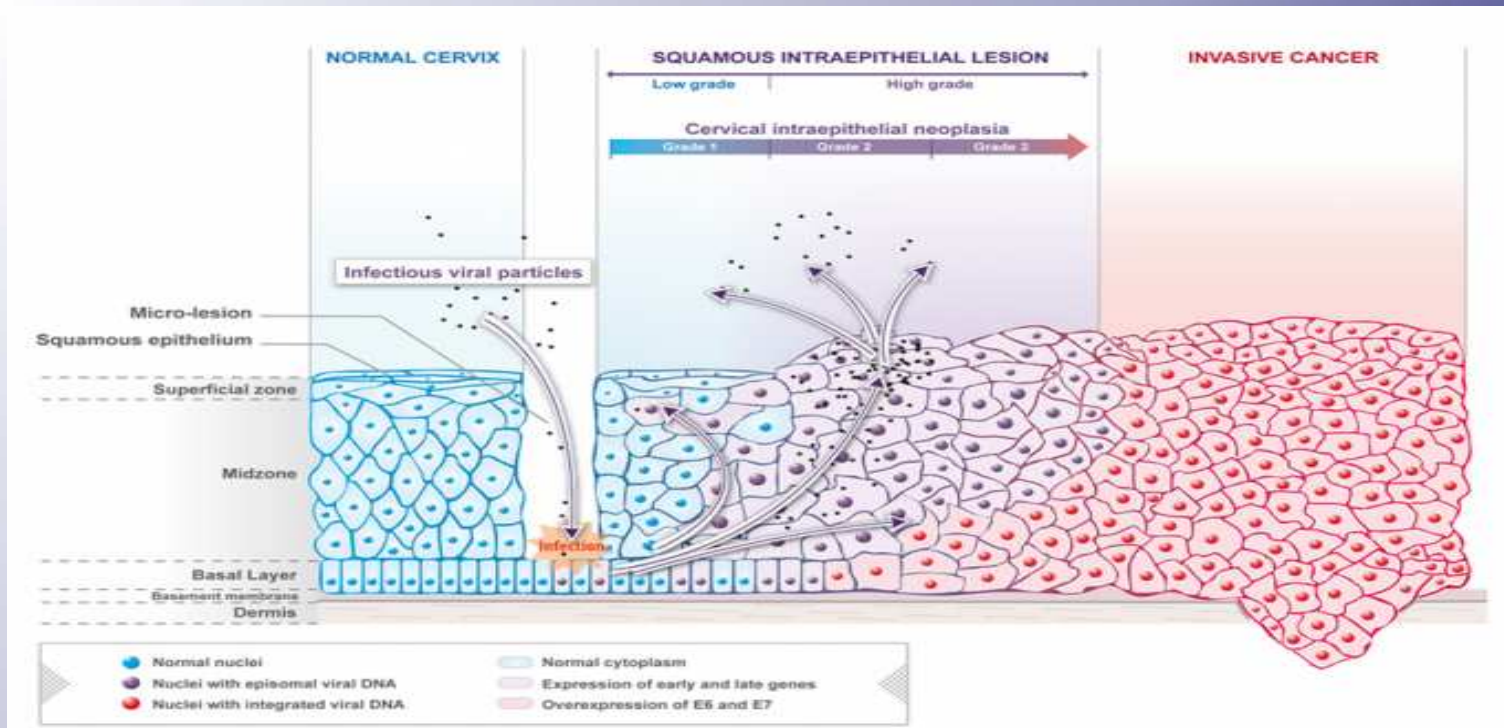
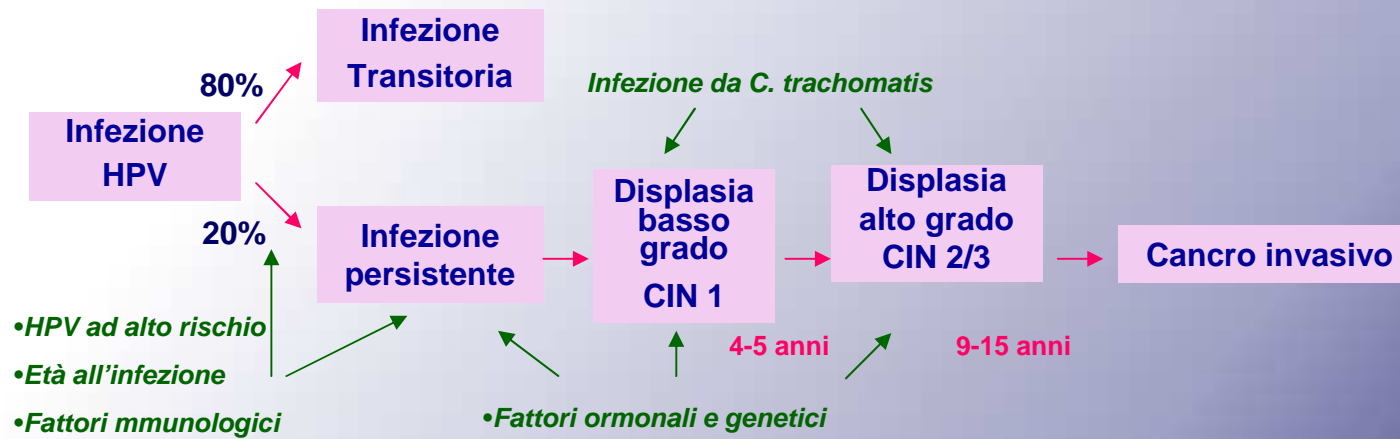
Relatori:

