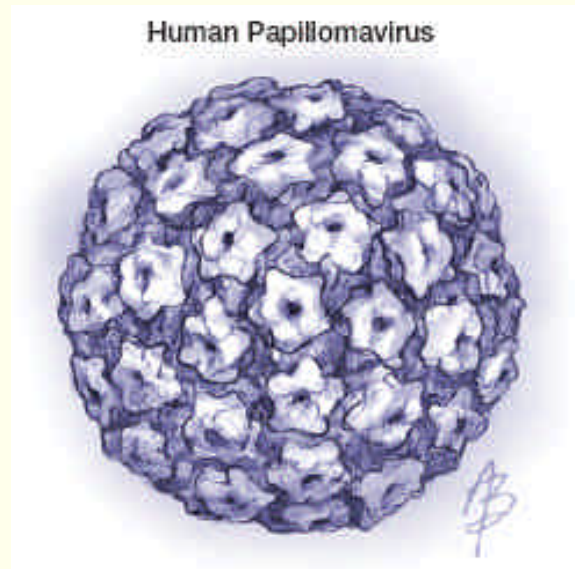


Múltiplex fluorescente PCR (*f*-HPV typing)



M.Paz Cañadas Castillo

**Dpto. Biología Molecular. GENERAL LAB
Laboratorio de retrovirología. IRSI CAIXA.
Hospital Germans Trias i Pujol. Barcelona
bmol@general-lab.com**

Múltiplex fluorescente PCR (*f*-HPV typing) para la detección y genotipado del Virus del Papiloma Humano

Amplifica en la región E6/E7

- E6 y E7 son retenidos después de la infección, no así E2 o L1.
- Zona fuertemente conservada presentando una uniformidad de la secuencia para cada tipo específico.
- Diferencias entre tipos de bajo/alto riesgo.

Múltiplex fluorescente PCR (*f*-HPV typing) para la detección y genotipado del Virus del Papiloma Humano

Primers fluorescentes

- Permite PCR múltiplex (tamaño y color) → Infección múltiple
- Detección mediante análisis de fragmentos en un secuenciador
- Elevada sensibilidad
- Fácil de interpretar y objetiva.

Múltiplex fluorescente PCR (*f*-HPV typing) para la detección y genotipado del Virus del Papiloma Humano

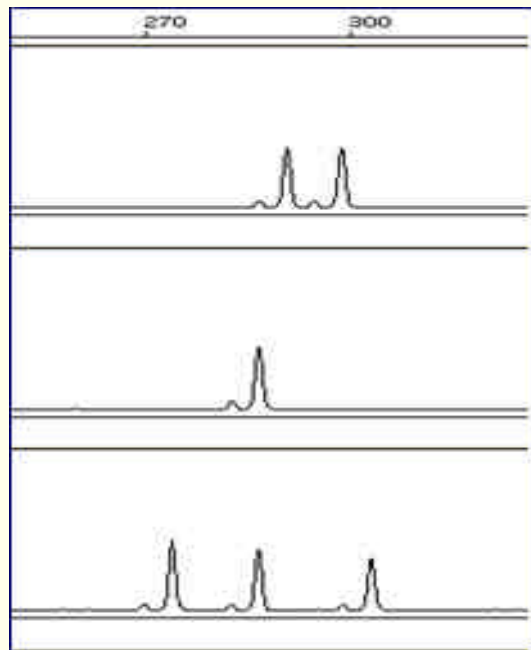
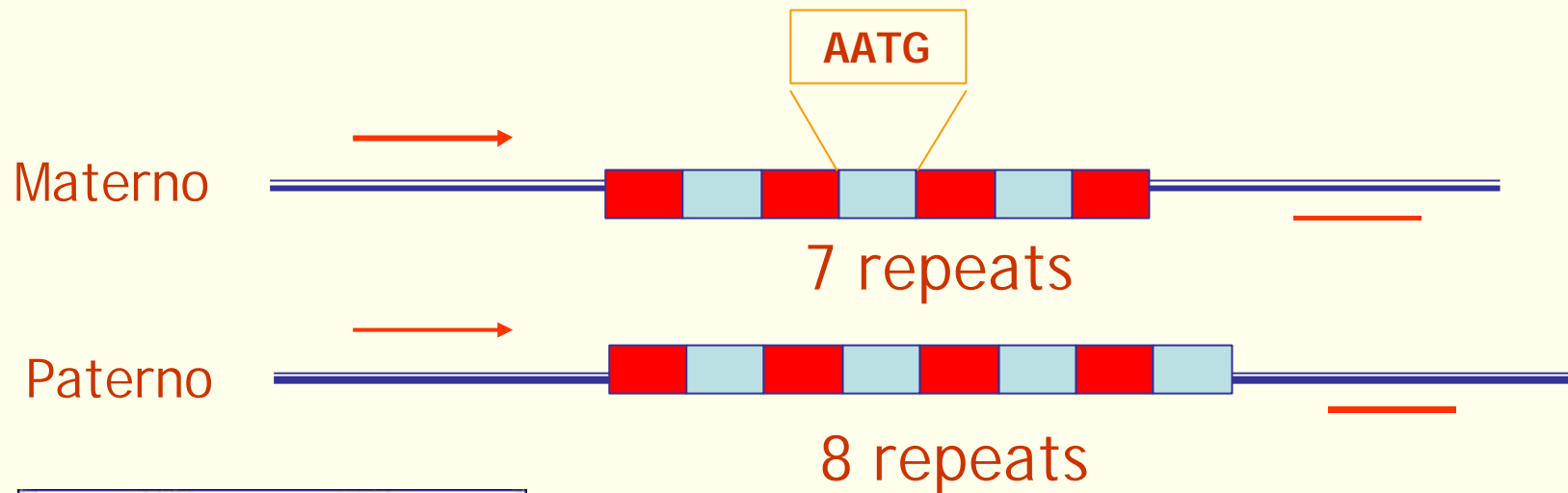
Control interno

