Test di biologia molecolare
nella pratica clinica

C. Gentili



Considerazioni di base

I virus ad alto rischio sono presenti nel nucleo in forma non integrata al pari dei virus a basso rischio ma, mentre questi non si integrano perchè conservano la forma circolare quelli ad alto rischio, per motivi ancora poco conosciuti , possono diventare lineari e integrarsi nel genoma cellulare perdendo però le proteine capside

Il virus integrato inserisce nel DNA cellulare solo le proteine E6-E7 responsabili della crescita

Il tipo di virus è identificato dalle proteine del capside. Per tipizzare un virus è necessario avere un DNA virale o parte esso con le proteine del capside L1- L2, dunque non integrato

I test a DNA sono in grado di tipizzare il virus perchè possono identificare le proteine del capside che lo caretterizzano ma non possono identificare un'eventuale integrazione

I test eseguiti sul RNA messaggero della cellula trasformata possono riconoscere solo la presenza di E6-E7 ma non tipizzare il virus. Il virus potrà essere tipizzato solo in maniera indiretta

Test di biologia molecolare
su liquidi

Test di biologia molecolare
su cellule o su tessuto

Approved by FDA at start of 1992 ibrido DNA-DNA DOT BLOT

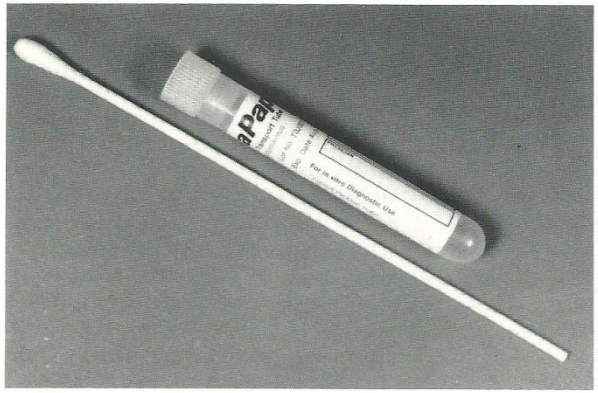


Figure 6.10. ViraPap/ViraType™ Kit for detecting HPV DNA. The ViraPap/ViraType™ collection kit consists of a dacron-tipped applicator stick which is swabbed over the cervix, placed in a transport tube and sent to the laboratory. *(Virapap™ is produced by Digene Diagnostics, Inc.)*

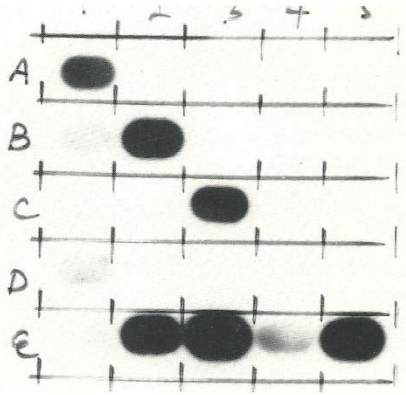


Figure 6.11. In the laboratory the ViraPap™ sample is filtered onto a membrane and hybridized with labeled DNA probes against various types of HPV. Dark staining lanes contain HPV DNA. *(Virapap™ is produced by Digene Diagnostics, Inc.)*

Hybrid Capture Tube (HCT) approvato FDA Maggio 1995

Tipi 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, e 56

10 pg/ml (1.000.000 copie HPV ml /50.000 copie HPV per test)

Hybrid Capture II (HCII) approvato FDA Marzo 1999

Tipi : 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, e 56
39, 58, 59, e 68

1 pg /ml (100.000 copie HPV ml /5000HPV copie per test)

.

Diagnostic type	Hybrid Capture Tube (HCT)	Hybrid Capture II (HC II)
Technology and effectiveness		
Type of technology	signal amplification	signal amplification
US FDA approval	yes	yes
Provides semi-quantitative data	yes	yes
Sensitivity in detecting CIN II-III or cancer*	~ 65%	80–100%
Specificity in detecting CIN II-III or cancer*	~ 60%	57–89%
Negative predictive value for CIN II-III or cancer*	not available	75–100%
Limit of detection	50,000 viruses/sample	5,000 viruses/sample
Ability to differentiate viral types†	categorized by high/low risk	categorized by high/low risk

Test di biologia molecolare su liquidi

HPV Molecular Detection Methods

- HR HPV DNA detection
- HR HPV DNA genotyping
- HR HPV DNA quantification
- HR E6/E7 mRNA detection
- HR E6/E7 mRNA genotyping
- HR E6/E7 mRNA quantification
- Direct sequencing
- Clonal sequencing
- Integration assays (RO)

