



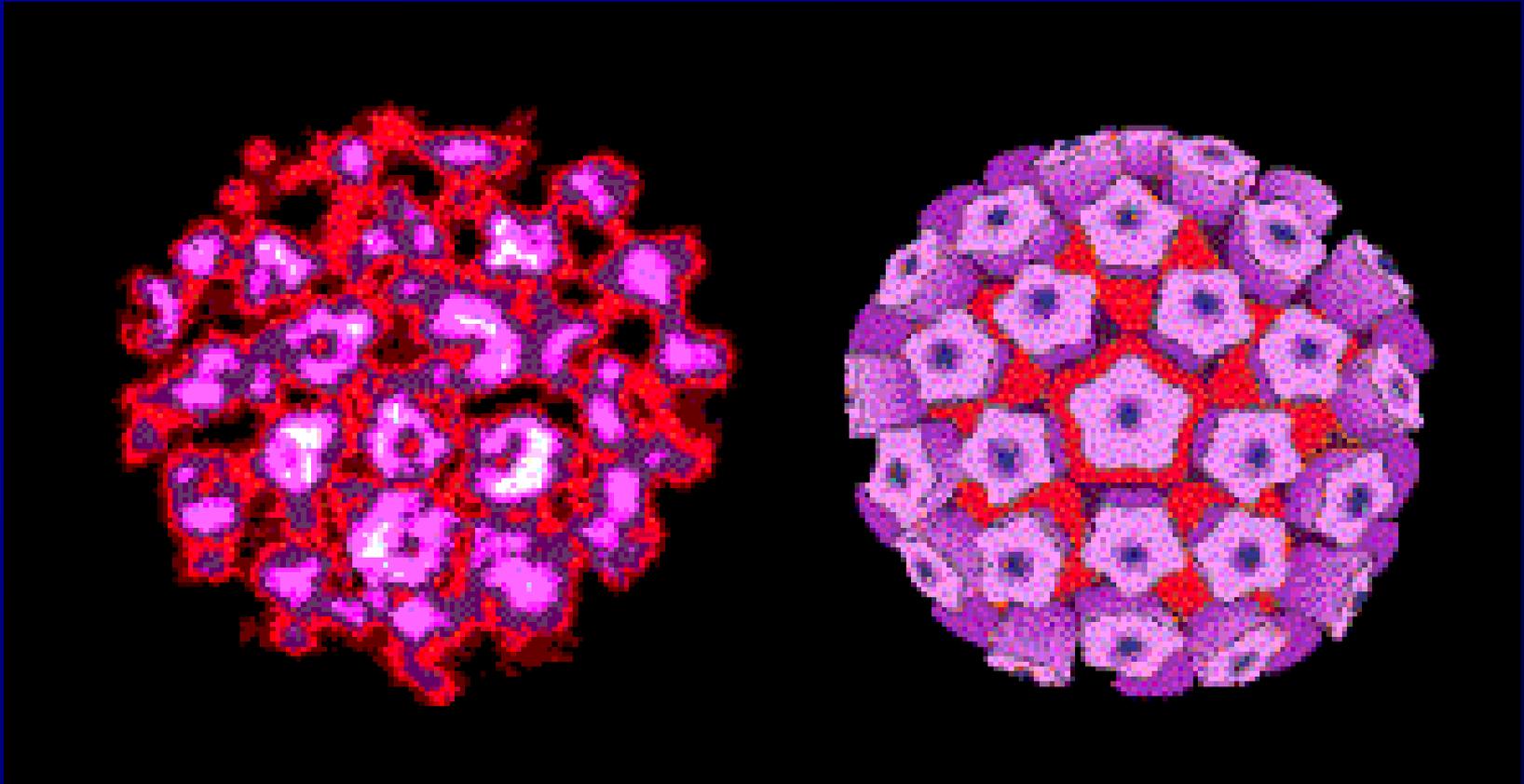
IL TEST HPV: ASPETTI TECNICI

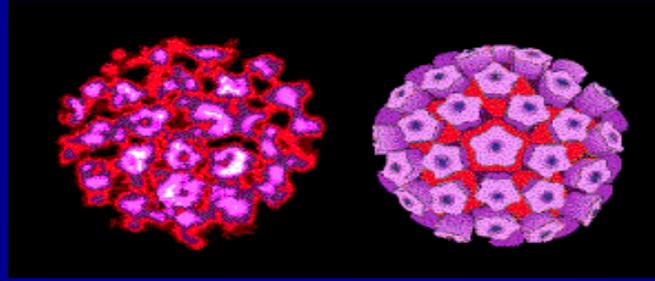
I. Maestri

*Dipartimento di Medicina Sperimentale e Diagnostica
Sezione di Anatomia Patologica
Università degli Studi di Ferrara*

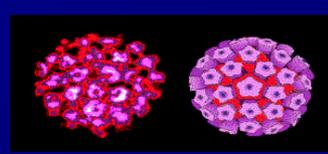
Ferrara, 13 ottobre 2006

I Papillomavirus (HPV) appartengono alla famiglia PA.PO.VA
virus o Papoviridae





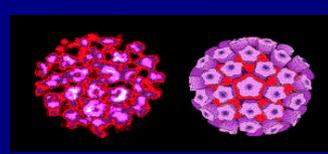
- Virus a DNA a doppia elica, circolari, di 7800 bp
- Capside icosaedrico di 72 capsomeri, 55 nm di diametro
- Si replicano nel nucleo delle cellule epiteliali squamose
- Virus strettamente specie specifici, più di 80 tipi infettano l'uomo
- Raggruppati in *cutanei* o *mucosi* a seconda del sito delle lesioni



HPV

I tipi di HPV che infettano la cervice uterina sono stati suddivisi in HPV:

- **“a basso rischio”** (6, 11, 42, 43, 44 ecc.) quasi mai associati a carcinomi invasivi della cervice
- **“a medio rischio”** (35, 39, 51, 56, 59 ecc.) associati, ma non di frequente, con il carcinoma della cervice
- **“ad alto rischio”** (16, 18, 31, 33, 45, 52, 58 ecc.) frequentemente associati ai carcinomi

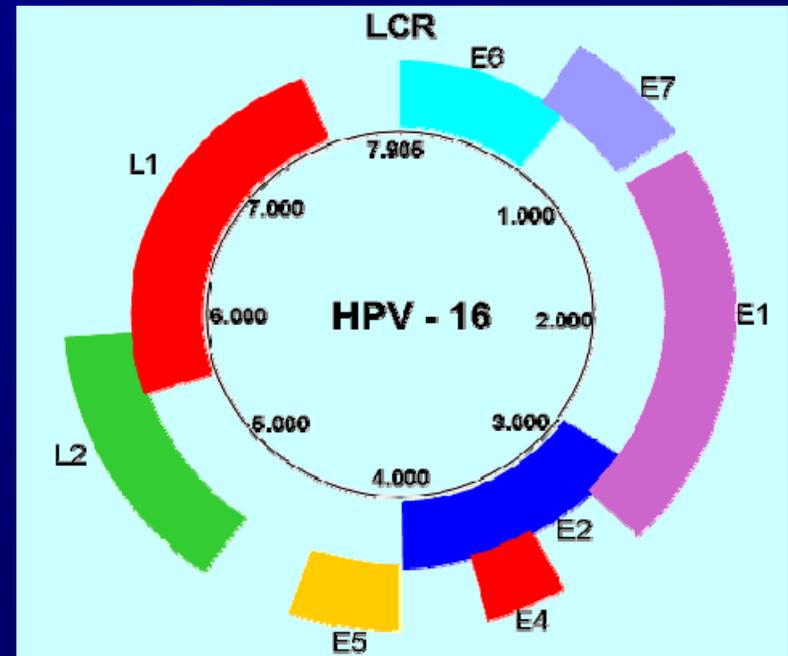


Il genoma di HPV si suddivide in 3 regioni:

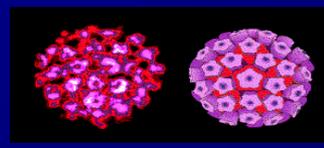
- Una regione precoce "Early" (E1-8) è costituita da geni responsabili della trascrizione, della replicazione e della trasformazione tra cui E6 e E7 (oncogeni).