- Control de DNA
- Control de inhibición de la PCR
- Control de contaminación entre muestras.



Primers diseñados en secuencias STRs en el cromosoma 18

Control interno: Short Tandem Repeats (STRs)



Dos Alelos de tamaño distinto que se pueden separar

Dos Alelos del mismo tamaño

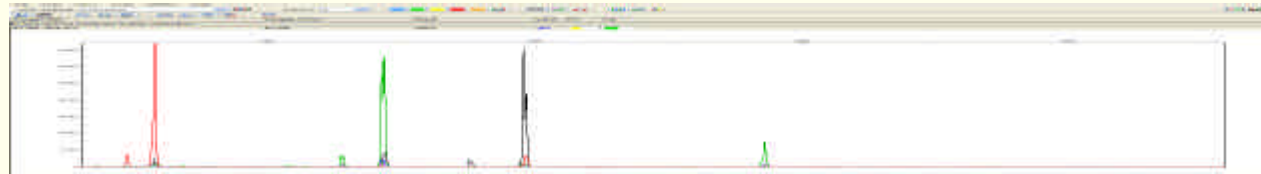
Tres alelos de diferentes tamaños

FLUJO DE TRABAJO

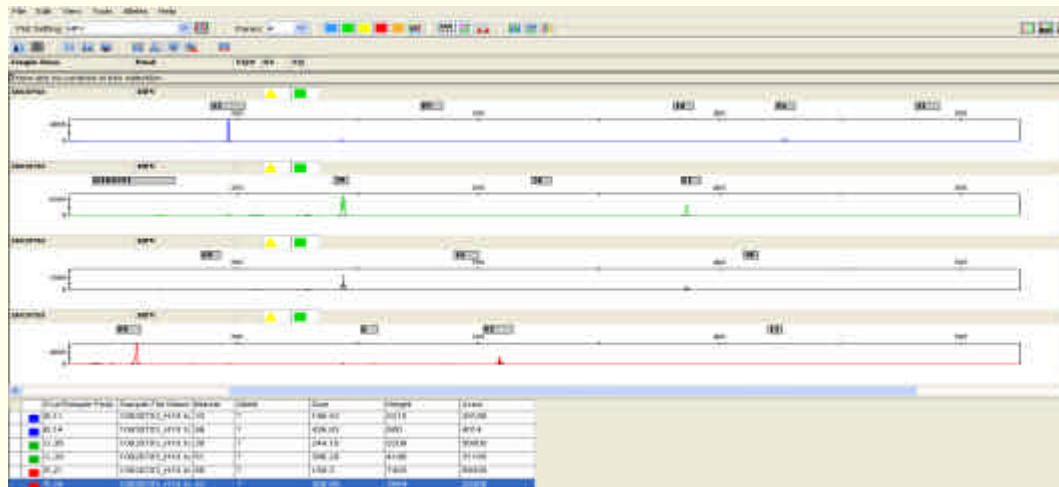
Añadir el DNA al f-HPV Master Mix y amplificar.