Test di biologia molecolare disponobili

- HPV genotyping RH kit Qiagen
- Digene HPV genotyping LX kit, Qiagen
- Amplicor HPV Test Roche
- Linear array Roche
- SPF10/LiPa DDL
- EasyQ HPV Biomerieux
- Aptima Gen-Probe
- Human Papilloma Virus reagents Third Wave
- BIOPAP QTS HPV Kit Loxo
- Reveal HPV Real-Time HPV Detection Kit GenoID
- AID STD assay GenID
- AID HPV screening kit GenID
- AID HPV typing kit GenID
- Linear ArrayExtra HPV Genotyping Kit Innogenetics
- PCR Human Papillomavirus Detection Set Takara Mirus Bio
- HPV DNA Chip Biomedlab
- Array Papillomavirus Genomica
- ProDect Chip HPV typing Bcs Biotech S.P.A
- PapType Genera Biosystems
- LCD Array HPV 3.5 Chipron
- Seeplex HPV Genotyping Seegene
- Viroactiv Virofem
- HPV OncoTest Invirion Diagnostics
- Genpoint Tm HPV test Dako-Oxoid
- Abbott RealTime High Risk HPV Abbott
- Luminex HPV Genotyping Multimetrix/Progen
- Papillocheck, Greiner BioOne
- PreTect HPV Proofer Norchip

Test di biologia molecolare su liquidi

Hybrid Capture II(Qiagen) **Chemioilluminescenza** (amplificazione segnale)

Amplicor (Roche) 13 tipi HR 5 LR **PCR** (amplificazione target)

HPV DNA Pool

Cervista HPV 14 tipi HR 6LR

Cobas (Roche) 16 tipi HR 21 LR

Clinical Arrays (Genomica) 18 tipi HR12 LR

Inno-LiPA HPV Genotiping (Innogenetics) 25 HR e 8 LR

RealTime HPV Assay (Abbott) 14 tipi HR

Cepheid Xpert HPV 16 18 45

HPV DNA Tiping

Presenza virale

HPV-Proofer (Norchip; Biomerieux) 5 tipi

APTIMA HPV assay (Gen-Probe) 14 tipi

HPV RNA

Presenza E6-E7 Integrazione virale

Hybrid Capture II

Ibridizzazione in fase liquida

- **Sonda per 13 tipi di HPV HR (alto e medio rischio)** (16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,68)
- **Sonda per 5 tipi HPV LR** (6,11,42,43,44)
- Chemiluminescenza
- Qualitativo e semiquantitativo (RLU= Unità di Luce Relativa)

Hybrid Capture II

denaturazione

HPV

HPV

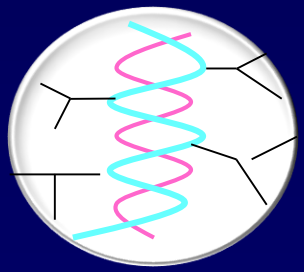
HPV

DNA

Ibridazione con un pool di sonde ad RNA per HPV ad alto rischio

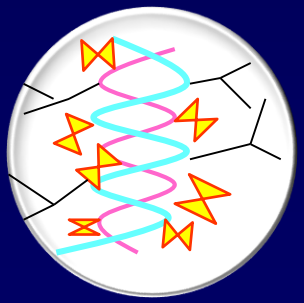
Sonda RNA

Ibrido DNA/ RNA

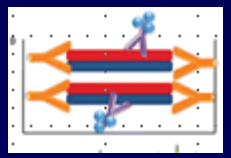




Cattura dell'ibrido mediante anticorpi anti-doppia catena



Rilevazione dell'ibrido mediante anticorpi anti-ibridi marcati con fosfatasi alcalina
Amplificazione del segnale.





Rivelazione con substrato chemiluninescente

Hybrid Capture 2® (HC2®)