Dr.ssa Silvia Mason
AB ANALITICA srl

Dr.ssa Cristina Lapucci
Geneticlab

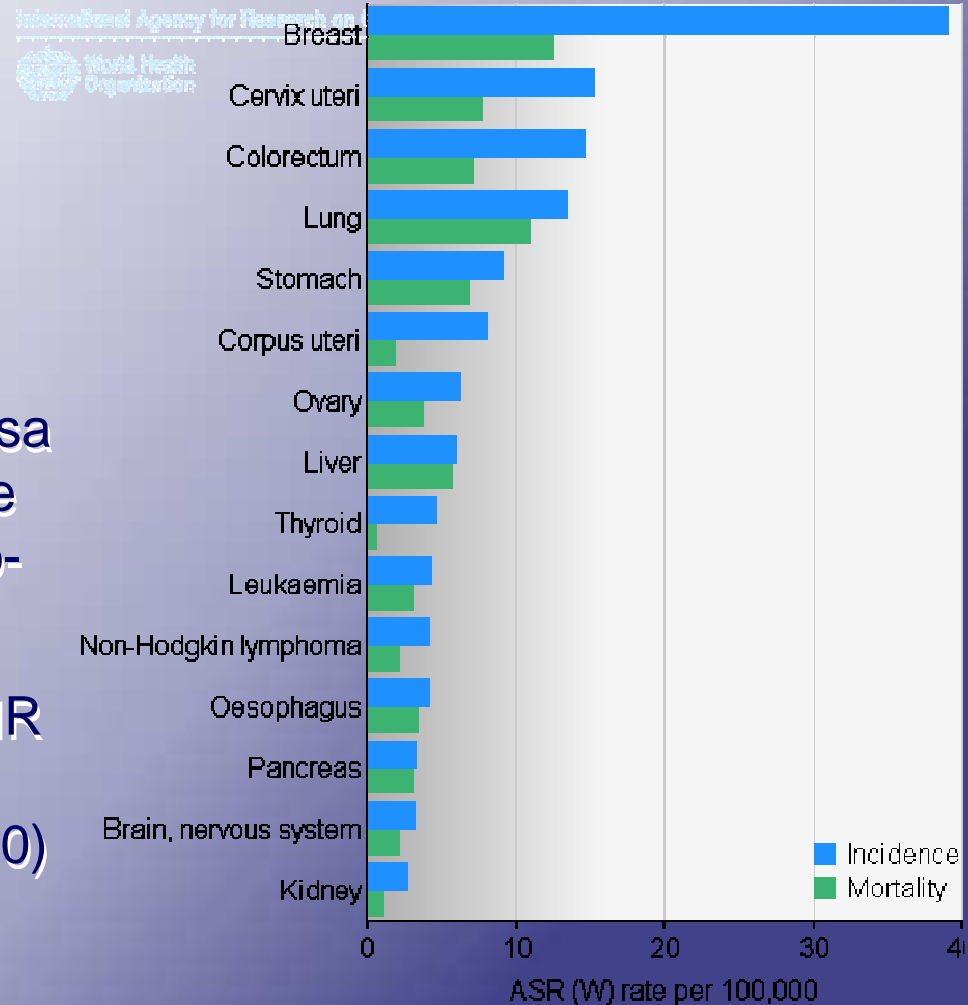


HPV & Cervico-carcinoma



HPV & Cervico-carcinoma

- Il cervico-carcinoma rappresenta, per incidenza, il secondo tumore femminile nel mondo (WHO 2008)
- L'infezione da HPV ad alto rischio oncogeno (HR) è la causa principale di neoplasia cervicale intraepiteliale (CIN) e di cervico-carcinoma
- Infezioni persistenti da HPV HR costituiscono un utile marker oncologico (Kjaer K. *et al.*, 2010)



Classificazione genotipi HPV (IARC)



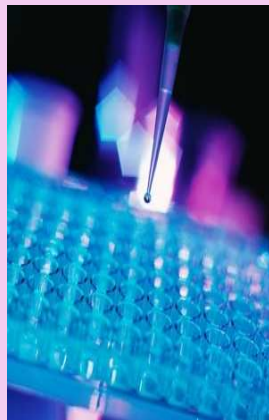
Genotipi HPV	Classificazione IARC	Motivazioni
HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59	GRUPPO 1 (Agente carcinogeno per l'uomo)	Riconosciuti agenti capaci di causare un cervico-carcinoma
HPV 68	GRUPPO 2A (Agente probabile carcinogeno per l'uomo)	Esistono pochi dati epidemiologici ma è provata la sua oncogenicità
HPV 26, 53, 66, 67, 70, 73, 82	GRUPPO 2B (Possibile Agente carcinogeno per l'uomo)	Possibili oncogeni, in quanto le evidenze sono ancora limitate
HPV 6, 11	GRUPPO 3 (Agenti non classificabili come carcinogeni)	Non vi è alcuna evidenza che di associazione al cancro

