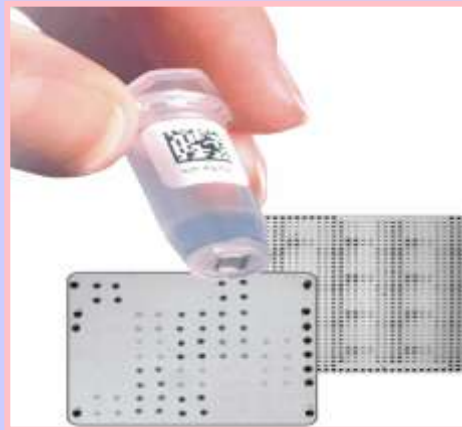


Μοριακή ανίχνευση & τυποποίηση του ιού HPV με την χρήση των DNA Μικροσυστοιχιών

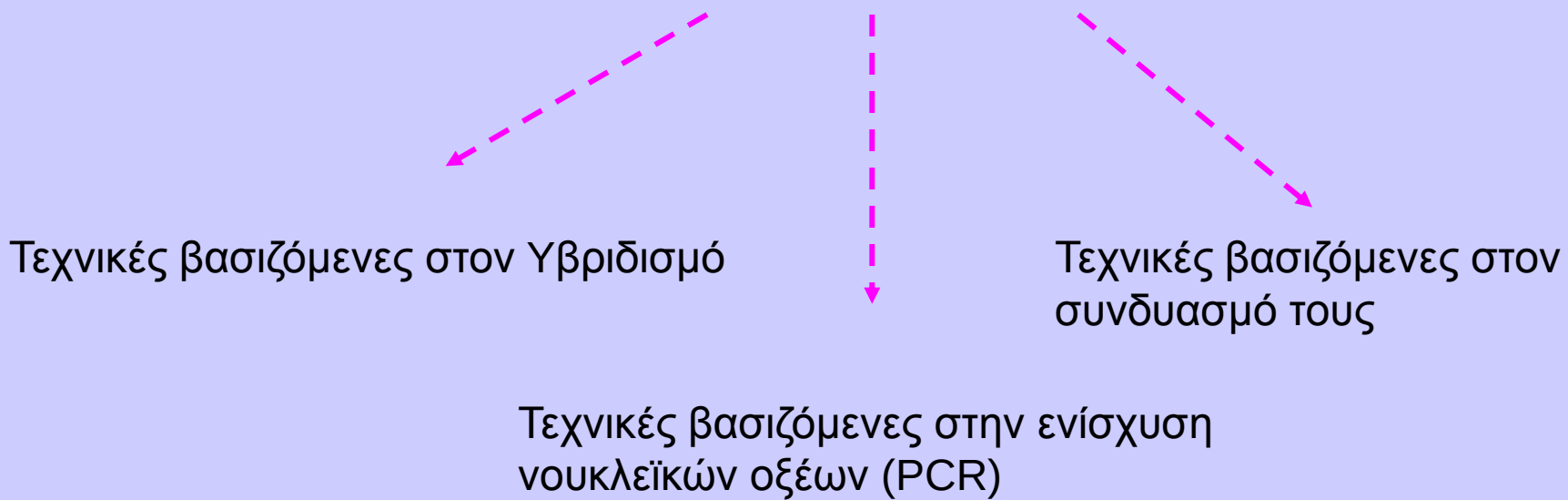


Αικατερίνη Χρασιώτη

ΠΕ Βιοχημικός, Εργαστήριο Διαγνωστικής Κυτταρολογίας,
Π.Γ.Ν. «ΑΤΤΙΚΟΝ»

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΗΡV

Από την δεκαετία του 1970 και ως σήμερα έχει αναπτυχθεί μια μεγάλη ποικιλία μεθόδων ανίχνευσης και τυποποίησης του ΗΡV, οι οποίες μπορούν να διαχωριστούν σε τρεις μεγάλες κατηγορίες:



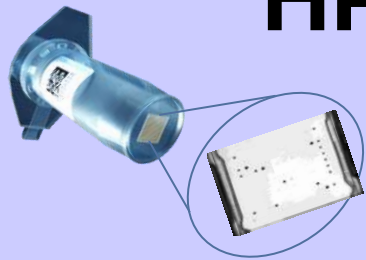
Τεχνικές βασισμένες στον Υβριδισμό

Τεχνικές βασισμένες στον συνδυασμό τους

Τεχνικές βασισμένες στην ενίσχυση νουκλεϊκών οξέων (PCR)