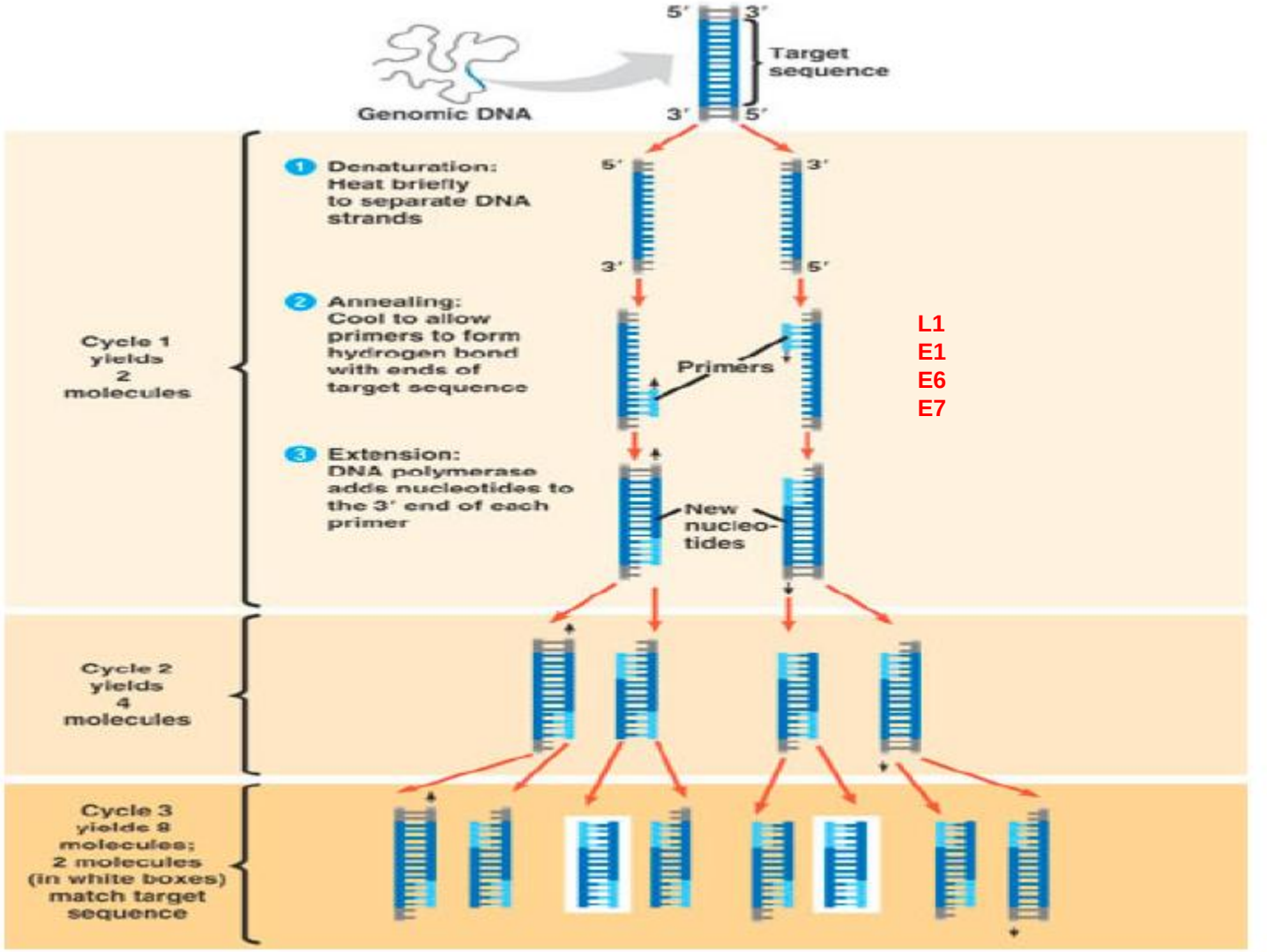
- Procedura standardizzata
- Sensibilità ottimizzata per applicazioni cliniche
- Meno suscettibile a problemi di contaminazione e inibizione della PCR
- Maggiore semplicità rispetto al metodo PCR, medesima sensibilità clinica
- Estesa validazione clinica

Amplificazione del segnale

La **Reazione a Catena della Polimerasi (*PCR-Polymerase Chain Reaction)***.

La PCR è una metodica che consente la rapida amplificazione di un segmento di DNA