Screening & Typing

REAL TIME PCR AMPLIFICATION

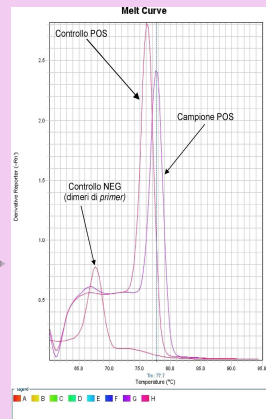
Real time PCR reaction set up and run

150 min



Positive samples selection

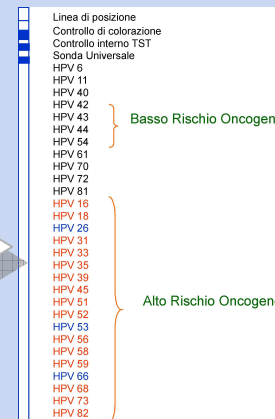
5 min



REVERSE LINE BLOT

Typing on strip

90 min



REALQUALITY RI-HPV STAR

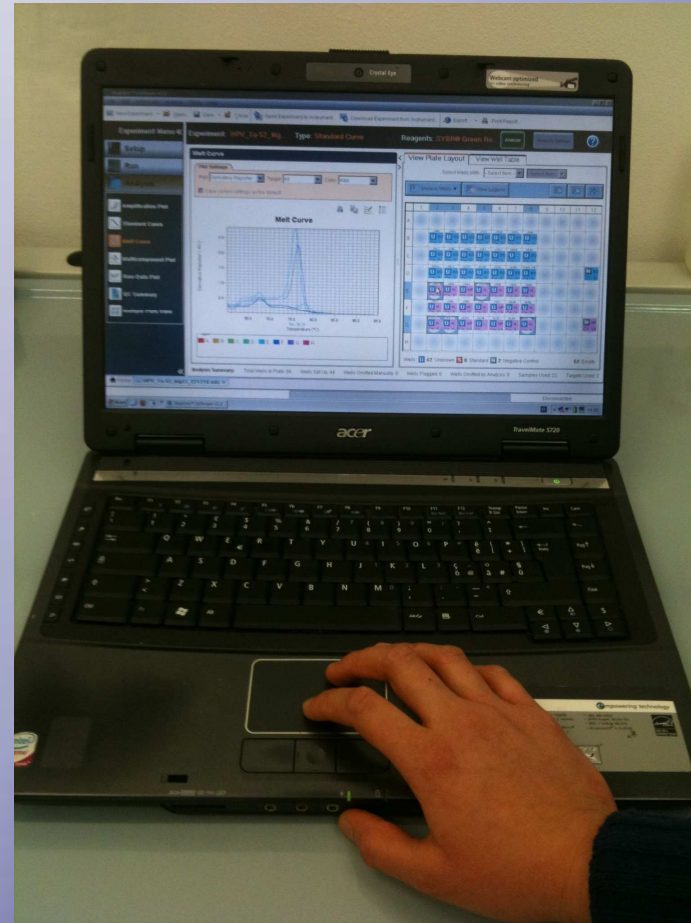
AMPLIQUALITY HPV-TYPE

Screening: fase pre-analitica

- Raccolta del campione
(Preservcyt, tamponi a secco, HPV-SCK)
- Estrazione del DNA
(EZ1, QIAamp DNA mini kit, QIAsymphony)
- Allestimento reazione di amplificazione e esecuzione ciclo termico

Screening: selezione dei campioni HPV positivi

La determinazione dei campioni positivi prevede l'analisi delle curve di melting ottenute