HPV DNA ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ

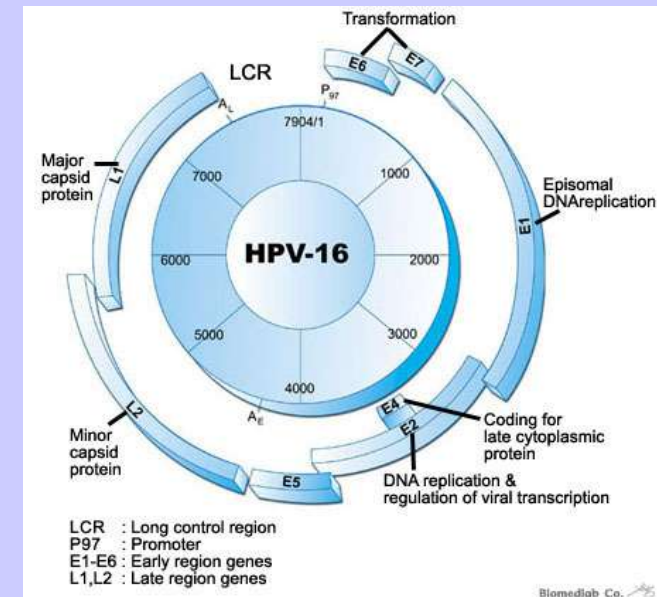
CLART® HPV2 (GENOMICA)



✓ Οι Μικροσυστοιχίες αποτελούν μια από τις πλέον ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ μεθοδολογίες Μοριακής ανίχνευσης & τυποποίησης του HPV (1^η εμπορικά διαθέσιμη)

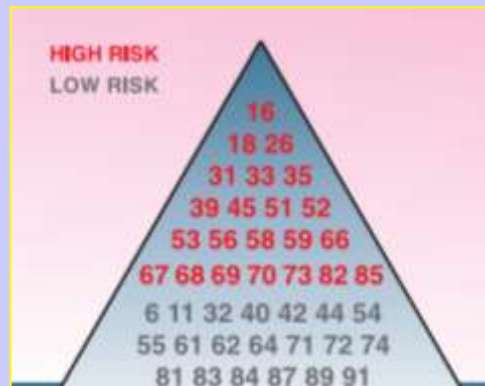
✓ Στηρίζονται στην ανάπτυξη ενός συστήματος ανίχνευσης των HPV γονοτύπων με τη βοήθεια:

1. Μιας υψηλής ευαισθησίας & ειδικότητας PCR (L1 περιοχής, 450bp)
2. Στη Υβριδοποίηση των PCR προϊόντων με την χρήση της τεχνολογίας των Μικροσυστοιχιών μικρής πυκνότητας (Clinical Array Technology: σωληνάριο Array Tube™)



HPV DNA ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ

- ✓ Η μέθοδος είναι ικανή να ανιχνεύσει την ύπαρξη 35 τύπων HPV (20HR + 15LR) στο προς εξέταση δείγμα

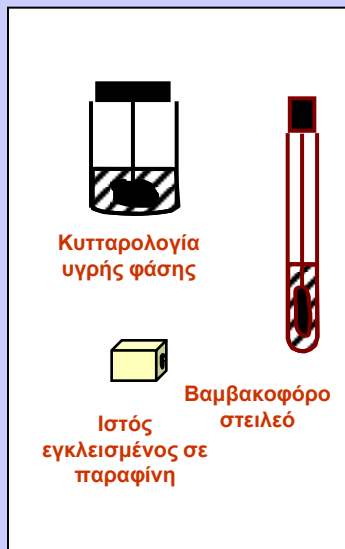


- ✓ Η μέθοδος είναι ικανή να διαχωρίσει την HPV λοίμωξη σε Μονή ή/και Πολλαπλή

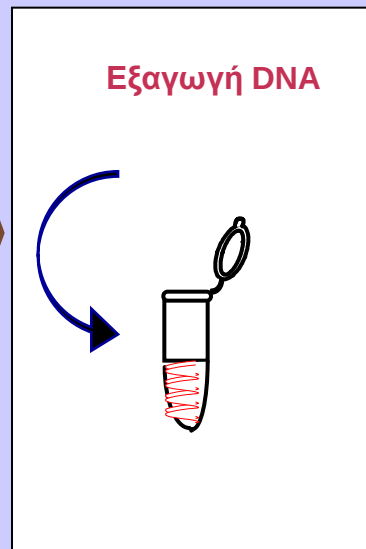
HPV DNA ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ

“Με μια ματιά”