- Una regione tardiva "Late" che codifica per le proteine del capsido (L1-L2).

- Una regione di controllo (LCR) che contiene elementi regolatori per la trascrizione e la replicazione.



IL TEST HPV

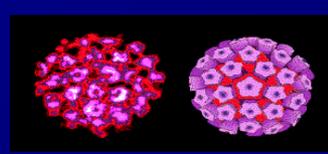


-SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DI UN TEST

-TEST PER L'IDENTIFICAZIONE DI HPV
CON:

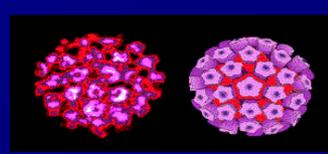
1. TECNICHE IMMUNOCITOCHIMICHE

2. TECNICHE MOLECOLARI



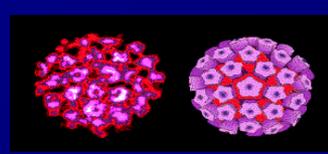
SENSIBILITA' E SPECIFICITA' ANALITICA

- **SENSIBILITA' ANALITICA:** la proporzione di donne HPV positive correttamente individuate da un test.
- **SPECIFICITA' ANALITICA :** la proporzione di donne HPV alto rischio (HR) negative che sono correttamente identificate da un risultato negativo.



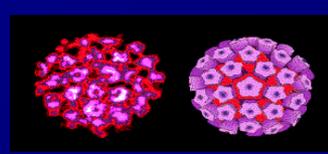
SENSIBILITA' E SPECIFICITA' CLINICA

La Sensibilità e la Specificità Clinica di un test non è direttamente legata alla sua Sensibilità e Specificità Analitica



SENSIBILITA' E SPECIFICITA' CLINICA

- **SENSIBILITA' CLINICA:** la proporzione di donne con malattia (lesioni \geq cin2) che sono correttamente identificate da un test HPV positivo
- **SPECIFICITA' CLINICA:** la proporzione di donne senza lesioni \geq cin2 che sono correttamente identificate da un risultato negativo



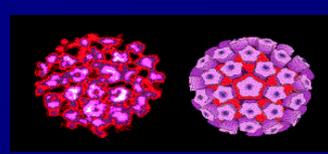
• Valore Predittivo Positivo VPP : ci dice quanti pazienti risultati positivi al test lo sono effettivamente.

Pazienti veramente positivi / Totale dei pazienti positivi al test.

• Valore Predittivo Negativo VPN : ci dice quanti pazienti risultati negativi al test lo sono effettivamente.

Pazienti veramente negativi / Totale dei pazienti negativi al test

IL TEST HPV

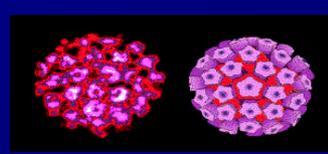


-SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DI UN TEST

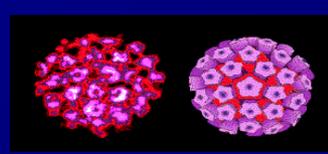
**-TEST PER L'IDENTIFICAZIONE DI HPV
CON:**

1. TECNICHE IMMUNOCITOCHIMICHE

2. TECNICHE MOLECOLARI



I Papillomavirus umani non possono essere coltivati in vitro, in quanto si moltiplicano solo in cheratinociti differenziati, né sono disponibili saggi sierologici affidabili per identificare infezioni in atto o passate da HPV.

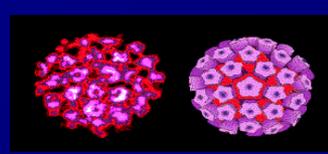


PRELIEVO

in fase liquida: materiale citologico per valutazione morfologica microscopica, campionato in un fissativo liquido che permette una randomizzazione del campione, in quanto il trasferimento viene gestito da uno strumento (es. metodo ThinPrep® o SurePath™)

Questo tipo di prelievo permette ulteriori analisi con il sedimento residuo, come:

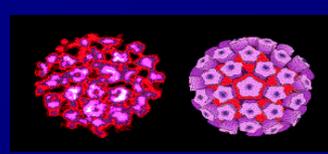
- Reazioni di immunocitochimica
- Analisi molecolari



TECNICHE IMMUNOCITOCHIMICHE

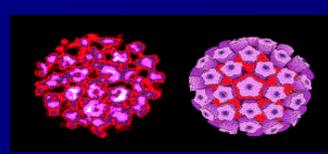
Prevedono l'uso di Ab monoclonali o policlonali per la ricerca di Ag presenti sul capside virale eseguita sia su sezioni bioptiche che su materiale citologico fresco o fissato.

I limiti di questa metodica presenta una sensibilità non ottimale (ad es. nei casi in cui gli Ag del capside non sono espressi).



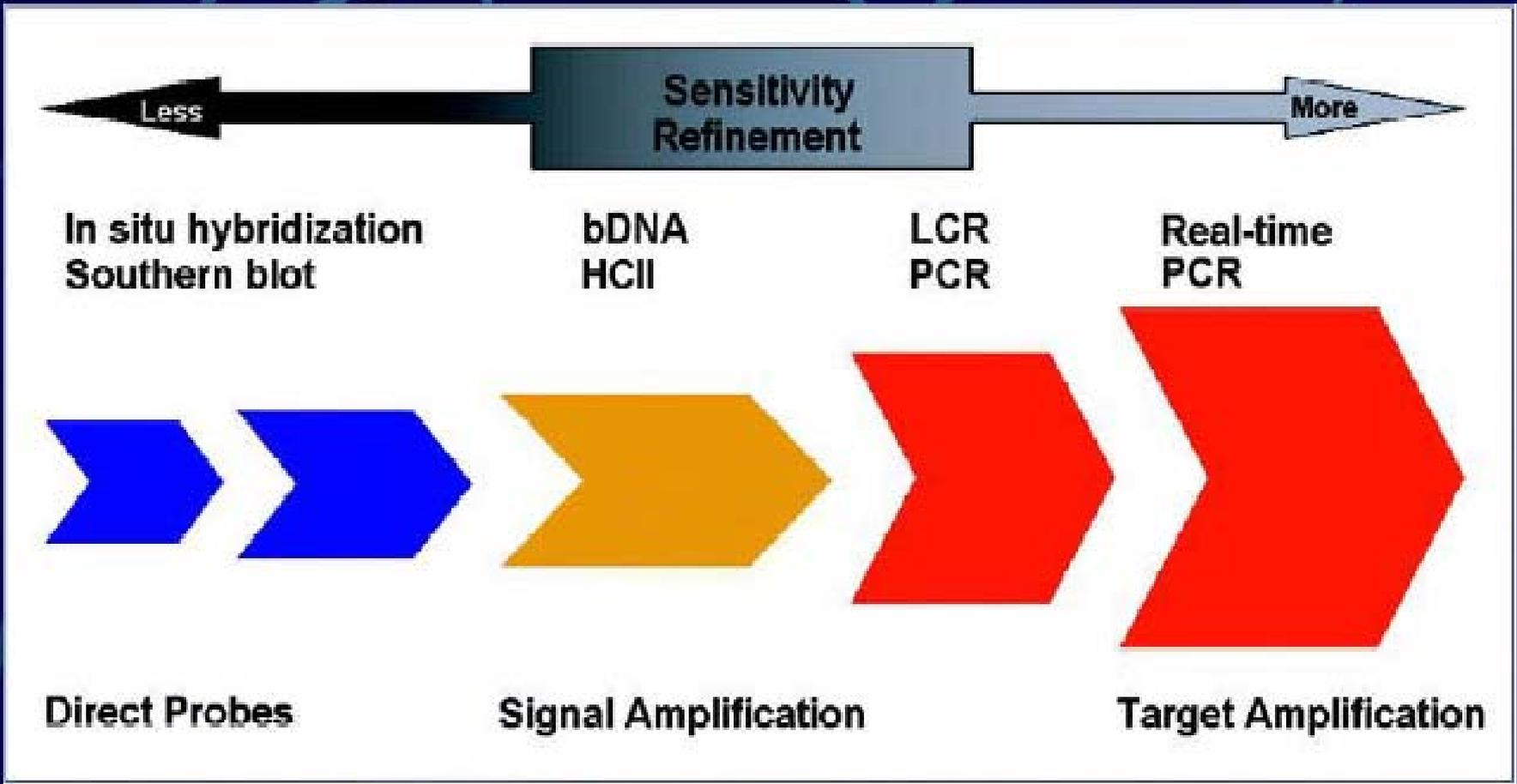
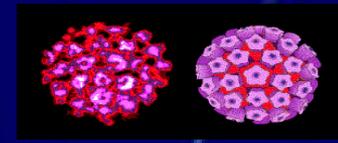
TECNICHE MOLECOLARI