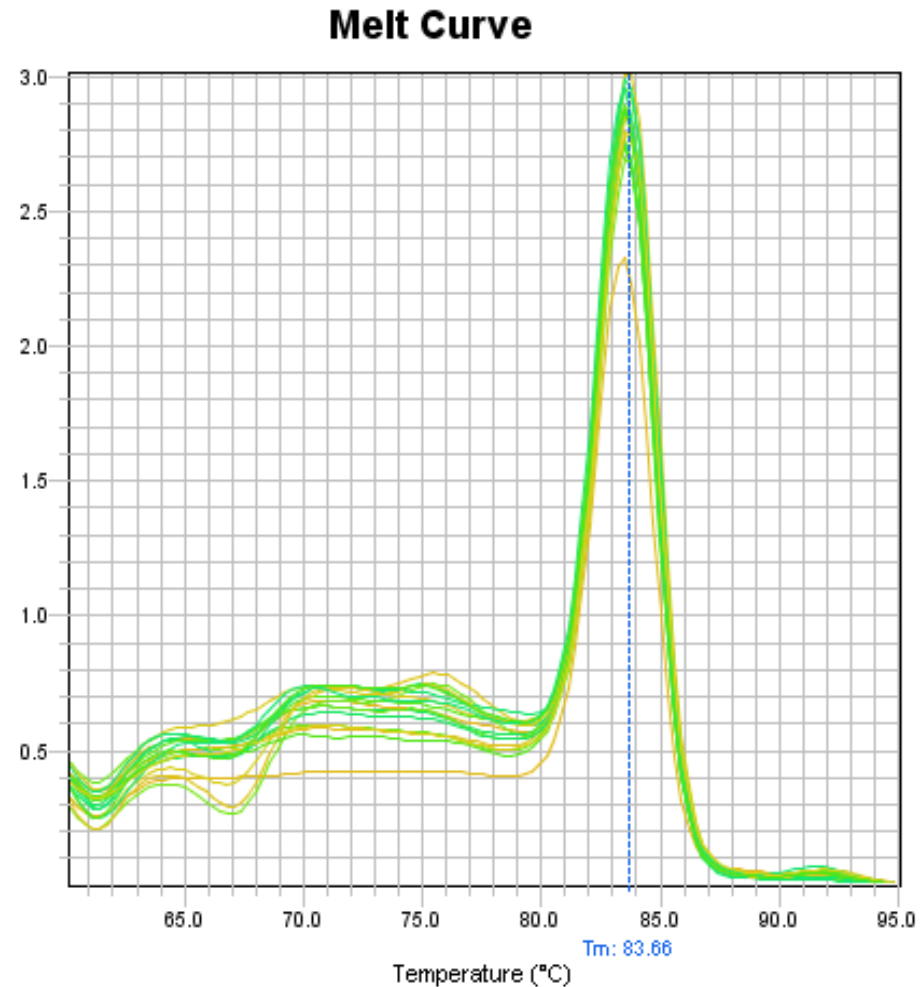


Idoneità del campione

**Valutazione
amplificazione gene
housekeeping
(gene β -globina)**

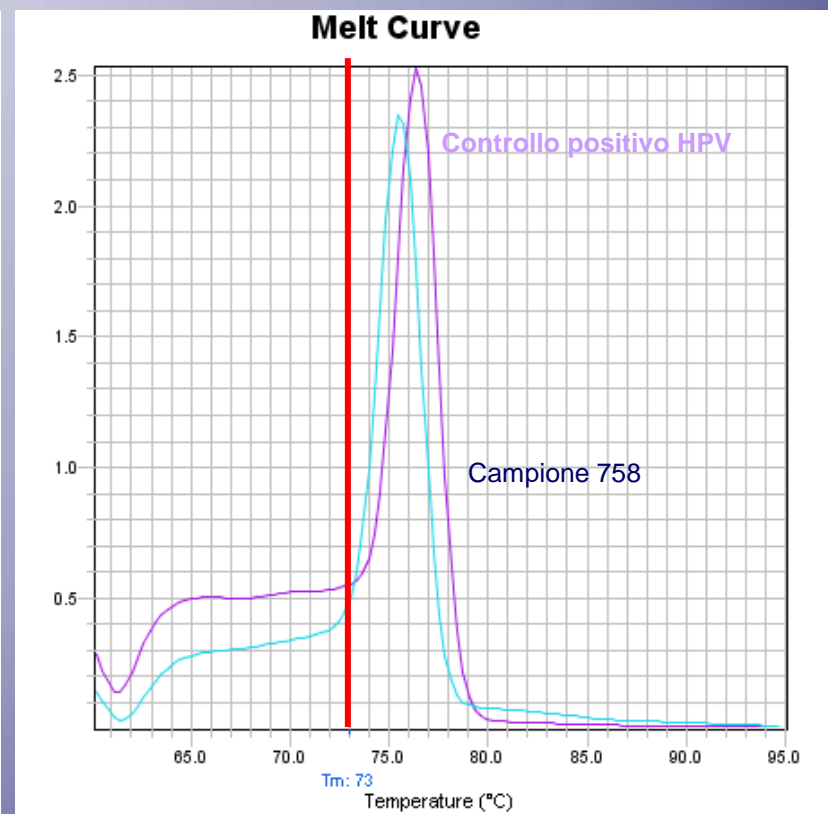
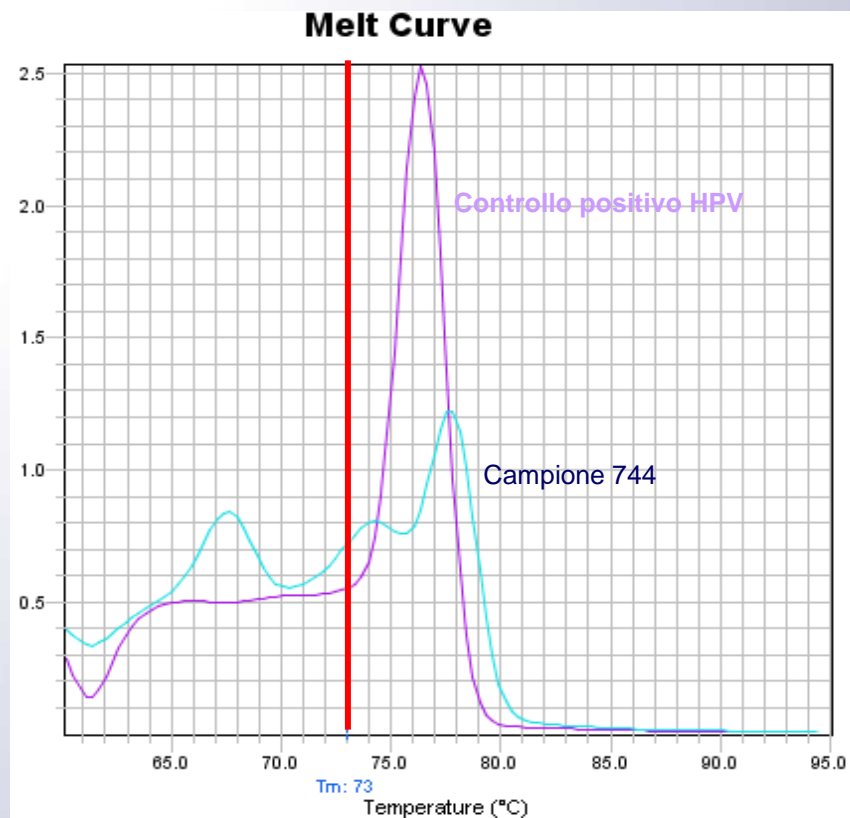
#	Sample ...	Target N...	Task	Tm1	Tm2	Tm3
1	744	BG	UNKNOWN	83.653		
2	758	BG	UNKNOWN	83.506		
3	768	BG	UNKNOWN	83.506		
4	771	BG	UNKNOWN	83.657		
5	775	BG	UNKNOWN	83.657		
6	778	BG	UNKNOWN	83.653		
7	780	BG	UNKNOWN	83.653		
8	782	BG	UNKNOWN	83.653		
9	784	BG	UNKNOWN	83.506		
10	799	BG	UNKNOWN	83.506		
11	752	BG	UNKNOWN	83.657	76.05	
12	774	BG	UNKNOWN	83.503		
13	783	BG	UNKNOWN	83.503		
14	837	BG	UNKNOWN	83.506		
15	844	BG	UNKNOWN	83.506		
16	849	BG	UNKNOWN	83.657		
17	852	BG	UNKNOWN	83.657		