Βιολογικό Υλικό



**Απομόνωση
γενωμικού DNA**



**HPV DNA
πολυμερισμός**



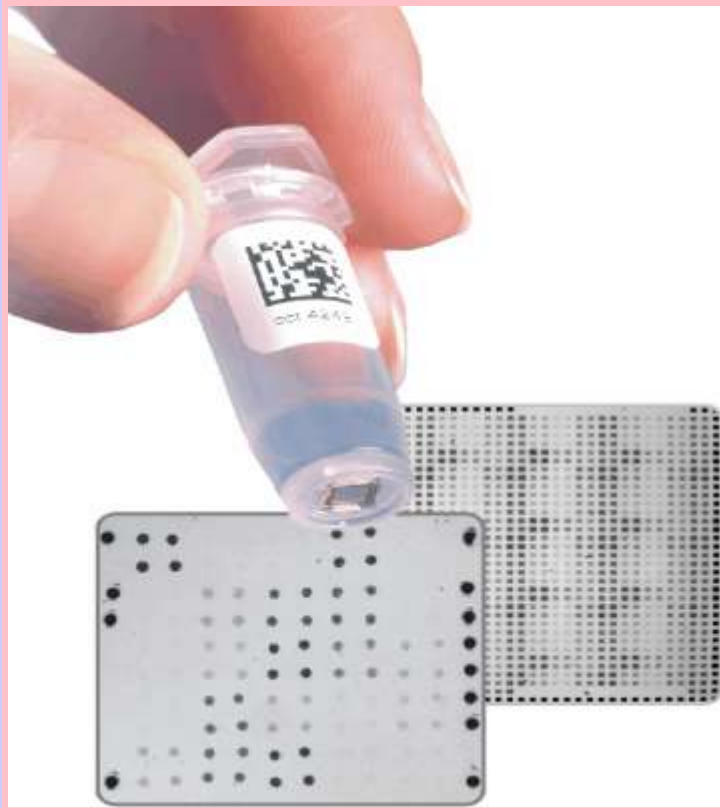
**Υβριδισμός &
Ανάλυση
αποτελέσματος**



Pre- PCR room

Post- PCR room

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΩΝ

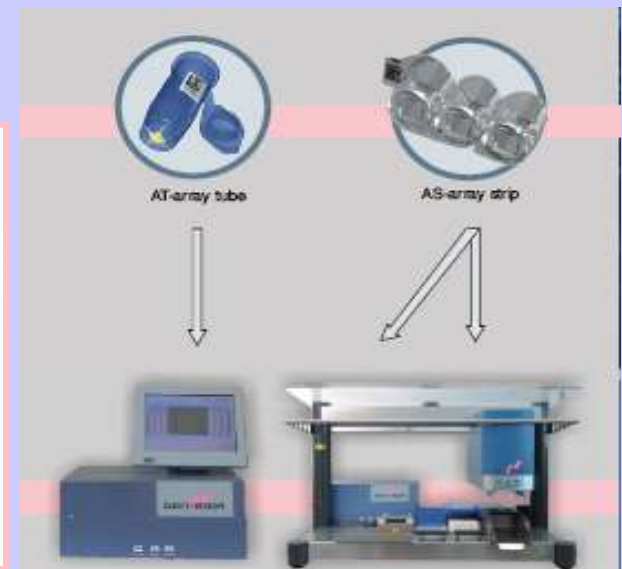


Biochip (3x3mm): 120 ιχνηθέτες

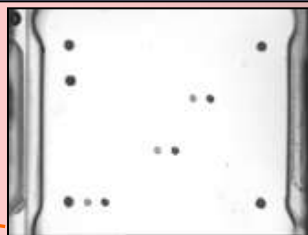
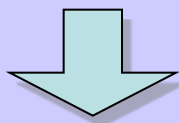
- 35 HPV ιχνηθέτες - σε τριπλέτα

-Εσωτερικούς μάρτυρες για τον έλεγχο DNA του δείγματος (CFTR, 892bp) - σε τριπλέτα

-Εσωτερικούς μάρτυρες για τον έλεγχο της PCR (τροποποιημένο πλασμίδιο, 1202bp) – σε τριπλέτα



ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΩΝ

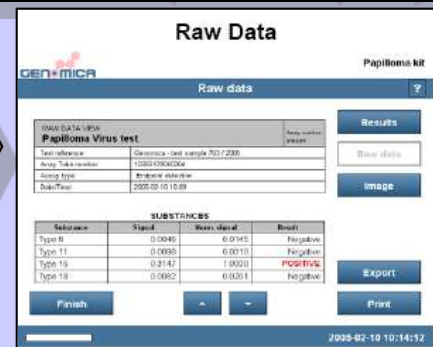


ΤΕΛΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ:
Μαύρες κουκίδες
υποδηλώνουν Υβριδισμό



