

DESTINAZIONE D'USO: Il dispositivo Real HPV è un test "in vitro" che consente di verificare la presenza dei papillomavirus appartenenti al gruppo anogenitale, genotipi 6, 11, 13, 16, 18, 26, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 69, 70, 73 and 82, in estratti di DNA di campioni tampone vaginale e PAP smear, tramite la tecnica di amplificazione in Real Time PCR.

INTRODUZIONE E PRINCIPIO DEL METODO.

Il virus del papilloma rappresenta uno dei principali cofattori per lo sviluppo della patologia neoplastica della cervice uterina ed è stato identificato nella quasi totalità dei casi di tumore invasivo.

Con la denominazione HPV si comprende quindi una famiglia di virus di cui fino ad oggi si conoscono circa 130 sottotipi. Grazie all'avvento di metodiche di ibridizzazione molecolare è stato possibile identificare la presenza del DNA virale a livello delle cellule che ricoprono la superficie della cervice uterina ed individuare sottotipi a basso, intermedio, ed alto rischio oncogeno in rapporto alla frequenza di associazione con il CIN (acronimo anglosassone di Neoplasia Cervicale Intraepiteliale) che comprende tutte quelle anomalie cellulari ed epiteliali per cui si realizza la graduale proliferazione di cellule atipiche che presentano una variabile potenzialità evolutiva verso il carcinoma invasivo della cervice uterina (CIN I, CIN II, CIN III). Negli ultimi 30 anni accanto alla riduzione dell'incidenza della neoplasia cervicale grazie ai programmi di screening, si è contemporaneamente verificato un aumento dell'incidenza delle lesioni preneoplastiche; infatti il fine dei programmi di screening è quello di identificare i precursori (CIN II-III) dei tumori del collo dell'utero per prevenirne l'eventuale progressione.

E' stato altresì dimostrato come la persistenza dell'infezione sia una condizione necessaria per il processo di carcinogenesi cervicale cosa questa che ha completamente rivoluzionato gli approcci allo screening e alla prevenzione; è ovvio infatti che l'assenza dell'infezione significhi un trascurabile rischio di ammalarsi di carcinoma del collo dell'utero.

La maggior parte delle giovani donne si infetta con l'HPV entro pochi anni dai primi rapporti sessuali; l'infezione è normalmente transitoria e clinicamente non significativa, sebbene possa produrre temporanee alterazioni nel pap test.

L'aumento della sensibilità ottenuta con l'uso di questi due test usati insieme (pap test ed HPV-DNA test) permetterà di allungare i tempi di screening consentendo quindi il passaggio da un controllo annuale ad un controllo triennale.

Il Real HPV è stato studiato per consentire la ricerca di HPV, con l'utilizzo di una coppia di primers omologhi per la regione LI che producono un frammento biotinilato di 150bp, nella reazione d'amplificazione.

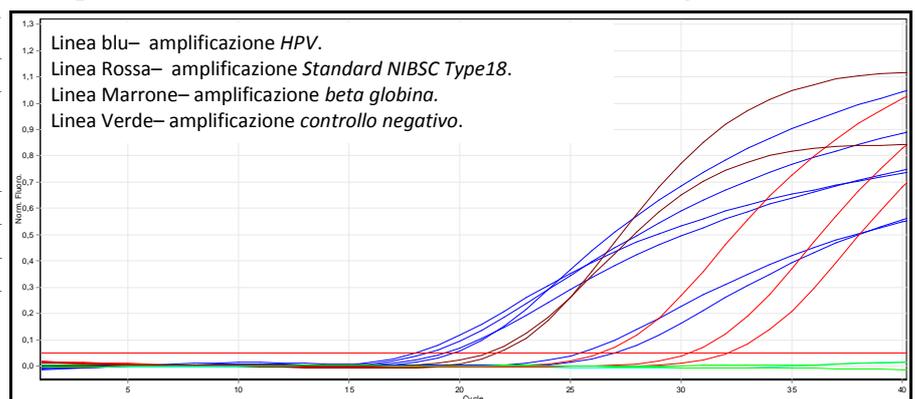
Per le verifiche della quantità di DNA estratto e il controllo della inibizione della reazione d'amplificazione, si utilizza una coppia di primers che amplificano, nella stessa seduta analitica, un frammento del gene della *beta globina*.



La tecnica della Real Time PCR permette la rivelazione del template durante la sua formazione ad ogni ciclo di temperatura del protocollo programmato. Ciò avviene in quanto un intercalante fluorescente (Eva Green) del doppio filamento di DNA è un componente della mix di reazione. Eccitando la mix a 490 nm, l'intercalante emette un segnale fluorescente a 530 nm che una CCD camera acquisisce durante lo step di lettura, attribuito nel protocollo termico. L'inizio di acquisizione del segnale a 72°C è stato

selezionato onde poter evitare la rivelazione di segnali fluorescenti aspecifici generati dalla formazione di dimeri prodotti dai Primers.