Derivative Reporter (-Rn')



Analisi dei campioni positivi

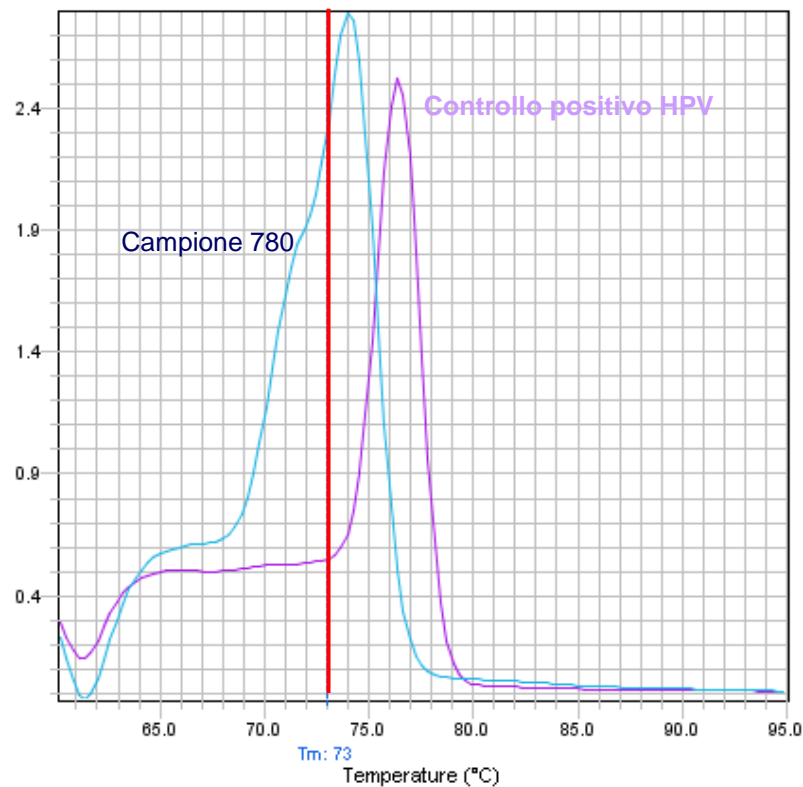
#	Sample ...	Target N...	Task	Tm1	Tm2	Tm3
18	744	HPV	UNKNOWN	77.688	67.546	74.257
19	758	HPV	UNKNOWN	75.6		