**Λογισμικό Ανάλυσης
Εικόνας**

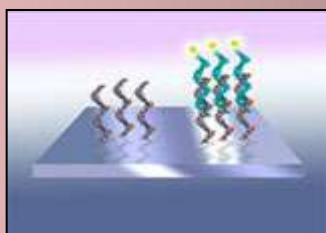
Έκθεση Αποτελέσματος



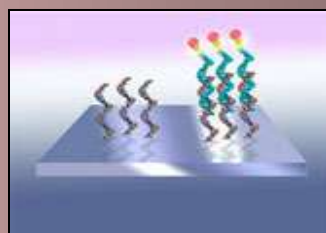
Ακίνητοποιημένοι
ιχνηθέτες στην
πλατφόρμα της
Μικροσυστοίχιας



Προσθήκη
πολυμερισμένων
προϊόντων σημασμένα
με βιοτίνη



Τα σημασμένα
προϊόντα
πολυμερισμού
αναγνωρίζουν τους
αντίστοιχους ιχνηθέτες
-κατά τη διάρκεια του
Υβριδισμού- και
ακίνητοποιούνται στις
αντίστοιχες θέσεις

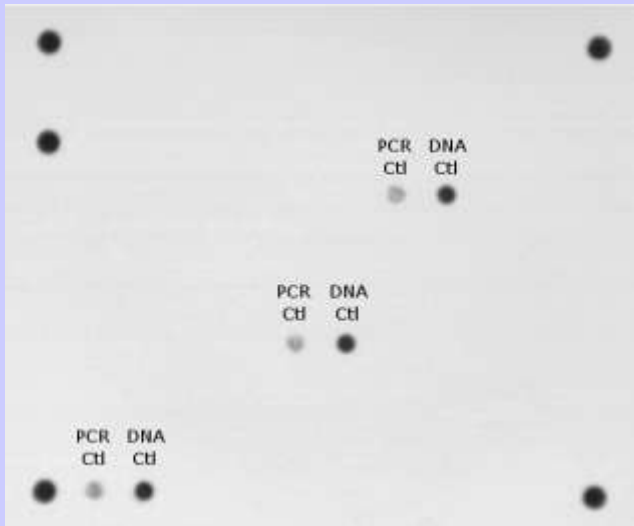


Επώαση με
σύμπλεγμα
Στρεπταβιδίνης-
Υπεροξειδάσης, το
οποίο συνθέεται με τη
βιοτίνη των
πολυμερισμένων
προϊόντων

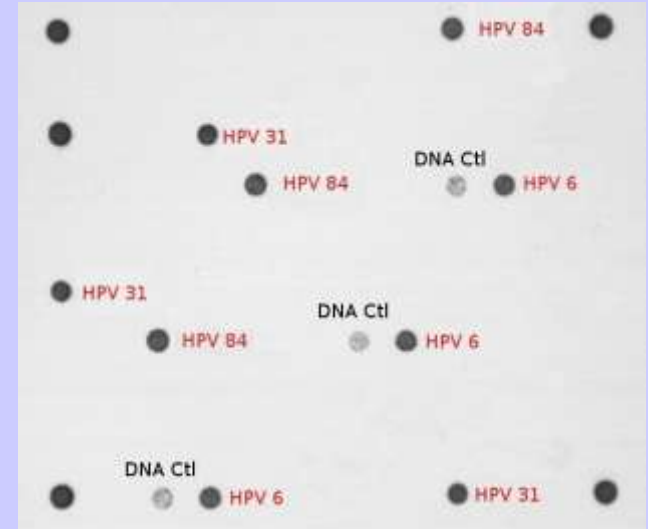


Με την παρουσία της
ένωσης
tramethylbenzidine
(TMB), η δράση της
Υπεροξειδάσης του
συμπλέγματος
προκαλεί εμφάνιση
αδιάλυτου προϊόντος,
το οποίο καθιζάνει στις
περιοχές υβριδισμού
της Μικροσυστοίχιας

Τυπικά Αποτελέσματα



Κλινικό δείγμα HPV (-)



Κλινικό δείγμα HPV6, 31, 84

Βελτιστοποίηση Τεχνικής

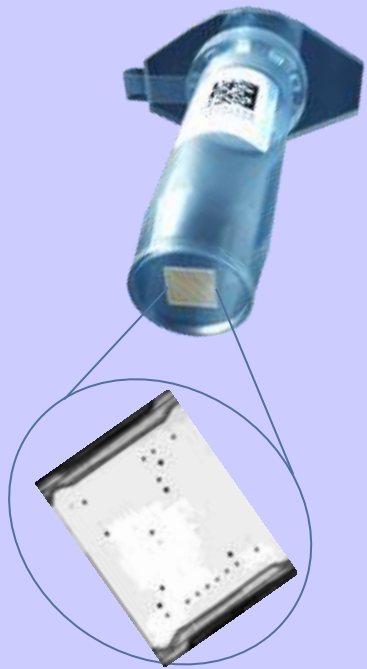
Δείγματα: Φτωχά σε κύτταρα, Αιματηρά, Βλέννη →

→ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΖΟΝΤΑΙ ξεχωριστά **ανάλογα** με τις ιδιαιτερότητές τους

Το ποσοστό των Ακατάλληλων δειγμάτων δεν ξεπερνάει το 3%

ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΙ ΔΙΑΣΦΑΛΙΣΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

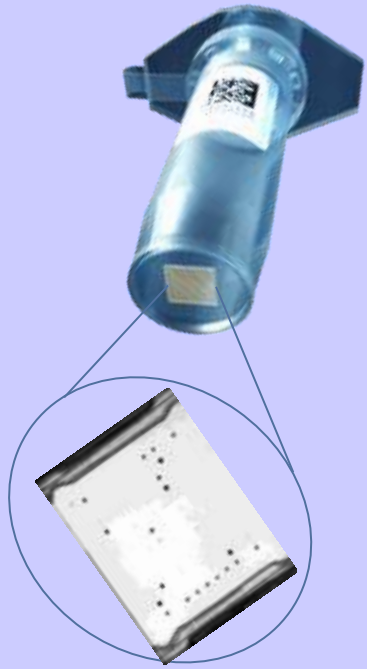
- Τέλος κάθε μήνα = τυχαιοποιημένη επανάληψη (10% των κλινικών δειγμάτων)
- Συνεργασία με το Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Συνεργασία με την κατασκευάστρια εταιρεία (Genomica, Spain)
- Συνεργασία με Πρότυπο Εργ. Αναφοράς (U.K) – (sequencing)



ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ¹

- 👍 Παρέχει γενωμική ταυτοποίηση για 35 τύπους HPV, με την μεγαλύτερη κλινική σημασία (όλων των HR & των περισσότερων LR)
- 👍 Διαχωρίζει την λοίμωξη σε Μονή ή/ & Πολλαπλή
- 👍 Διαθέτει γενωμικούς εσωτερικούς μάρτυρες ελέγχου, σε τριπλέτες
- 👍 Διαθέτει CE Mark για In Vitro Διάγνωση
- 👍 Διαγνωστική Ευαισθησία: 98.2%
- 👍 Διαγνωστική Ειδικότητα: 100%

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ²



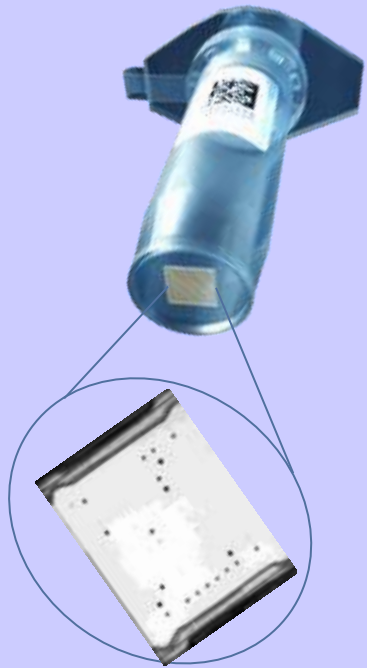
👍 Αντικειμενική Ερμηνεία &
Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων
→ Αυτόματη υπολογιστική
ανάλυση εικόνας

👍 Ταχεία: αποτελέσματα
διαθέσιμα σε 48 h

👍 Εύκολα εφαρμόσιμη στην
ρουτίνα νοσοκομειακών
εργαστηρίων



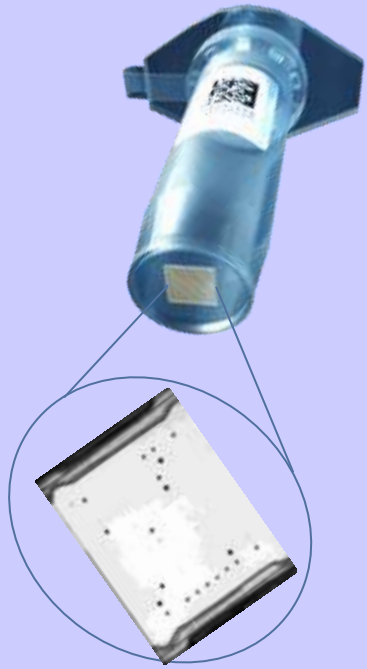
ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ³



- 👍 Αξιόπιστη, Επαναληψιμότητα
- 👍 Παρέχει τη δυνατότητα για Επιδημιολογικές Μελέτες (γεωγραφική επικράτηση,..)
- 👍 Παρακολούθηση της λοίμωξης: Παροδική/λανθάνουσα – Εκρίζωση, Υποτροπή – Παραμονή – Εξέλιξη νόσου
- 👍 Δημιουργία νέων Εμβολίων



ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑ



✎ Σχετικά νέο προϊόν (διεθνής εμπορική διάθεση 2006) – περιορισμένες Βιβλιογραφικές Αναφορές

ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ



BACK UP
SLIDES

TYPE	ONCOGENIC RISK*	TYPE	ONCOGENIC RISK*
HPV 6	Low risk	HPV 56	High risk
HPV 11	Low risk	HPV 58	High risk
HPV 16	High risk	HPV 59	High risk
HPV 18	High risk	HPV 61	Low risk
HPV 26	High risk	HPV 62	Low risk
HPV 31	High risk	HPV 66	High risk
HPV 33	High risk	HPV 68	High risk
HPV 35	High risk	HPV 70	High risk
HPV 39	High risk	HPV 71	Not classified
HPV 40	Low risk	HPV 72	Low risk
HPV 42	Low risk	HPV 73	High risk
HPV 43	Low risk	HPV 81	Low risk
HPV 44	Low risk	HPV 82	High risk
HPV 45	High risk	HPV 83	Low risk
HPV 51	High risk	HPV 84	Low risk
HPV 52	High risk	HPV 85	High risk
HPV 53	High risk	HPV 89	Low risk
HPV 54	Low risk		

*According to Dunne et al (2007).

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ

ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ /

ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

HPV GENOTYPE	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity	PPV	NPV
6	93,75	100	100	99,54
11	100,00	100	100	100,00
16	100,00	100	100	100,00
18	100,00	100	100	100,00
26	100,00	100	100	100,00
31	100,00	100	100	100,00
33	100,00	100	100	100,00
35	100,00	100	100	100,00
39	100,00	100	100	100,00
40	100,00	100	100	100,00
42	100,00	100	100	100,00
43	100,00	100	100	100,00
44	100,00	100	100	100,00
45	100,00	100	100	100,00
51	100,00	100	100	100,00
52	100,00	100	100	100,00
53	96,67	100	100	99,50
54	100,00	100	100	100,00
56	100,00	100	100	100,00
58	95,00	100	100	99,53
59	100,00	100	100	100,00
61	100,00	100	100	100,00
62	91,67	100	100	99,55
66	100,00	100	100	100,00
68	100,00	100	100	100,00
70	100,00	100	100	100,00
71	100,00	100	100	100,00
72	100,00	100	100	100,00
73	100,00	100	100	100,00
81	100,00	100	100	100,00
82	100,00	100	100	100,00
83	100,00	100	100	100,00
84	92,31	100	100	99,54
85	—	100	—	100,00
89	100,00	100	100	100,00

ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ

HPV GENOTYPE	10 ⁴ copies	10 ³ copies	10 ² copies	10 copies	1 copy
6			100%	<100%	
11			100%	<100%	
16				100%	<100%
18	100%	<100%			
31			100%	<100%	
33			100%	<100%	
35				100%	<100%
39				100%	<100%
45			100%	<100%	
51			100%	<100%	
52			100%	<100%	
56				100%	<100%
58				100%	<100%
59		100%	<100%		
68			100%	<100%	
73	100%	<100%			
82				100%	<100%

HPV DNA TESTS

Company	Trademark	DNA amplification	Nº of Subtypes	Reading	Amplified band (bp)
	Hybrid capture II	no	Only High/Low (13 / 5)	Light emisión	-
	Amplicor	Yes	Only High (13)	Colorimetric	170
	Linear Array	Yes	37	Visual/Subjective	450
	LIPA	Yes	25	Visual/Subjective	65
	ClinicalArrays®	Yes	35	Image analysis	450

Digene product

HYBRID CAPTURE

II



Format: plate

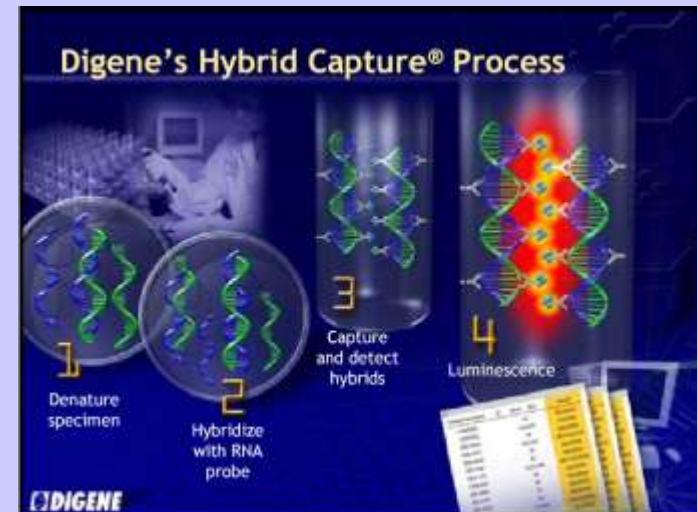


Advantages

- DNA amplification is not required
- Full automatization is available
- **FDA approval** can be an important psychological hurdle
- Good-enough sensibility