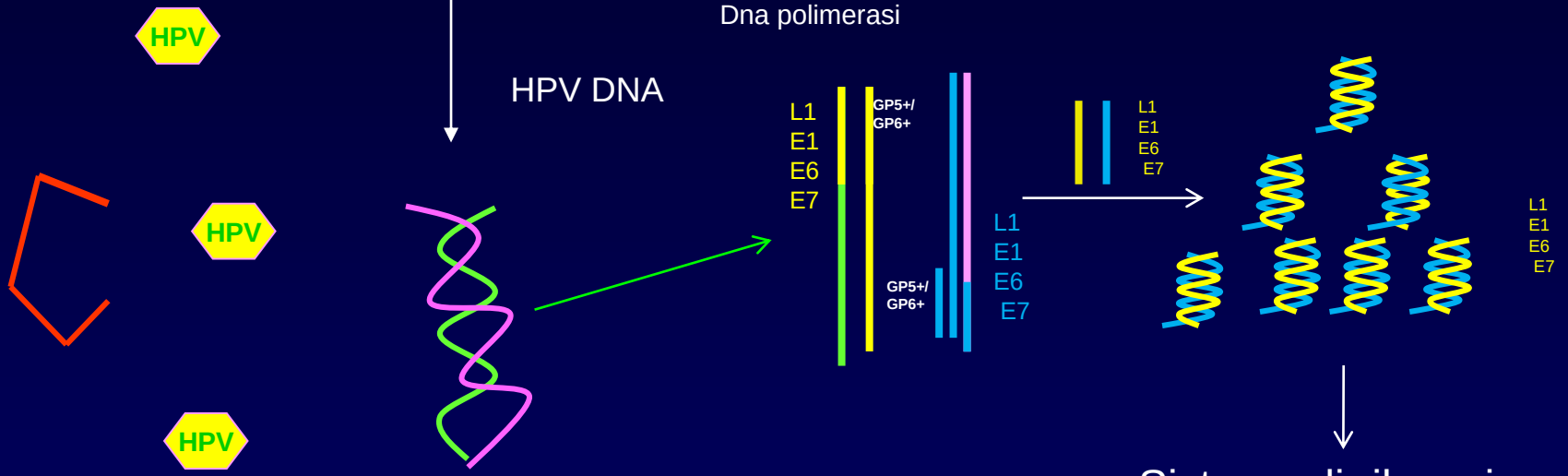
Amplificazione del target


Genomic DNA
5′
3′
Target sequence
3′
5′
1 Denaturation: Heat briefly to separate DNA strands
2 Annealing: Cool to allow primers to form hydrogen bond with ends of target sequence
Primers
3 Extension: DNA polymerase adds nucleotides to the 3′ end of each primer
New nucleo-tides
Cycle 1 yields 2 molecules
Cycle 2 yields 4 molecules
Cycle 3 yields 8 molecules; 2 molecules (in white boxes) match target sequence
L1
E1
E6
E7

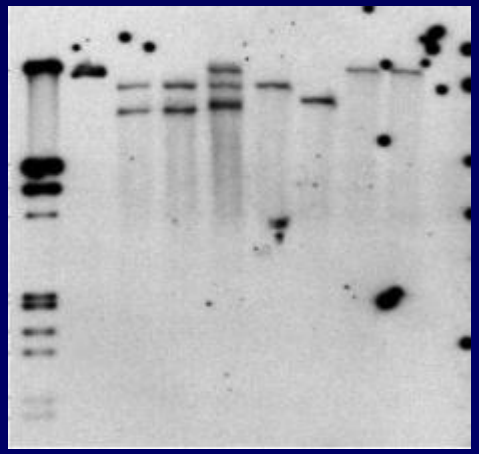
PCR

denaturazione

Amplificazione con primers **(MY09/MY11 GP5+/GP6+ pU-1M/pU2R)** disegnati per amplificare sequenze altamente conservate del genoma virale di HPV nella regione L1,E1ed E6/E7