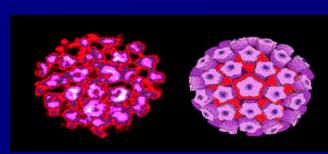
Si basano su tecniche in grado di mettere in evidenza il DNA e/o l'RNA virale e possono fornire informazioni sulla presenza di HPV ad alto e/o a basso rischio oncogenico e/o di uno specifico sottotipo.



Metodi per la individuazione di HPV DNA

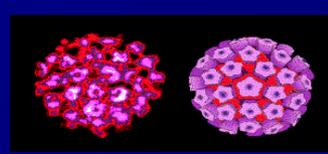
Tecniche	Descrizione	Commenti
Southern Blot	Ibridiz su DNA digerito su un supporto	Specificità molto alta, molto laborioso
Dot Blot (es Virapap/Viratype)	Ibridiz su DNA purificato su filtro	Alta specificità, laborioso
Ibridazione in Situ (ISH) (es INFORM HPV III)	Ibridiz diretta su cellule o tessuti	Conservazione della morfologia, (1-2 copie HPV su SiHa cell)
Hybrid Capture II	Ibridiz liquida con RNA probes	Amplificazione del segnale
PCR (es Amplicor test LIPA, Real-time)	Amplificazione di DNA in vitro	Amplificazione target





I Test validati in trials di ampie dimensioni e in studi epidemiologici sono HC2® e alcuni metodi in PCR .

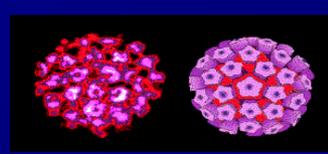
Il Test HC2® è validato dalla US Food and Drug Administration



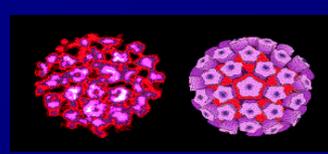
Hybrid Capture 2® (HC2®)

- Procedura standardizzata
- Sensibilità ottimizzata per applicazioni cliniche
- Meno suscettibile a problemi di contaminazione e inibizione della PCR
- Più sensibile della Ibridazione in Situ

HC2®

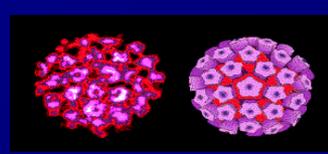


- Ibridizzazione in fase liquida
- *Sonda per 13 tipi di HPV HR (alto e medio rischio) (16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,68)*
- Sonda per 5 tipi HPV LR (6,11,42,43,44)
- Chemiluminescenza
- Qualitativo e semiquantitativo (RLU= Unità di Luce Relativa)



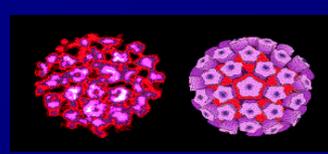
HC2®

- Ogni ibrido RNA/DNA è rilevato da un gran numero di anticorpi, ognuno coniugato a diverse molecole di fosfatasi alcalina.
- L' amplificazione risultante è fino a 3000 volte e dipende dalla lunghezza del DNA bersaglio.
- L' ibrido RNA/DNA è più stabile di quello DNA/DNA, permettendo l' ibridazione ad una temperatura più alta.



HC2®

- La scissione del substrato determina l'emissione di luce, che viene misurata da un luminometro.
- L'intensità di luce emessa è espressa come un rapporto tra il segnale prodotto dal campione e quello prodotto dal controllo positivo (RLU/CO)

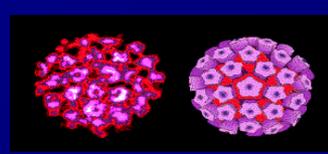


HC2®

Il test si può effettuare su materiale prelevato in fase liquida in fissativo:

- STM (Specimen Transport Medium) (Digene®), 1 ml (2 sett a 2°-8°, 3 mesi a -20°)
- PreservCyt (ThinPrep®), 4 ml (21 gg a TA, 12 sett a 4°)
- SurePath™ , 1 ml (15gg a 4°, 3 mesi -20°)
- Biopsie Cervicali (diam. > 2 mm, in 1 ml STM a -20°)

HC2®



Ibridazione in fase liquida e cattura dell'ibrido su supporto solido:

FASI:



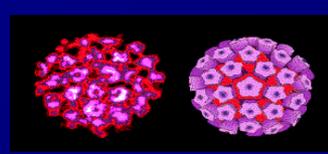
1. Denaturazione

degli acidi nucleici
(45'-90' a 65° in
soluzione denaturante)



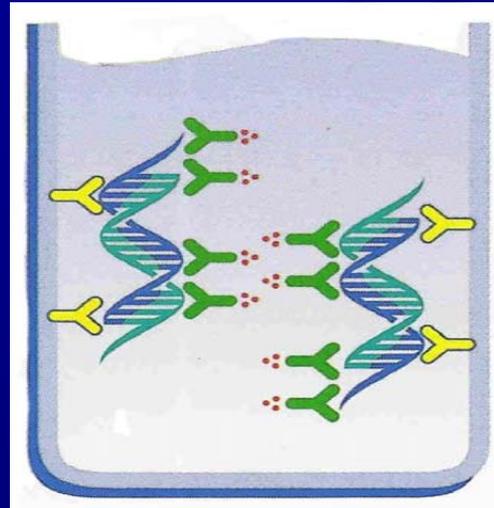
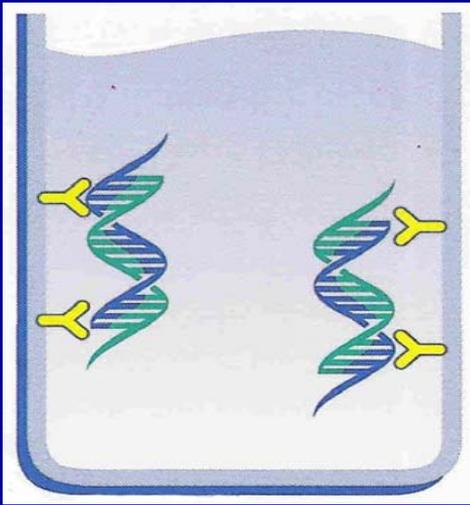
2. Ibridazione

del DNA con sonde di RNA
in fase liquida (60' a 65°)