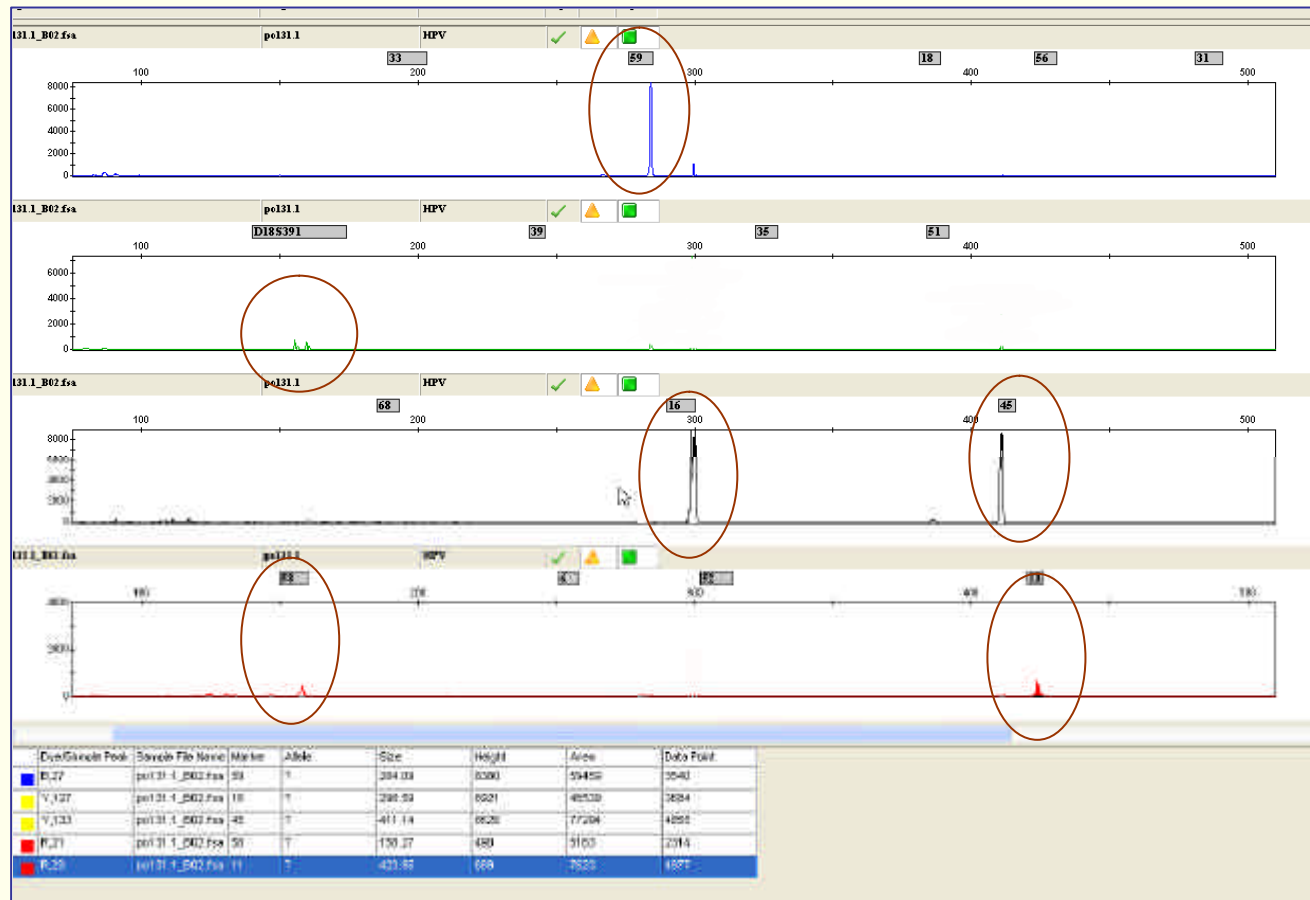
Cargar el producto en el DNA secuenciador.