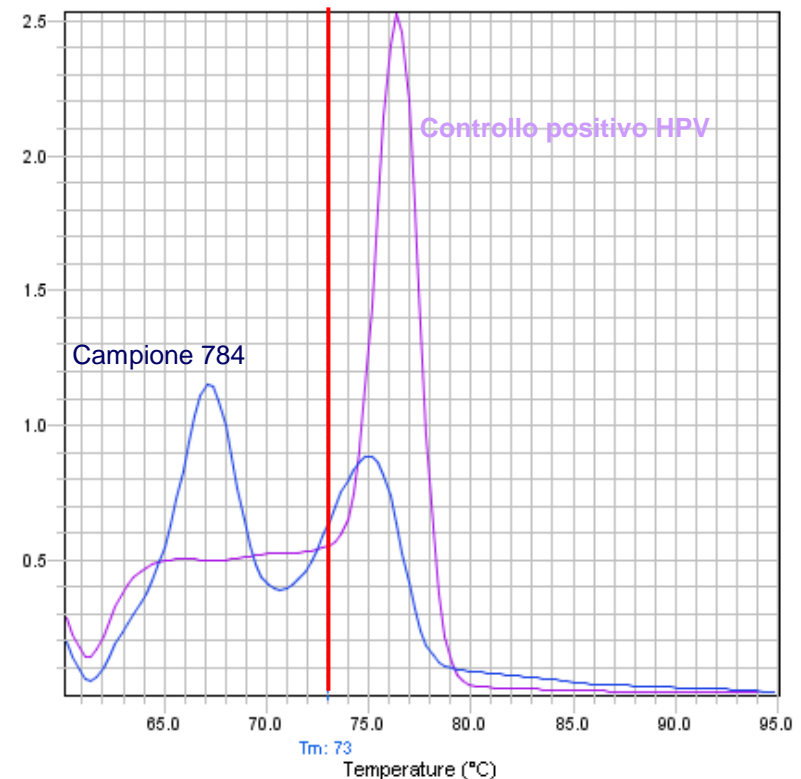
Analisi dei campioni positivi

#	Sample ...	Target N...	Task	Tm1	Tm2	Tm3
18	744	HPV	UNKNOWN	77.688	67.546	74.257
19	758	HPV	UNKNOWN	75.6		
20	780	HPV	UNKNOWN	74.107		
21	784	HPV	UNKNOWN	67.247	75.004	

Melt Curve

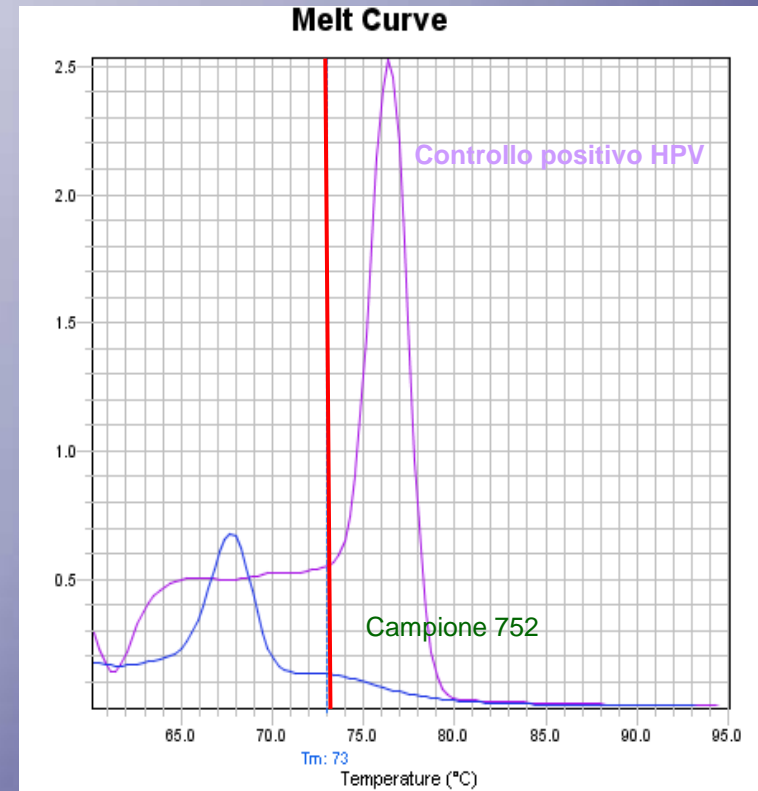
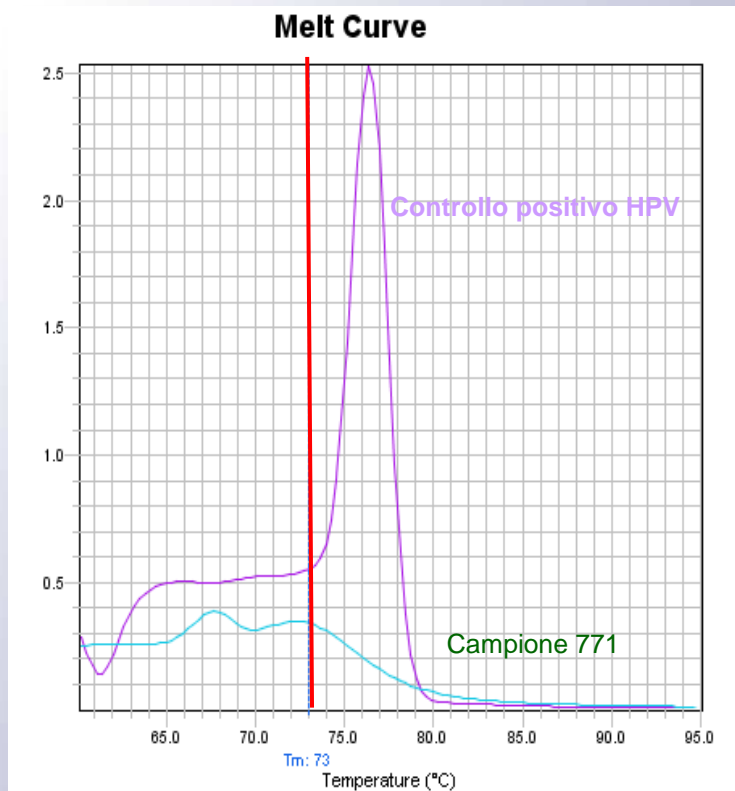