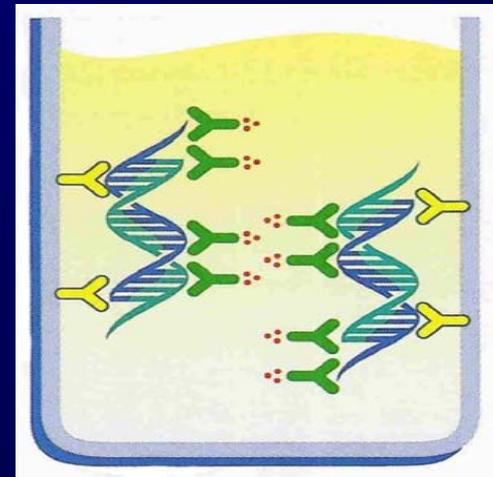
3. Cattura degli ibridi

RNA/DNA in fase solida
(in micropiastrea, 60' a TA)



4. Rivelazione

con reazione degli ibridi
catturati e Ab coniugati
multipli (30' a TA-
lavaggio - 15' a TA al
buio)

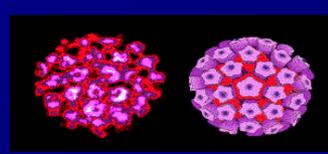


5. Misurazione

del segnale chemiluminescente
con luminometro

Durata HC2[®] test: 4,30h-5h

HC2®



- Il valore soglia del test HC2 del DNA HR-HPV è di:

1 pg/ml

(100.000 copie di HPV/ml - 5.000 copie di HPV per test)

- Viene valutato il rapporto:

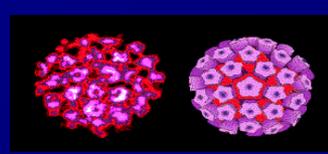
RLU/CO

(unità di luce relativa/valore soglia del calibratore positivo)

- I campioni con:

$RLU/CO \geq 1$

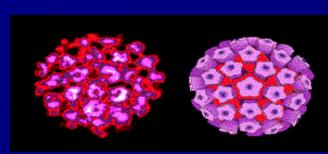
sono considerati positivi



Casistica HC2®

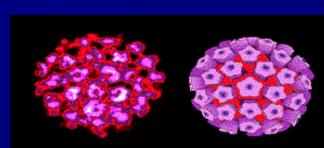
(ASC-US gen-sett 2006)

totali (ASUS)		
	n casi	%
HC2+	117	40,76
HC2-	170	59,24
tot	287	



HC2[®]

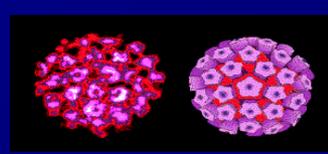
- Il test HC2[®] ha una Sensibilità Clinica del 96% con un Valore Predittivo Negativo (VPN) del 99%, presenta invece una scarsa Specificità (presenza di Falsi Positivi)



VALORE PREDITTIVO POSITIVO CIN2+ DI ASC-US
periodo 1 gennaio - 31 maggio 2006

	N.	%	Biopsia	%	VPP CIN2+%
ASC-US	150				19,57
<i>hr-HPV Pos</i>	59	39,33	31	52,54	31,03
<i>hr-HPV Neg</i>	91	60,67	18	19,78	0

Donatella Beccati, MD
Diagn. Citopatologica, Dip. di Patologia e Oncologia
Azi. Ospedaliero-Universitaria S. Anna Ferrara

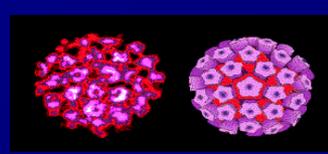


Falsi Positivi

Cross ibridazione:

- Con il plasmide pBR322 usato per la preparazione delle sonde, che presenta sequenze omologhe sul genoma umano
- Con HPV a basso rischio (11 ,53,61 ,66 ,67, 70, 71, 81), più probabile quando carica virale è alta.

Per ovviare, in parte, al problema dei falsi positivi con il test HC2, per lo screening, si propone di innalzare il cutoff da 1 pg/ml a 2 pg/ml
(*JNCI,2006;98:765-74*)

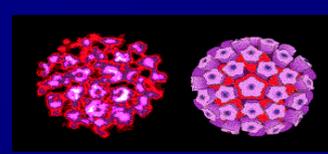


Falsi Negativi

- Se al momento del prelievo del campione sono presenti elevate concentrazioni di pomate antifunginee o spermicidi o lavande vaginali esiste la possibilità di avere falsi negativi.
- Per effettuare l'analisi sono necessari almeno 4 ml di campione in PresevCyt® e 1 ml in SurePath™ se si parte da quantità di campione minore ci possono essere falsi negativi.

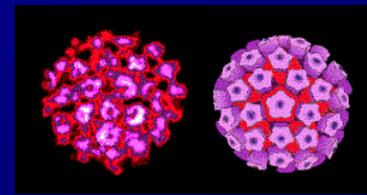
HPV test basati su PCR

(reazione di polimerizzazione a catena)



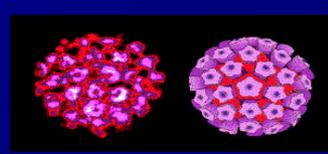
- Test HPV in PCR sono stati clinicamente validati anche se usati, prevalentemente, per ricerca
- I primers utilizzati sono disegnati per amplificare sequenze altamente conservate del genoma virale di HPV nella regione L1, E1 ed E6/E7.
- La PCR è altamente sensibile e specifica
- Il metodo richiede solo piccole quantità di campione
- I singoli passaggi possono essere automatizzati ed essere applicabili a:
 - campioni citologici raccolti in fase liquida
 - tessuti in paraffina

Test HPV con PCR

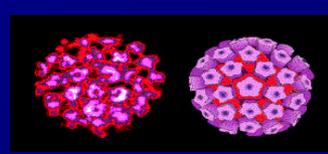


- Identificare la presenza di infezione da HPV (es. Amplicor test)
- Tipizzare HPV (es. HPV genotyping LINEAR ARRAY Assay®)
- Identificare l'espressione di proteine oncogene di HPV tipo E6/E7 (es. PreTect HPV-Proofer Test)
- Determinare la carica virale dell' infezione da HPV (Real-Time PCR)

Amplicor® HPV Test



- Amplificazione del DNA target con PCR
- Test qualitativo *in vitro*
- Permette la determinazione di HPV in campioni citologici in fase liquida (ThinPrep® e SurePath™)
- Individua 13 tipi di HPV ad alto rischio: 16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59 e 68.
- Permette la simultanea amplificazione in PCR del DNA HPV target e del gene umano β -globina (controllo interno)



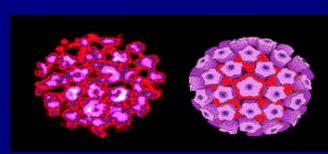
Amplicor® HPV Test

Sensibilità clinica = 96.1%

Specificità clinica = 95.6%

Sensibilità analitica = 100-240 copie di HPV
DNA /ml

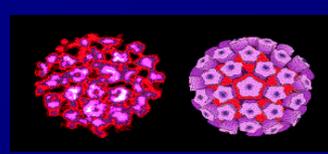
Tipizzazione: Quando?