Disadvantages

- Lower specificity than competitors
- Low and high risk determinations are separated kits
- Actually, it does not offer an accurate genotyping
e.g. **Co-infections are not detected**
- HCII Consists of a cocktail of probes whose cross hybridization has been widely described in literature



INNOGENETICS product: LiPA

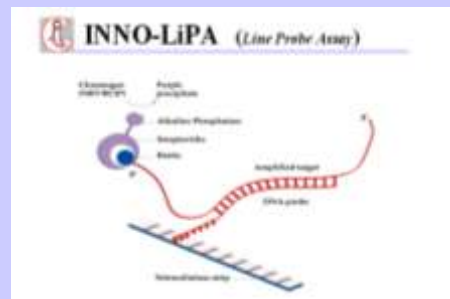
Format: Strip

Advantages

- It is more effective in degraded DNA from paraffin-embedded tissues samples
- Sensitive
- Hybridization and visualization processes are automatic (but no automatic result interpretation).
- 65 bp Amplicon
- CE MARK (Just Launched Sept'06)

Disadvantages

- Shorter number of subtypes (16) than other close competitors
- Not all the high risk subtypes are included
- Visual interpretation is subjective



ROCHE products (I): AMPLICOR

Format: Microwell plate



Advantages

- Sufficient sensitivity
- PGMY primers (degenerated primers) give a more efficient amplification
- 170 Bp band

Disadvantages

- Lower specificity than other competitors
- Low-risk genotyping is not available
- At present it does not offer an accurate genotyping, e.g. **Co-infections are not detected**



ROCHE products (II): LINEAR ARRAYS

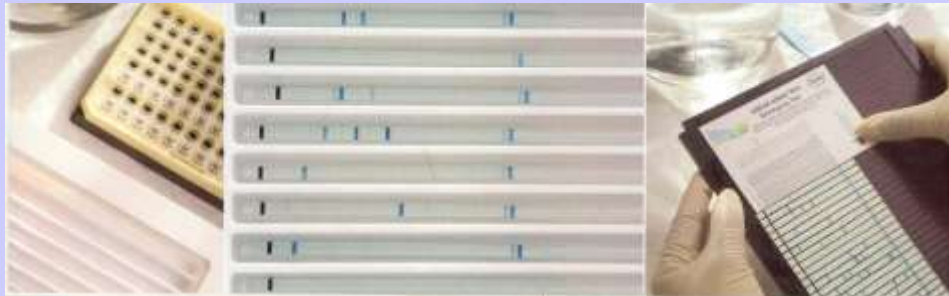
Format: Strip Advantages



- Largest number of genotypes
- Sensitive
- All high risk subtypes are included
- PGMY primers (degenerated primers) result in a more efficient amplification
- 450 Bp band

Disadvantages

- Visual interpretation is subjective. **User is responsible for interpreting results**
- **Handling is not so easy** as ClinicalArrays® HPV without a robotized device
- Non-defined **weak signals** result in difficult interpretation



ClinicalArrays®

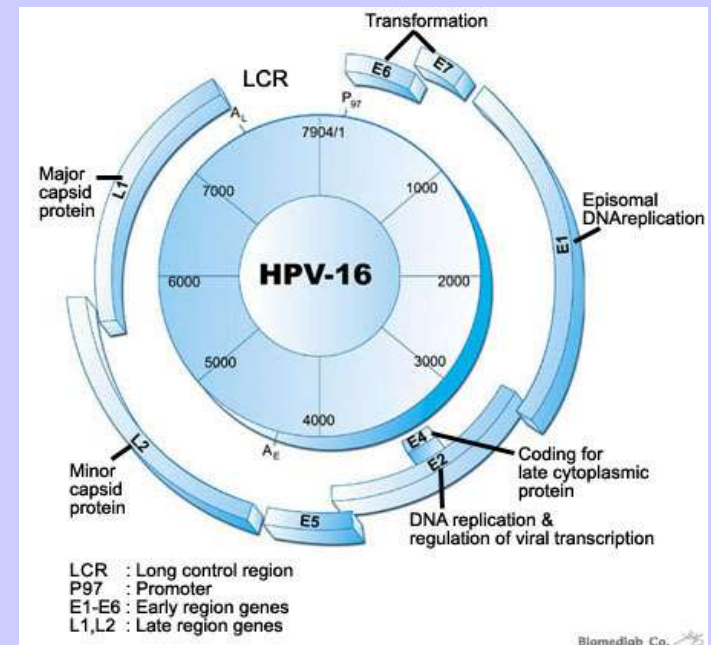
Papillomavirus

- **Format:** Microarray
- **Advantages**
 - No subjective interpretation : Automatic reading and IT interpretation of results.
 - User-friendly format
 - All high risk and the most prevalent genotypes are included
 - Genomic controls and probes in triplicate
 - First microarray in the market
 - 450bp = high specificity.
 - CE Mark for In Vitro Diagnostics
 - USB port connexion (printer, LIS, PenDrive..etc)
- **Disadvantages**
 - Relative new product in the market.