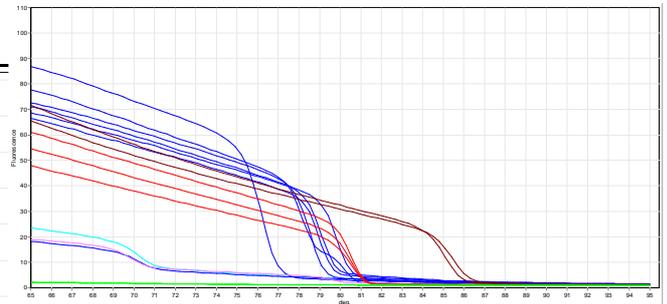
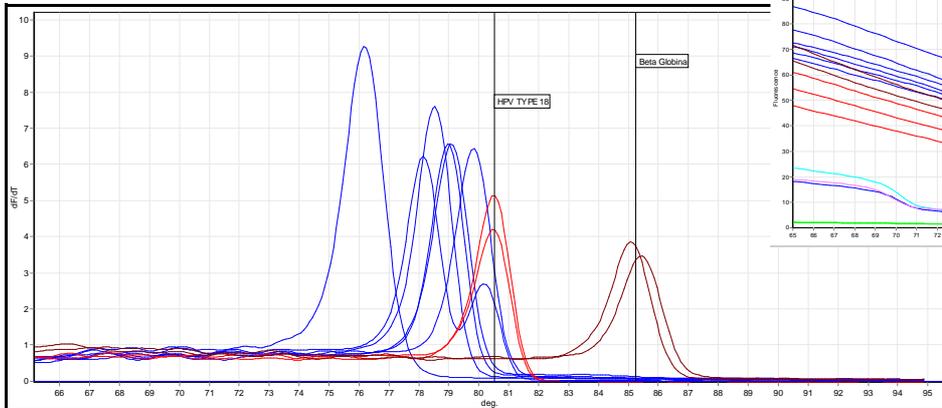
Al termine del protocollo termico il software d'acquisizione e calcolo, del sistema di Real Time PCR, elabora i valori di Threshold Cycle (TC) per ogni template.



VERIFICA DELLA SPECIFICITA' ANALITICA

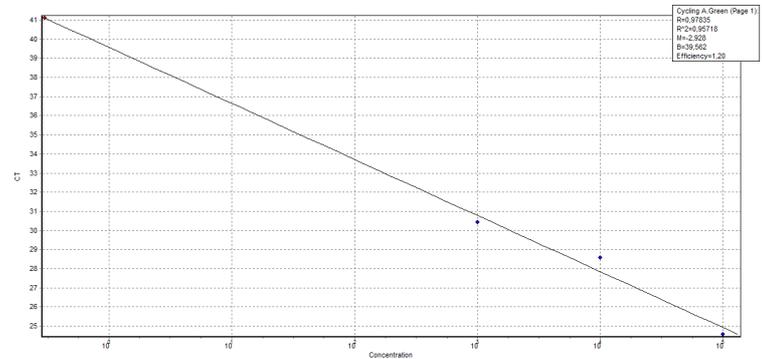
All'ultimo step del programma del termociclatore, è eseguita la curva di dissociazione applicando un gradiente di temperatura da 65°C a 95°C in 15 minuti e registrando la fluorescenza dei campioni in analisi. Il software visualizza la curva di fluorescenza e la sua derivata prima.

Ai fini della validazione dei risultati si rende necessario verificare la presenza di un picco di dissociazione, specifico per HPV, in un range di temperature che può variare tra 72°C e 83°C, in funzione del genotipo virale e la presenza del picco di dissociazione della *Beta globina* a 85.0°C ± 1,0°C



SENSIBILITA' ANALITICA. La sensibilità analitica è stata determinata mediante diluizioni seriali del 1st WHO International Standard for Human Papillomavirus (HPV) - Type 18 DNA, in un range lineare compreso tra 100.000 e 1.000 UI/ml.

SPECIFICITA'. Il Real HPV ha mostrato una specificità del 100% per i seguenti genotipi virali: 6, 11, 13, 16, 18, 26, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 69, 70, 73 and 82.



COMPATIBILITA' CON I DISPOSITIVI DI GENOTIPIZZAZIONE.

Il prodotto d'amplificazione biotinilato è costituito da un frammento di circa 150 bp della regione L1 del genoma virale di HPV, questa caratteristica consente d'eseguire il test di genotipizzazione con dispositivi di tipizzazione in reverse line blot.

GD 308A REAL HPV



APPLICABILITÀ	DNA virale estratto e purificato da tamponi vaginali e PAP smear.
VOLUME DEL CAMPIONE	L'amplificazione richiede un minimo di 10 µl d'estratto.
NUMERO DI TEST	50 reazioni per HPV e 50 reazioni per <i>Beta globina</i>
SENSIBILITÀ	1.000 UI/ml determinata con 1st WHO International Standard for Human Papillomavirus (HPV) - Type 18 DNA
SPECIFICITA'	Genotipi: 6, 11, 13, 16, 18, 26, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 69, 70, 73 and 82.
CONSERVAZIONE	a -20°C (spedizione refrigerata)
STABILITÀ	Superiore a 12 mesi se correttamente conservato.