Sistema di rilevazione gel di agarosio



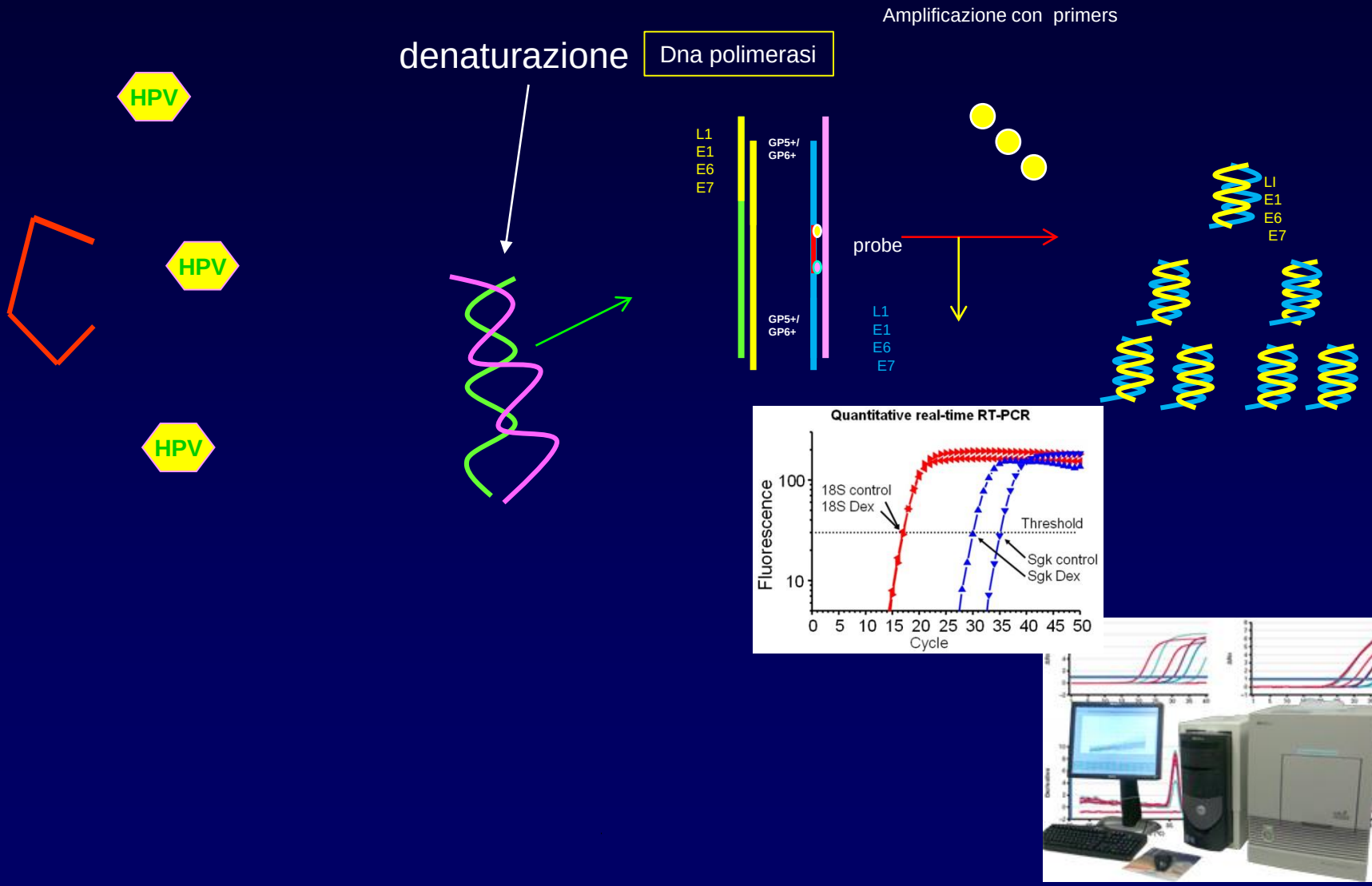
Cosa serve la PCR

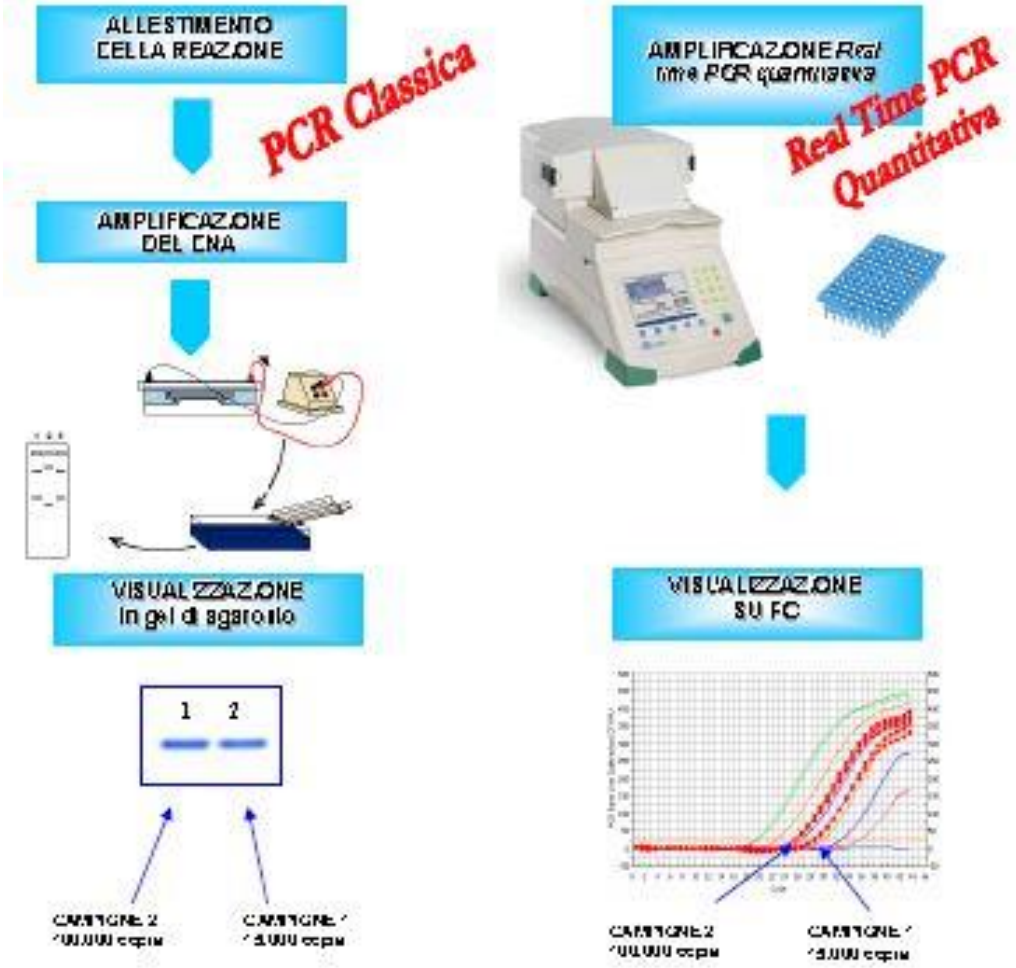
- **Identifica la presenza di infezione da HPV**
- **Determina la carica virale dell' infezione**
- **E' la condizione base per tipizzazione**

PCR IN REAL TIME

E’ un’evoluzione della tecnica di PCR , infatti permette, mediante visualizzazione, la misurazione “in tempo reale” del DNA amplificato .