Melt Curve



Analisi dei campioni negativi

#	Sample ...	Target N...	Task	Tm1	Tm2	Tm3
22	771	HPV	UNKNOWN	67.698	72.322	
23	752	HPV	UNKNOWN	67.698		
24	Pen26	HPV	UNKNOWN	76.344		



Caratteristiche tecniche

REALQUALITY RI-HPV STAR
Screening del Papilloma Virus Umano

Un nuovo test CE IVD. In Real Time PCR che combina l'identificazione rapida dei campioni HPV positivi con la loro genotipizzazione su strip HPV è associato allo sviluppo del cervico-carcinoma. I genotipi HPV sono classificati in accordo al loro rischio oncologico. Il cervico-carcinoma si può prevenire con una diagnosi precoce. Recenti studi dimostrano l'importanza dello screening HPV.

AB ANALITICA
www.abanalitica.it

REALQUALITY RI-HPV STAR
Screening del Papilloma Virus Umano
www.abanalitica.it

Tecnologia: Real Time PCR
Materiale di partenza: DNA estratto da prelievi cervico-vaginali
Regione amplificata: gene della proteina L1
Masternix: reagenti pronti all'uso che includono un normalizzatore della fluorescenza e il sistema dUTP/UNG per la prevenzione delle contaminazioni
Controllo interno: amplificazione del gene della β -globina (BG)
Controlli positivi: DNA contenenti parte del genoma di HPV e del gene BG
Tempo di esecuzione: 150 minuti

INFORMAZIONI PER GLI ORDINI

Cod	Prodotto	Formato
RI-01-48	REALQUALITY RI-HPV STAR	48 test
RI-01-96	REALQUALITY RI-HPV STAR	96 test

PRODOTTI CORRELATI

Cod	Prodotto	Formato
03-20R-20	AMPLIQUALITY HPV TYPE	20 test
03-30R-20	AMPLIQUALITY HPV TYPE, variante HR	20 test

AB ANALITICA
www.abanalitica.it

- CE IVD
- Amplificazione Real time con primer consensus e analisi delle curve di melting
- Soluzioni pronte all'uso
- Controlli positivi HPV e β -Globina (BG)
- Sistema di prevenzione delle contaminazioni (dUTP/UNG)
- Formato: 48/96 test
- Volume di reazione : 25 uL
- Tempo d'analisi: 150 min
- Validato su ABI StepOne Plus (ABI7500 Fast Dx & ABI 7300)

Typing

Prelievo dell'amplicone
direttamente dalla piastra



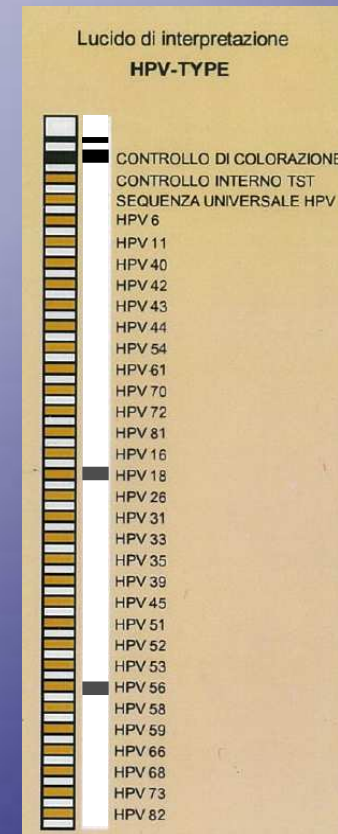
Esecuzione Reverse Line Blot



Typing: fase analitica ed interpretazione

Protocollo

- Denaturazione del campione: 5 min a T.A.
- Ibridazione: 1h a 42°C
- Lavaggio ed incubazione con fosfatasi alcalina: 15 min a 42°C
- Risciacquo: 2 x 2 min a T.A.
- Colorazione: 8 min a T.A.
- Interpretazione del risultato