- Tipizzazione tipo-specifica nelle infezioni persistenti nel follow-up delle lesioni trattate
- Studi epidemiologici
- Studi vaccini

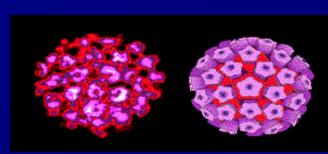
Si possono utilizzare diversi metodi tra i quali:

- RFLP (uso dei restriction fragment length polymorphism)
- ELISA (ibridazione con sonde di oligonucleotidi tipo-specifici in micropiastra)
- LIPA (line probe assay-ibridizzazione inversa es. HPV genotyping LINEAR ARRAY Assay®)
- Sequenziamento diretto e comparazione delle sequenze



HPV genotyping LINEAR ARRAY Assay®

- Analisi qualitativa in vitro per la rivelazione e identificazione del genotipo di HPV in cellule cervicali raccolte in PreservCyt®
- Il test permette di determinare 37 genotipi di DNA di HPV dell' area anogenitale

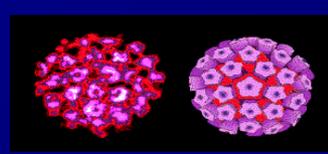


HPV genotyping LINEAR ARRAY Assay®

Sensibilità clinica = 96%

Specificità clinica = 99%

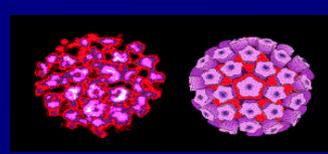
Sensibilità analitica = 120 copie di HPV DNA /ml



DETERMINAZIONE DI HPV-RNA (PreTect® HPV-Proof®)

La persistenza dell'espressione oncogenica di HPV è uno dei più importanti fattori associati al rischio di sviluppo del cancro della cervice.

Il PreTect® HPV-Proof® Test è in grado di fornire indicazioni sulla persistenza e sulla valutazione del rischio di sviluppo del cancro della cervice attraverso l'identificazione di HPV-RNA.

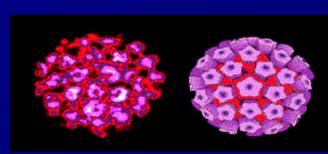


PreTect® HPV-Proofers

Include un set di primers specifici per la determinazione di 5 genotipi virali ad alto rischio di HPV (16, 18, 31, 33 e 45).

Mostra l'attività trascrizionale del DNA virale rivelando la presenza dell'mRNA codificante per le proteine oncogeniche E6/E7 di HPV.

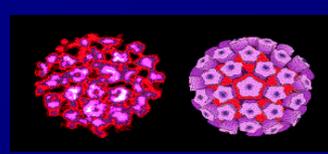
Queste proteine oltre ad essere coinvolte nella promozione della sintesi di DNA virale e nella produzione di virioni maturi, interferiscono con le proteine cellulari p53 e pRB, responsabili dei normali checkpoints del ciclo cellulare della cellula ospite, favorendo la trasformazione neoplastica.



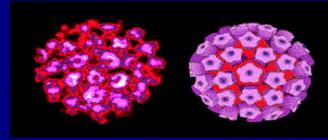
Real-Time PCR

- La Real-Time PCR è una tecnica di amplificazione del DNA basata sul monitoraggio continuo dei prodotti di amplificazione nel tempo.
- Presenta elevata sensibilità, riproducibilità e velocità di esecuzione
- La PCR quantitativa Real-Time rappresenta l'approccio migliore per la quantificazione degli acidi nucleici e, in particolare, nel determinare la carica virale dell'infezione da HPV
- Diversi studi hanno mostrato che pazienti con alta carica virale di HPV possono avere un rischio aumentato di sviluppare il cancro della cervice.

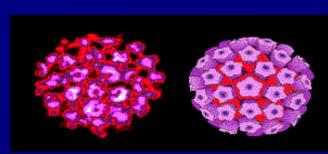
CONCLUSIONI



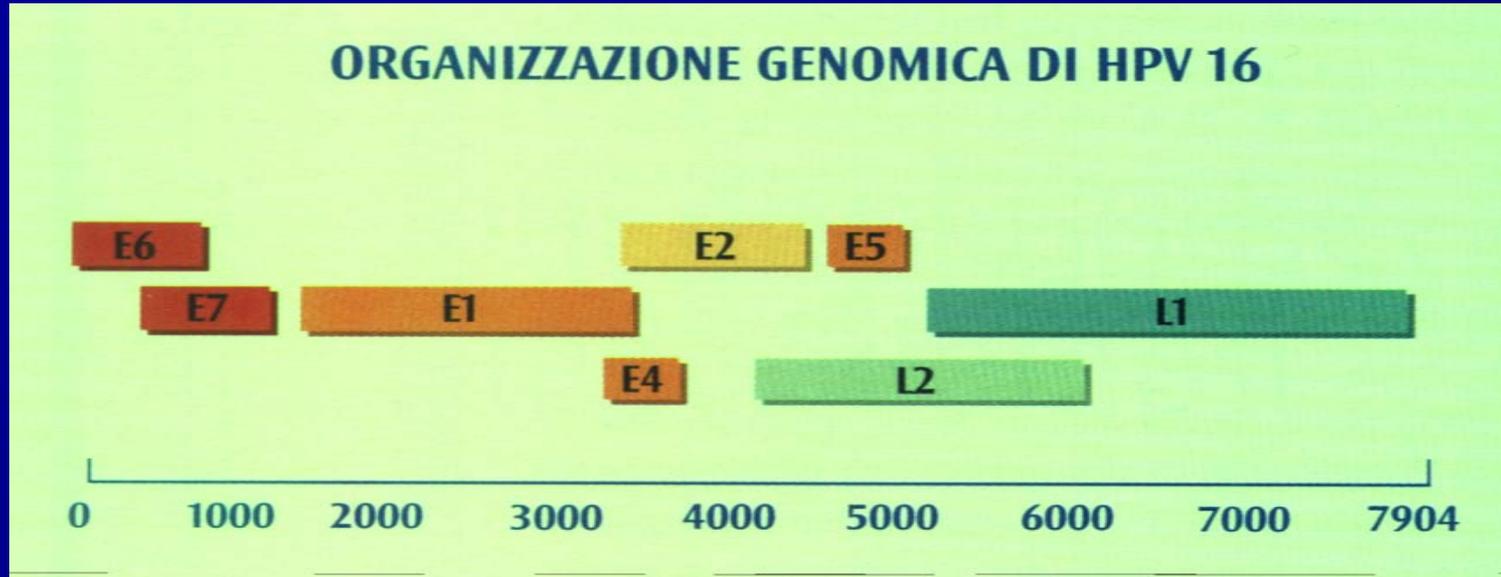
- L' **HC2** è il test commerciale più diffuso, l'unico approvato FDA, di semplice applicazione e costo non troppo elevato. Ha un alto VPN, permettendo di individuare donne che quasi certamente non hanno infezione da HPV e che quindi non necessitano di indagini di II livello
- Altre tecniche molecolari basate sulla **PCR** (es. Amplicor test) si stanno diffondendo e automatizzando, ma la loro applicazione diagnostica al momento è limitata
- Altre metodiche molecolari, più sofisticate e costose (attualmente), come **LIPA**, **RealTime**, **HPV-RNA**, anche se non di prima applicazione nei programmi di screening, possono essere applicate, in un futuro prossimo, per meglio definire il follow-up nel II livello.