PCR IN REAL TIME




ALLESTIMENTO
CELLA REAZIONE
PCR Classica
AMPLIFICAZIONE
DEL DNA
VISUALIZZAZIONE
in gel di agarosio
1 2
AMPLIFICAZIONE Real
time PCR quantitativa
Real Time PCR
Quantitativa
VISUALIZZAZIONE
SU PC

PCR IN REAL TIME

Presenta elevata sensibilità, riproducibilità e velocità di esecuzione

Rappresenta l'approccio migliore per la quantificazione degli acidi nucleici e, in particolare, nel determinare la carica virale dell'infezione da HPV

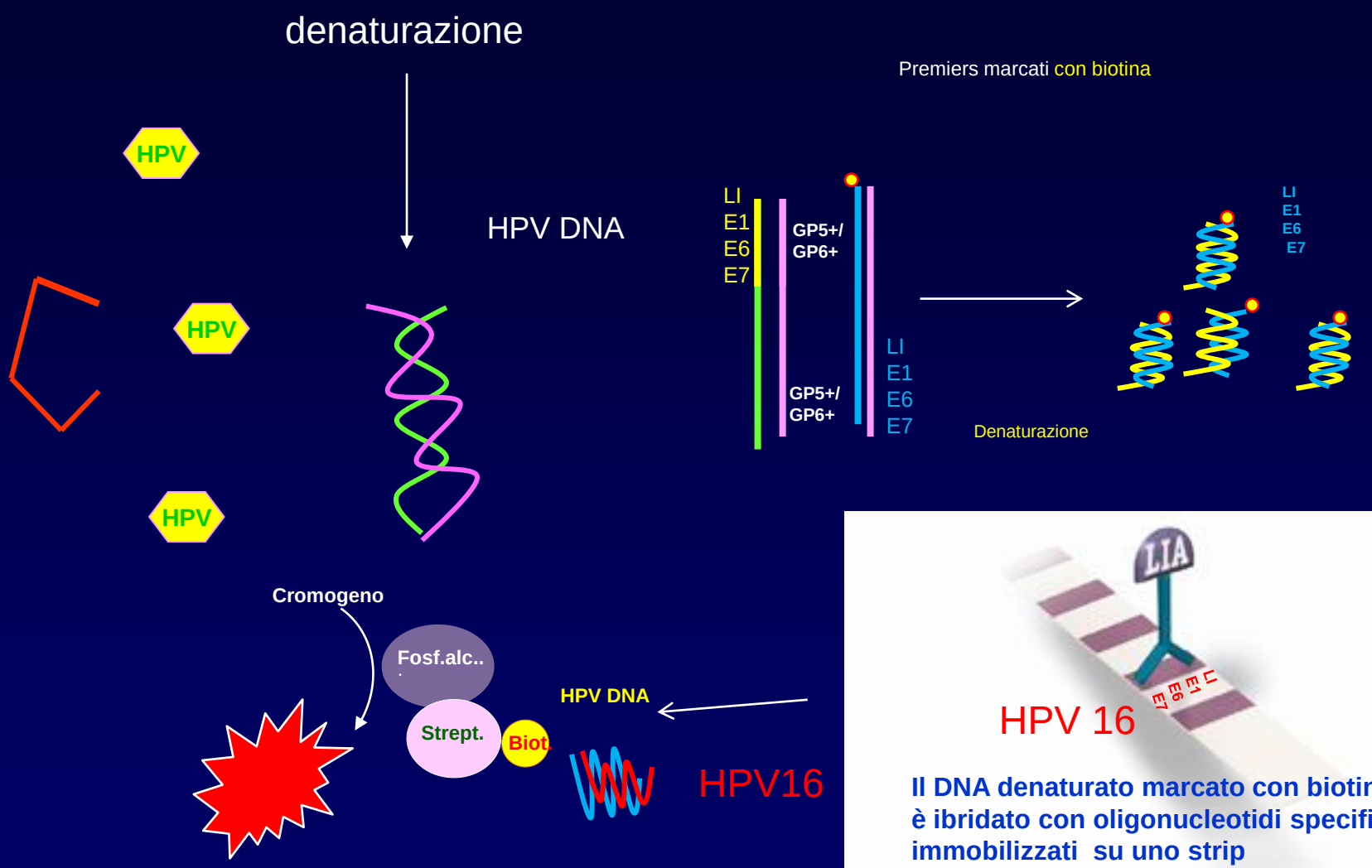
Consente di abbandonare tutte le manipolazioni successive all'amplificazione, potenziali fonti di inquinamento del campione.