Ανίχνευση HPV DNA με τη χρήση της PCR

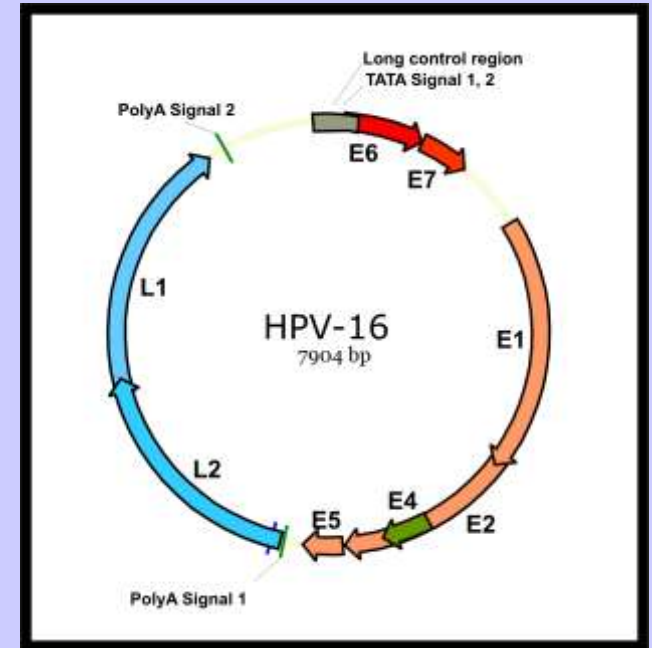
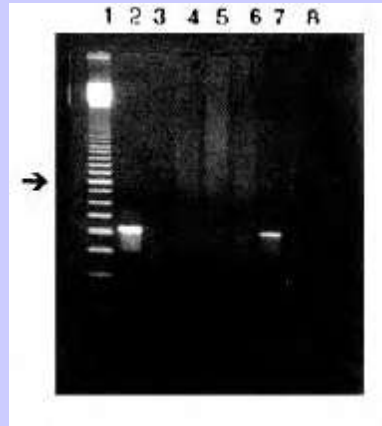
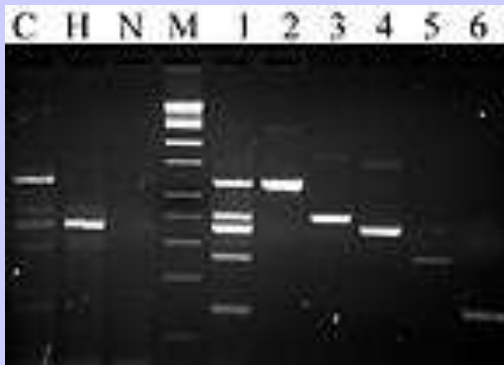
- ✓ Γενικούς εκκινήτες (consensus primers) $\Rightarrow$ L1 περιοχή
π.χ: MY09/11, PGMY09/11, GP5/GP6, GP5⁺/GP6⁺, SPF
 $\Rightarrow$ HPV DNA ? : ΝΑΙ - ΌΧΙ -
- ΙΣΩΣ
- ✓ Ειδικούς εκκινήτες για τον κάθε HPV τύπο (type specific)



Μειονεκτήματα:

- 👉 Υποκειμενική αξιολόγηση αποτελεσμάτων (οπτική)
- 👉 Δεν υπάρχει η δυνατότητα τυποποίησης
- 👉 Δεν υπάρχει η δυνατότητα διαχωρισμού της λοίμωξης σε Μονή ή/ & Πολλαπλή
- 👉 Υψηλό ποσοστό ψευδώς (-) & (+) δειγμάτων
- 👉 Συνδυασμός είναι χρονοβόρος, επίπονος & οικονομικά ασύμφορος

Gel Electrophoresis



ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ vs HPV DNA TEST

HPV DNA TEST

ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	ΘΕΤΙΚΟ
ΑΝΕΠΑΡΚΕΣ	50%	50%
ΑΡΝΗΤΙΚΟ	35,30%	64,70%
HPV ΥΠΟΠΤΟ	28,50%	71,50%
HPV	31%	69%
CIN I	9,30%	90,70%
CIN II		100%
CIN III		100%
ADENOCΑ		100%
SCC	25%	75%

ΣΥΜΦΩΝΙΑ : 79,6%

ΔΙΑΦΩΝΙΑ : 20,4%