grazie



ORGANIZZAZIONE GENOMICA DI HPV 16



E1 inizio della replicazione (elicasi)

E2 regolaz. trascrizione/replicazione DNA

E4 proteina tardiva non strutturale

E5 proteina trasformante

E6 proteina trasformante, lega la p53

E7 proteina trasformante, lega la pRB

L1 proteina capsidica maggiore principale

L2 proteina capsidica minore

stampa dei risultati

Plate ID: 20040206b

2/6/2004 2:26:26PM

Page 2 of 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ID RLU Ratio Result:	NC 34	008 31 0.16 --				Outlier NC 38	008 15478 65.67 High Risk				
B	ID RLU Ratio Result:	NC 48	0010 54 0.28 --				NC 70	0010 72 0.25 --				
C	ID RLU Ratio Result:	NC 46	0013 52 0.27 --				NC 58	0013 491861 1769.28 High Risk				
D	ID RLU Ratio Result:	LRC 198	0015 32 0.17 --				HRC 284	0015 50 0.17 --				
E	ID RLU Ratio Result:	LRC 186	0017 36 0.19 --				HRC 263	0017 166828 600.10 High Risk				
F	ID RLU Ratio Result:	LRC 180					HRC 282					
G	ID RLU Ratio Result:	qc lr 660 3.51 Low Risk					qc lr 73 0.28 --					
H	ID RLU Ratio Result:	qc hr 46 0.24 --					qc hr 1054 3.79 High Risk					



Hybrid Capture® II Software v.2.0

Instrument Serial #: 1591

Supervisor: _____

Date: _____

- La teorica diminuzione in sensibilità clinica per lesioni Cin2+ era maggiore (3.6%) rispetto alla diminuzione in sensibilità per lesioni più severe cin3+ (1,2%)



- Le lesioni cin2+ potrebbero essere dovute a tipi non caratterizzati cross reattivi che regrediscono, mentre cin3+ dovuta solo a tipi oncogenici

*Restricted cross-reactivity of HC2
with non oncogenic HPV'
Castle P.E.: 2002*

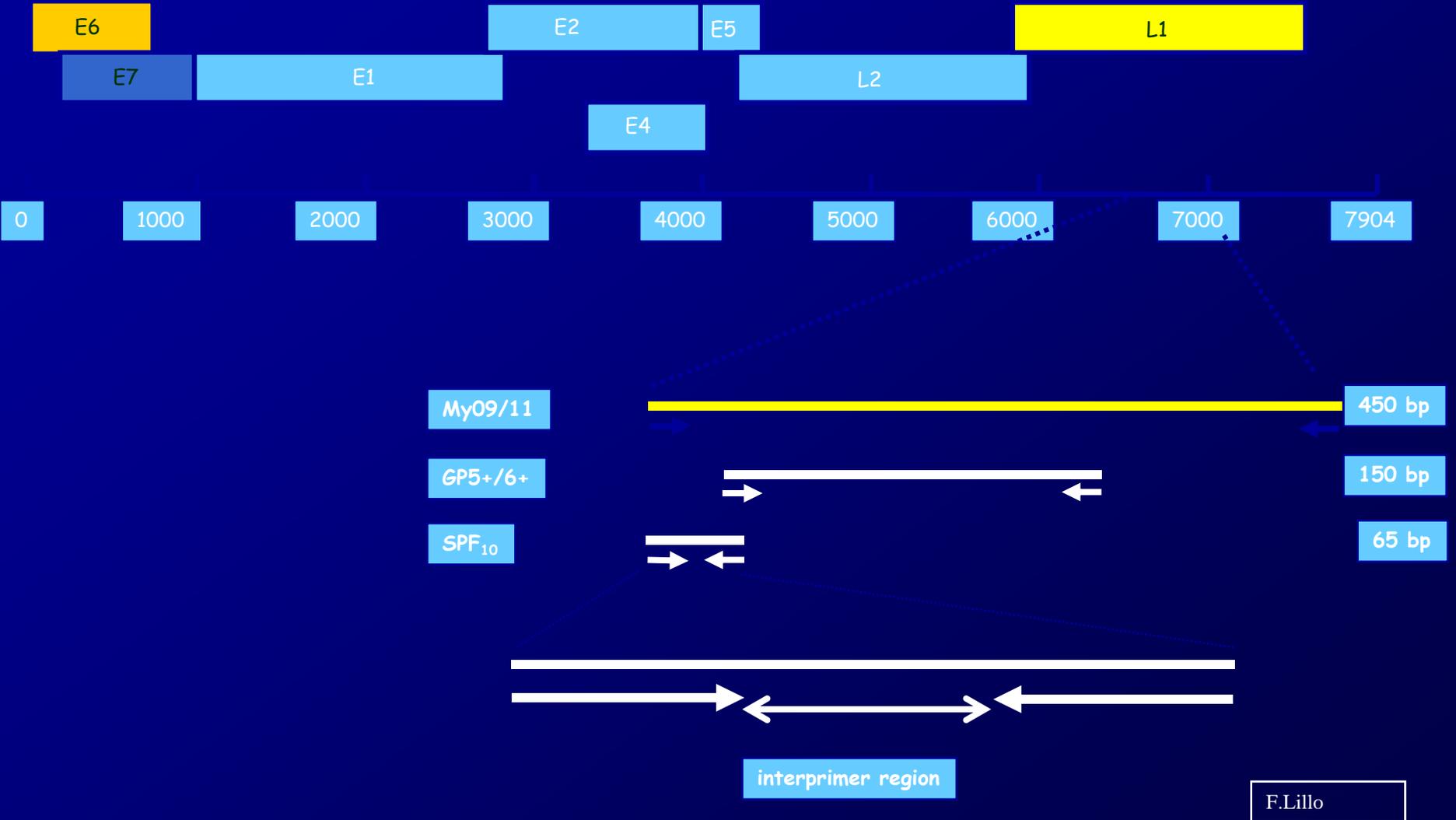
HC2®

- Il costo del test, come reagenti, per ogni campione, è di circa 30 euro. Si possono analizzare fino a 88 campioni per ogni sessione.