Una volta che la reazione di amplificazione è avvenuta con l'utilizzo di primers consenso, l'identificazione dei genotipi HPV può essere eseguita con vari metodi

- L'ibridazione inversa (LIPA, line probe assay)
- RFLP (uso dei restriction fragment lengh polymorfism)
- ELISA (ibridazione con sonde di oligonucleotidi tipo-specifici in micropiastra)
- Sequenziamento diretto e comparazione delle sequenze

.

Tecnologia LiPA (Line Probe Assay) Ibridazione inversa



HPV 16

Il DNA denaturato marcato con biotina è ibridato con oligonucleotidi specifici immobilizzati su uno strip

La biotina lega il complesso streptoavidina/ fosfatasi alcalina

Tipizzazione: quando?

- **Nelle infezioni persistenti**
- **Nel follow-up delle lesioni trattate**
- **In studi epidemiologici**

Test RNA

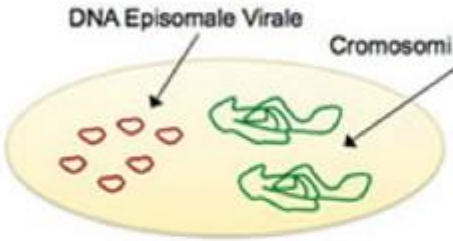
L'alta prevalenza di soggetti positivi al test DNA-HPV non corrisponde alla bassa incidenza di tumori della cervice

Non è l'intero virus ad avere un ruolo attivo nel processo di carcinogenesi, ma la produzione delle oncoproteine E6 ed E7 integrate nel genoma cellulare della cellula ospite

Solo tramite la ricerca nell'mRNA dei geni E6 ed E7 integrati si riesce a valutare il reale rischio di progressione della malattia

Integrazione Virale

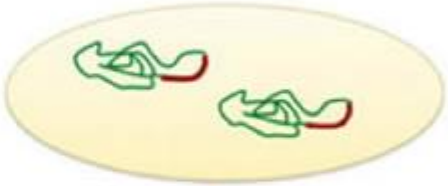
Infezione iniziale da HPV



- Basso livello di espressione di mRNA du E6/E7



Integrazione nel DNA di HPV





- Aumento dell'espressione di mRNA di E6/E7
- Aumento della probabilità di progressione della malattia

HPV RNA

NASBA (Nucleic Acid Sequence Base Amplification)

Il prodotto della reazione NASBA è un RNA a singolo filamento, che rappresenta 106-109 volte la sequenza bersaglio

mRNA cellulare

E6-E7

1° primer Rna polimerasi

DNA

DNA

T RNA polimerasi

Rna complementare

DNA complementare

ribonucleasi H

ibrido

RNA

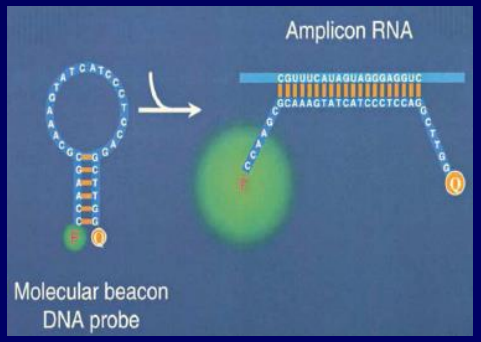
DNA

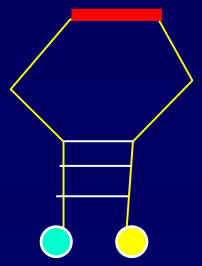
2° primer + Dna polimerasi

DNA

genotipizzazione

Sonde bacon





quencher reporter



E6-E7 da hpv 16



E6-E7 da hpv 18-31



E6-E7 da hpv 33-45

Piastra

Attraverso questa nuova generazione test è possibile avere più informazioni:

-**Integrazione del Papillomavirus (necessaria all'espressione di E6 ed E7 e quindi alla trasformazione cellulare)**

-**Tipizzazione dei genotipi più frequenti nei tumori della cervice**

-**Il test RNA-HPV rileva il 96-98% delle donne a rischio di sviluppare cancro della cervice indotto da HPV con una specificità del 91.8%.**

-Il test RNA-HPV è età indipendente

Concetti da tenere a mente

•I test HPV DNA rilevano la presenza virale nel nucleo cellulare, non un eventuale integrazione nel DNA della cellula ospite.

•I test HPV DNA possono identificare un pool di virus o virus specifici (genotiping).

•La PCR e la PCR real-time sono metodiche che consentono l'amplificazione di segmenti di DNA ma non la tipizzazione virale. Per tipizzare sono necessari metodi aggiuntivi (LIPA, line probe assay).