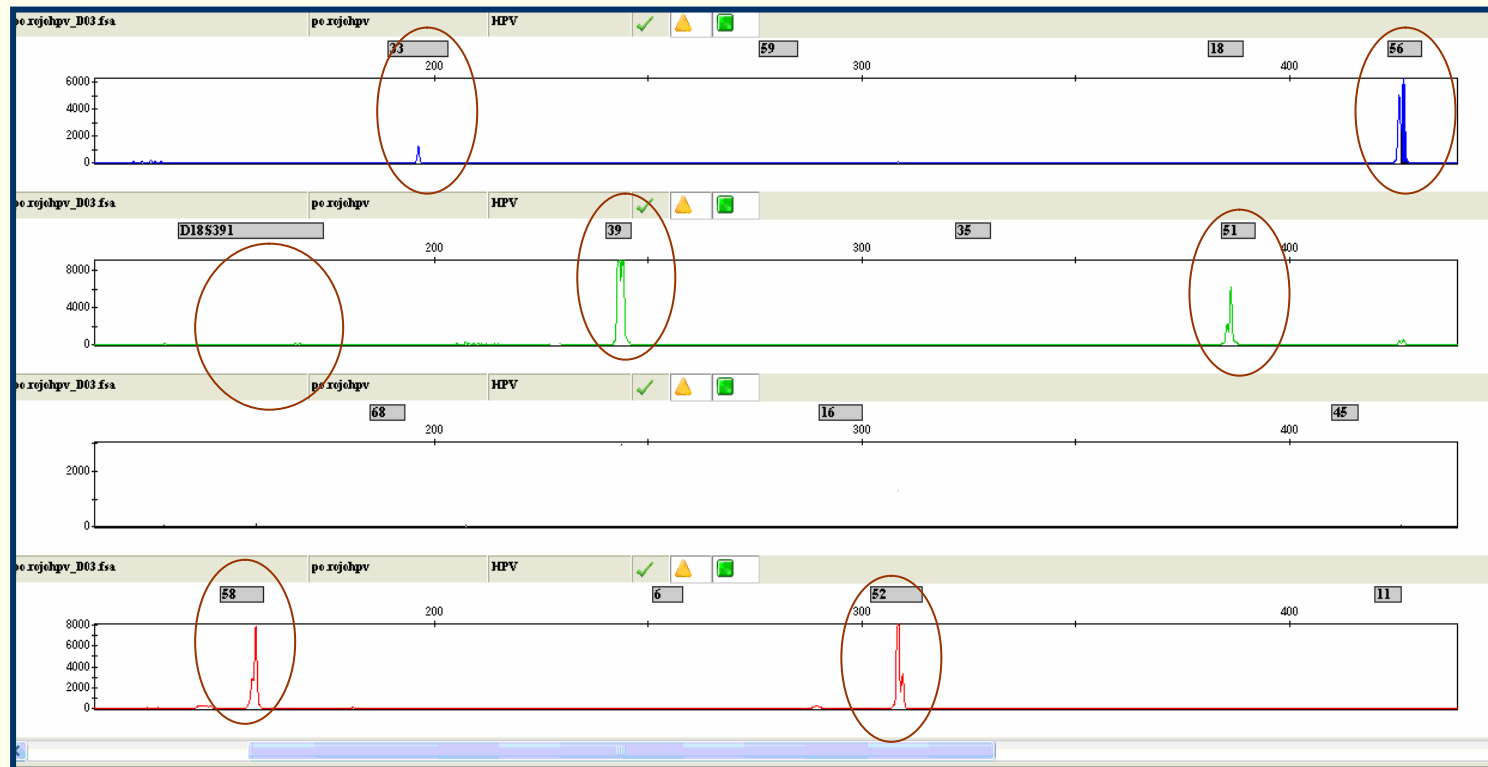
Análisis del resultado.