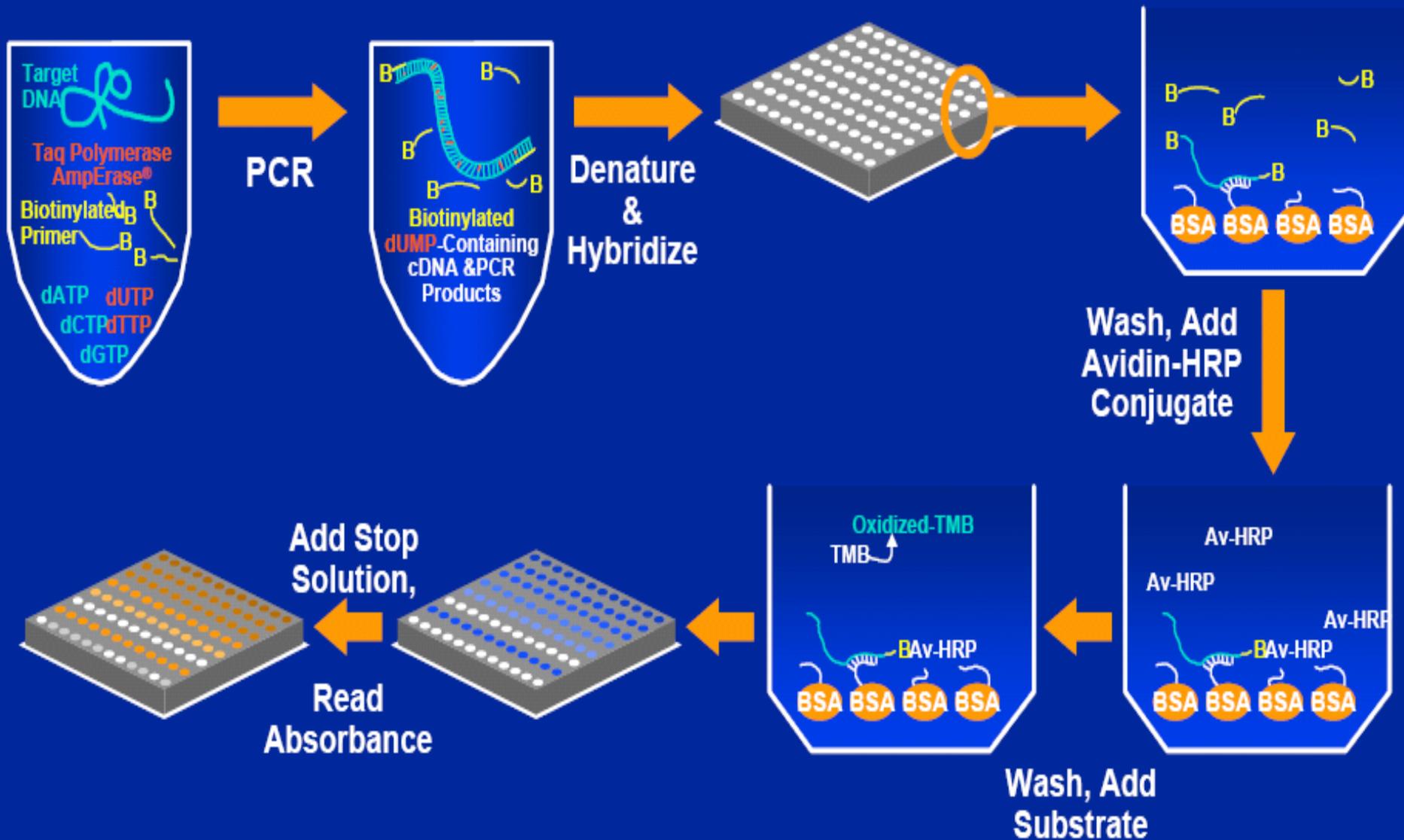
La micropiastrea è costituita da 96 pozzetti. Per ogni sessione, i primi 8 pozzetti, devono sempre occupati dai controlli, 3 CN, 3 CP, 1 CHPV- e 1 CHPV+).

- Il costo del test previsto dal Nomenclatore Tariffario Regionale alla voce 91.37.1 è di 81,60 euro.

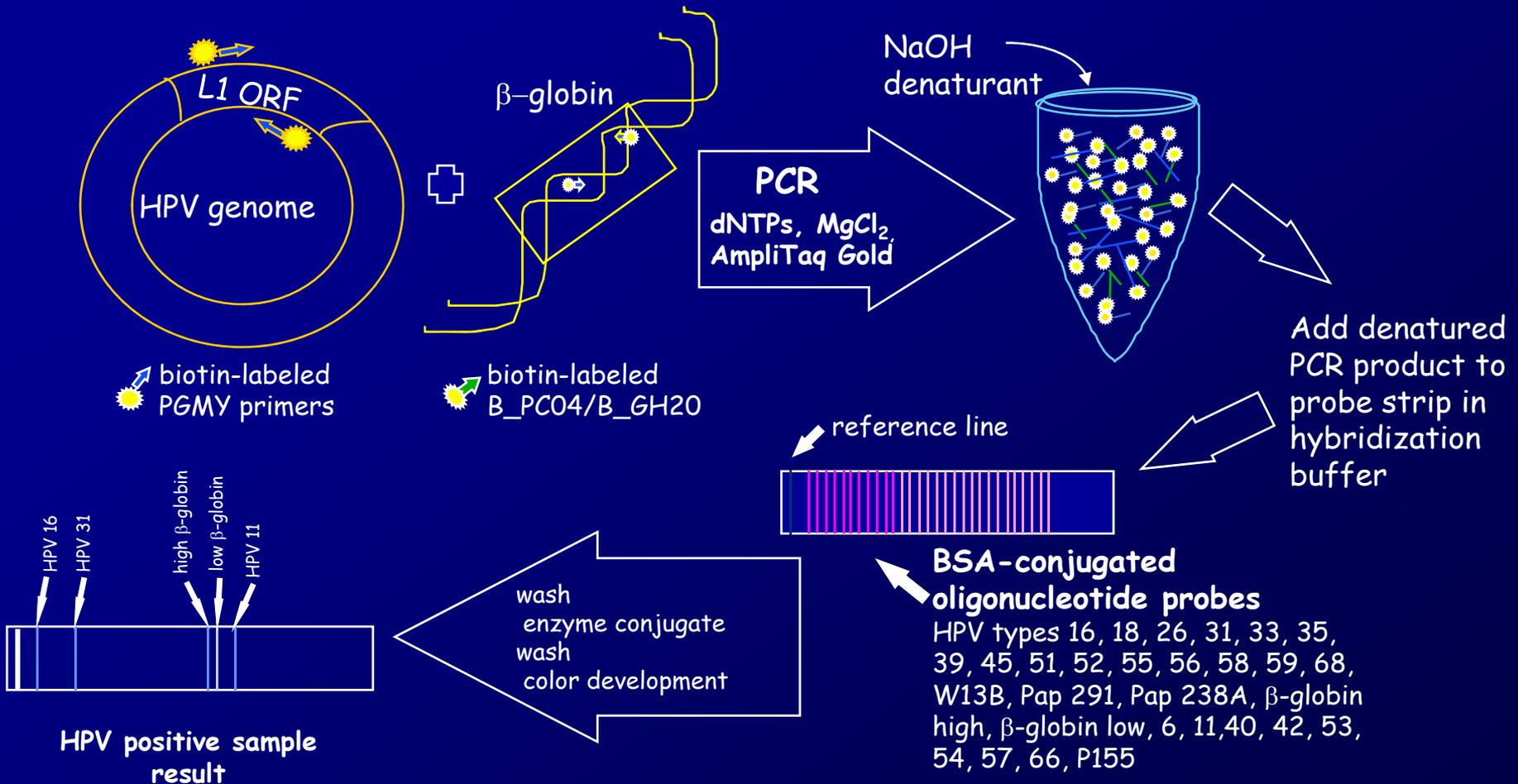
HPV L1 general primer sets



Amplicor® HPV Test



HPV genotyping LINEAR ARRAY Assay®



NASBA

Amplificazione delle sequenze base degli acidi nucleici

L'uso del PreTect comporta due procedure:

➤ Amplificazione dell'acido nucleico che utilizza:

- 3 enzimi: Avian Myeloblastosis Virus Transcrittasi Inversa (AMW-RT)