•I test HPV RNA rilevano lo stato fisico virale (integrazione virale nel DNA della cellula ospite) , dunque l'aumento di probabilità di progressione della malattia.

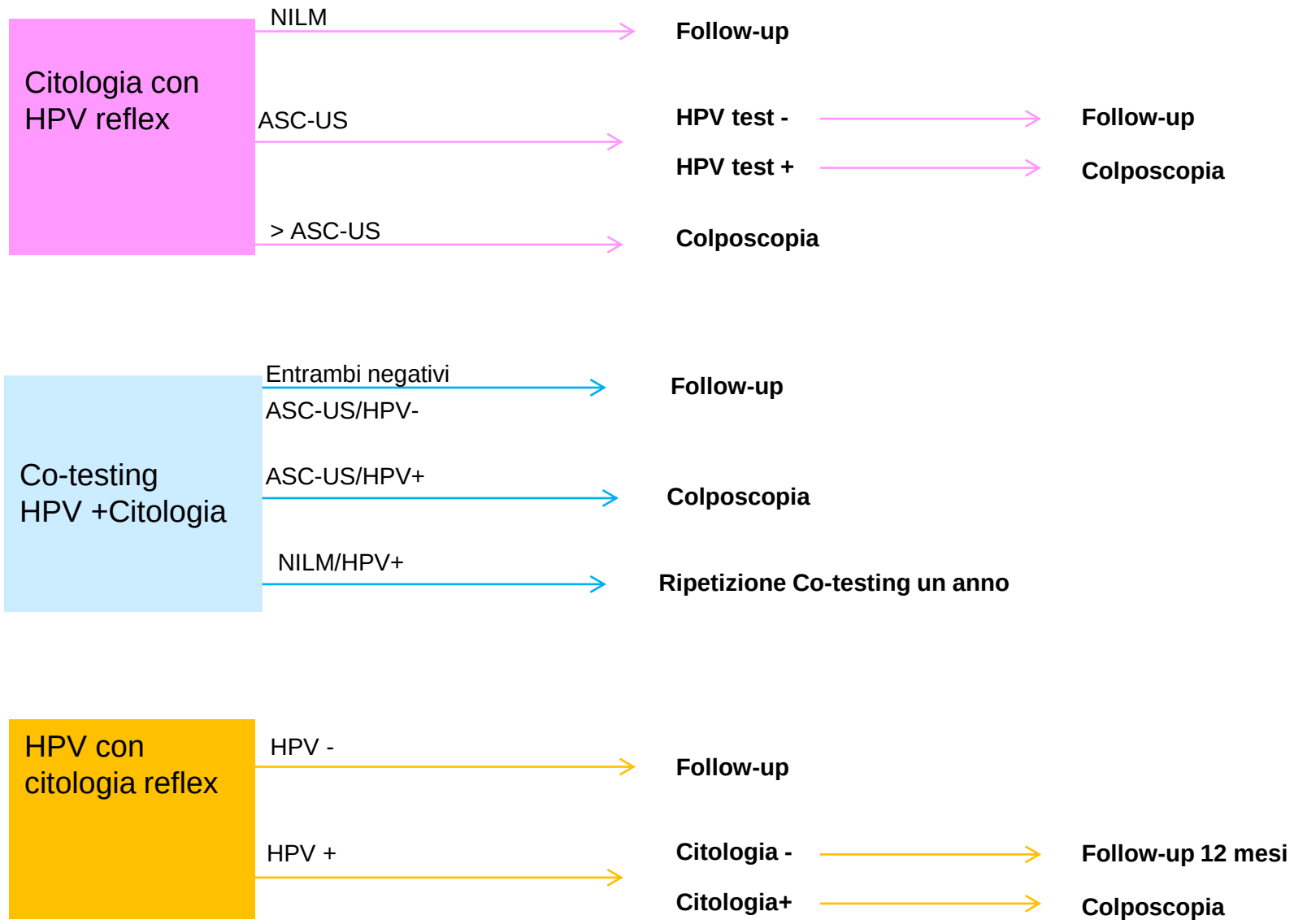
Conclusioni

L'**HC2 è il test commerciale più diffuso di semplice applicazione e costo non troppo elevato.**
Ha un alto VPN, permettendo di individuare donne che quasi certamente non hanno infezione da HPV e che quindi non necessitano di indagini di II livello

Sono oggi disponibili una ampia gamma di altri test per la rilevazione e la tipizzazione dell'HPV che possono essere usati in clinica

L'introduzione di test sempre piu' specifici (RNA test) porterà ad una rivisitazione dell'approccio allo screening e al triage dei positivi, confinando l'esame citologico ad un ruolo ancillare

Suggerimenti per una strategia di prevenzione ambulatoriale



Grazie per l'attenzione