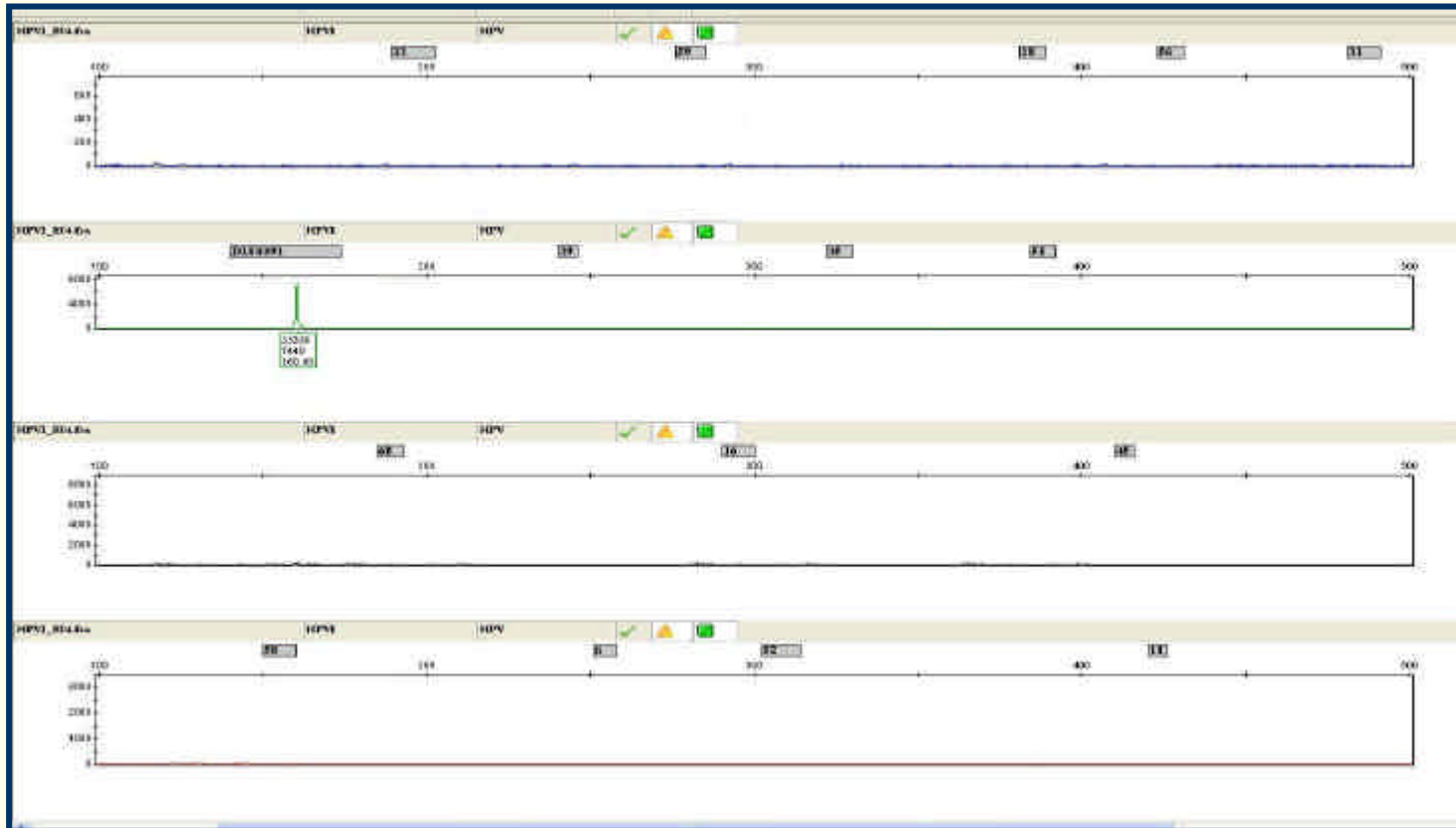
Múltiplex fluorescente PCR (*f*-HPV typing) para la detección y genotipado del Virus del Papiloma Humano



Múltiplex fluorescente PCR (*f*-HPV typing) para la detección y genotipado del Virus del Papiloma Humano