RNasi H di Escherichia Coli

T7 RNA Polimerasi

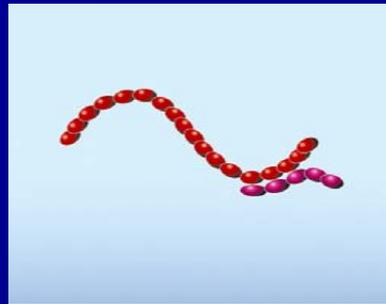
- due Primers specifici

- nucleosidi trifosfati

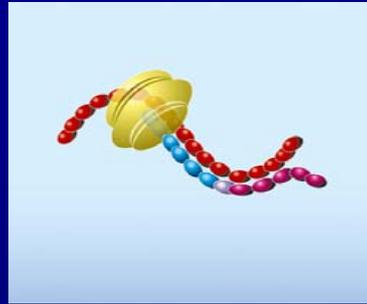
- tampone appropriato

➤ Rilevazione in real time dell'acido nucleico con sonde molecular beacon

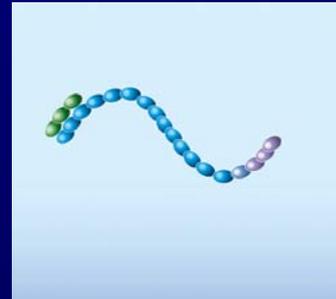
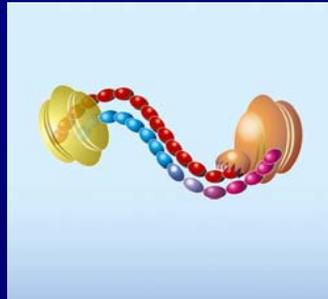
La reazione NASBA continua in modo autosostenuto in condizioni isotermitiche (41°C) raggiungendo così un grado di amplificazione che sintetizza circa 10^6 - 10^9 nuovi filamenti in 90'



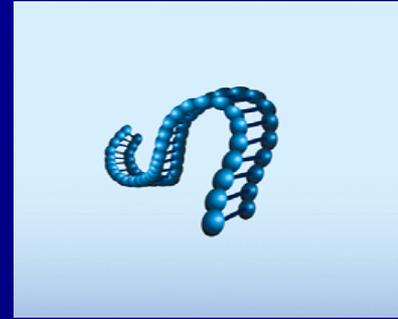
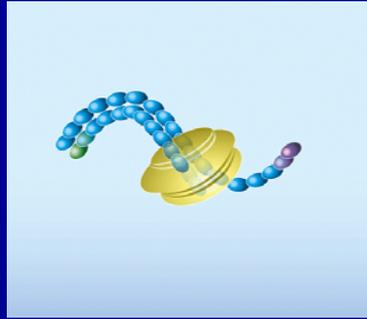
La reazione NASBA inizia con l'ibridazione del primer P1 con l'RNA target. Il primer contiene in 5'-terminale la sequenza del promotore T7 RNA polimerasi.



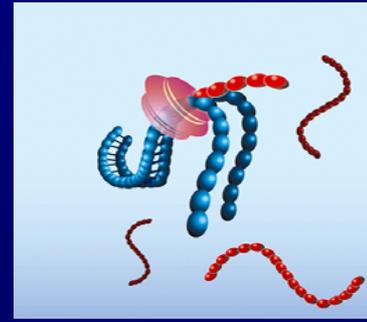
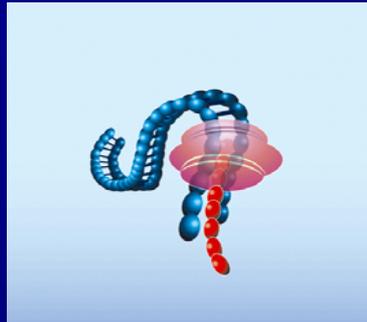
L'AMW-RT allunga il primer creando una copia a cDNA dell'RNA templato, formando un ibrido a RNA/DNA



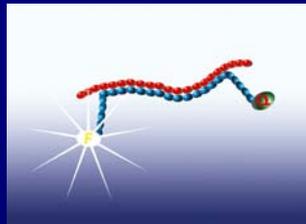
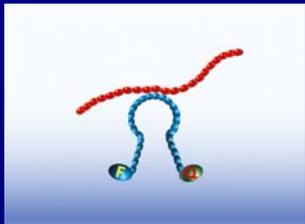
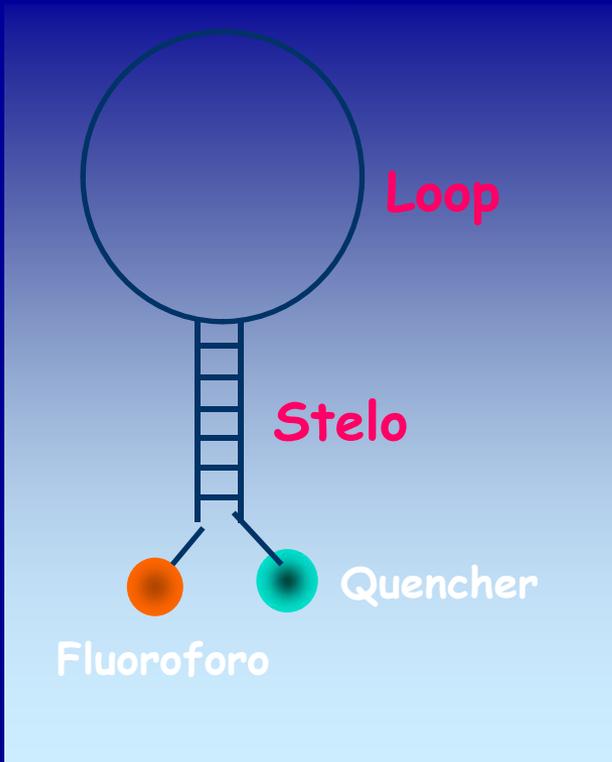
L'Rnasi H riconosce questo ibrido RNA/DNA e degrada la parte ad RNA lasciando un filamento singolo a DNA. Il secondo primer P2 si lega a questo DNA.



L'AMW-RT allunga il primer P2 costruendo, in questo modo, la parte promotrice del doppio filamento di DNA rendendolo trascrizionalmente attivo.



Riconoscendo la nuova funzionalità promotrice, la T7 RNA Polimerasi produce copie multiple dell'RNA trascritto rappresentanti la sequenza anti-senso dell'RNA target originale.



- L'RNA amplificato è rilevato in real time attraverso l'uso delle sonde "Molecular Beacon".
- Le M.B. sono oligonucleotidi a singolo filamento con una struttura a "stem-loop". La parte loop contiene una sequenza complementare a quella dell'acido nucleico target, mentre la parte stem è indipendente dal target ed è a doppio filamento.
- I due bracci della parte lineare sono legati ad un marcatore fluorescente e ad un quencher non fluorescente
- In questo stato la sonda non produce fluorescenza poiché l'energia del marcatore fluorescente viene trasferita al quencher
- Le sonde "Molecular Beacon" complementari all'RNA amplificato si legano formando un ibrido con struttura stabile. Questo legame da luogo ad una separazione fisica tra fluoroforo e quencher determinando l'emissione di fotoni della lunghezza d'onda specifica per il fluoroforo.

- I campioni vengono analizzati con il il PreTect Analysis Software (PAS, NorChip) che controlla la qualità di tutte le curve di amplificazione .
- le curve relative ai risultati positivi hanno l'aspetto di una sigmoide e l'aumento di fluorescenza durante il processo di amplificazione deve essere $\geq 1,7$. (G1)
- I risultati sono considerati indeterminati quando il relativo segnale di aumento rientra nella fascia di valori 1,4-1,7. (F1)
- I risultati sono considerati negativi quando il relativo segnale di aumento del grado di fluorescenza è $\leq 1,4$. (E1)