AMPLIQUALITY HPV-TYPE

AMPLIQUALITY HPV-TYPE HR

Caratteristiche tecniche

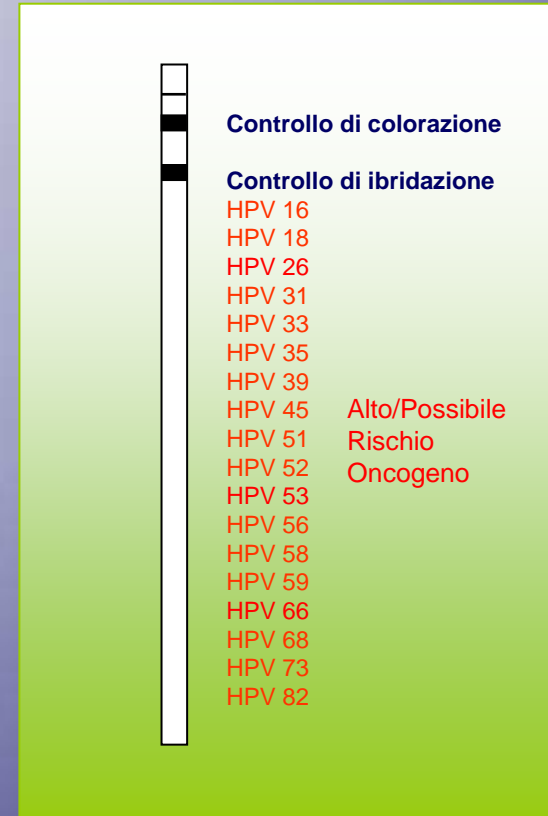
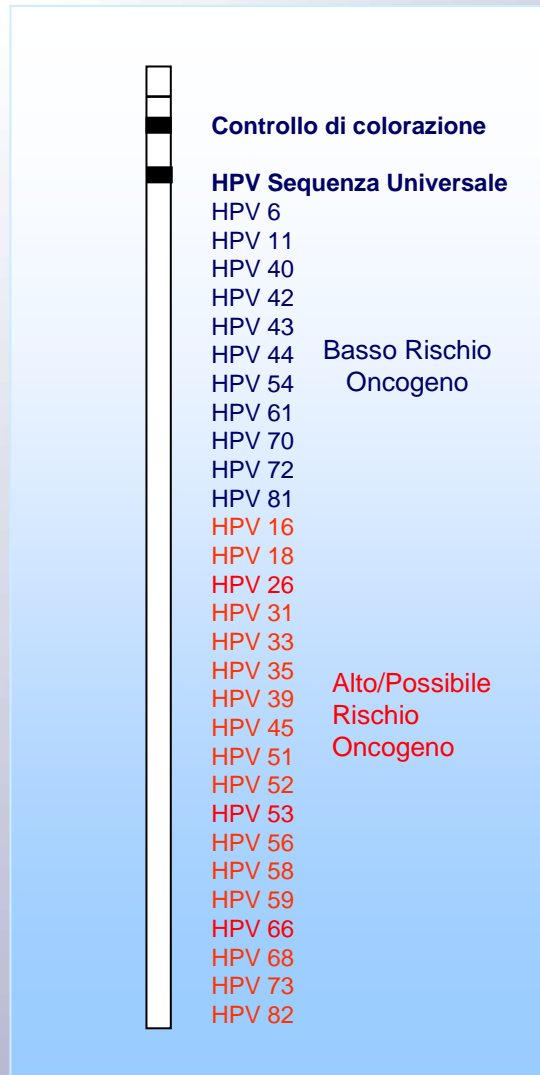


- CE IVD
- Tecnologia Reverse Line Blot
- Soluzioni pronte all'uso
- Formato: 20 test
- Tempo d'esecuzione: 90 min
- Presenza di una sonda HPV Universale/Controllo ibridazione
- Protocollo completamente automatizzabile (Autoblot 3000H; Autolipa 48, etc.)

AMPLIQUALITY HPV-TYPE

AMPLIQUALITY HPV-TYPE HR

Strategie di genotipizzazione



Le performance del sistema vs hc2

- Concordanza: 92,22%
- Sensibilità analitica: circa 1000 copie genoma virale/reazione

Ringraziamenti

AB ANALITICA Srl

Dr.ssa A. Gani

Dr.ssa K. Bortolozzo

Tutto lo staff

Department of Pathology

Central Hospital

Bolzano

Dr. G. Negri

Geneticlab Srl

Dr.ssa C. Lapucci