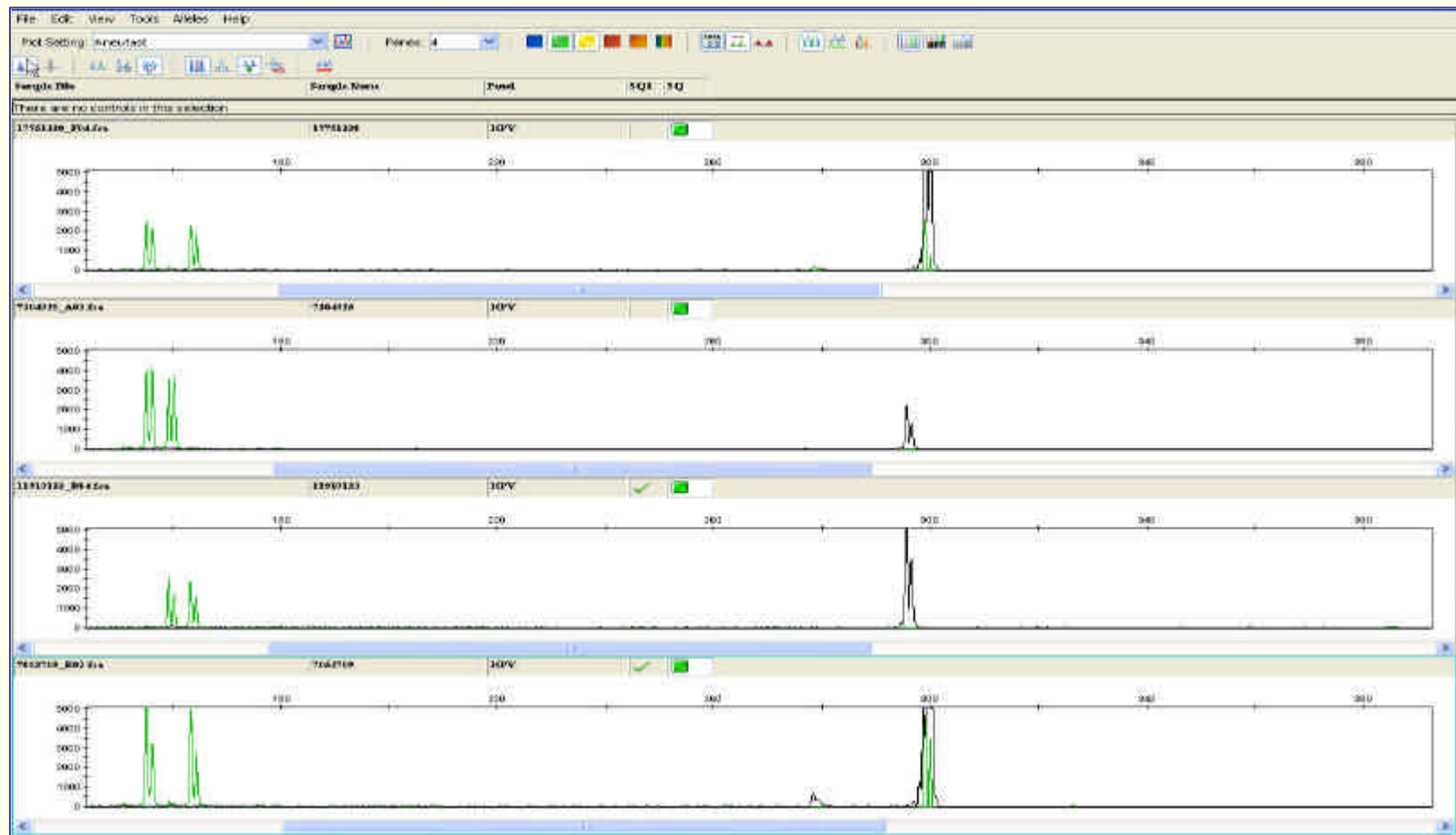
Múltiplex fluorescente PCR (*f*-HPV typing) para la detección y genotipado del Virus del Papiloma Humano



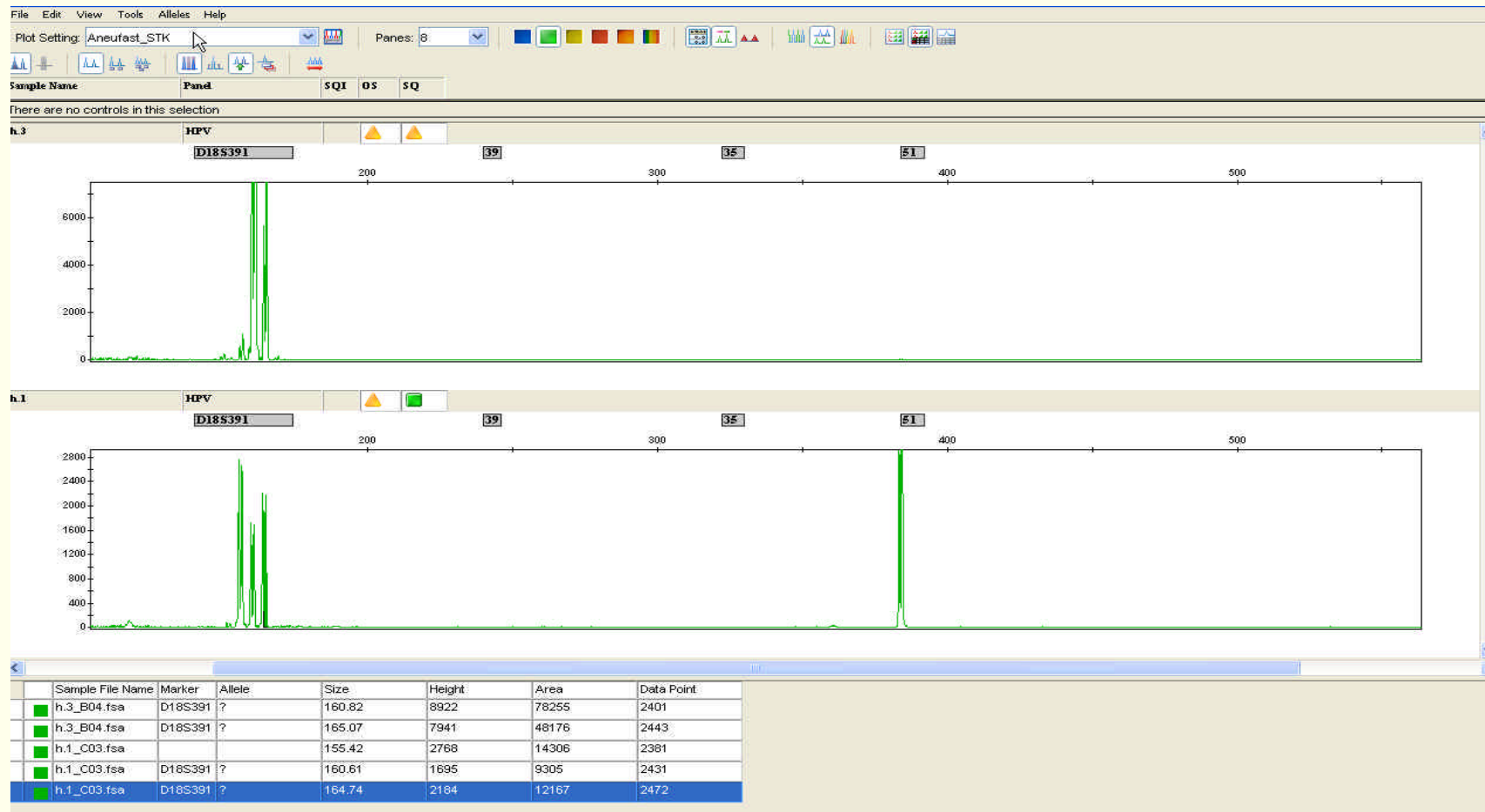
Múltiplex fluorescente PCR (*f*-HPV typing) para la detección y genotipado del Virus del Papiloma Humano



Múltiplex fluorescente PCR (*f*-HPV typing) para la detección y genotipado del Virus del Papiloma Humano



Múltiplex fluorescente PCR (*f*-HPV typing) para la detección y genotipado del Virus del Papiloma Humano



Tipos de muestras

- Captura de Híbridos

Epidemiological Data of Different Human Papillomavirus Genotypes in Cervical Specimens of HIV-1-Infected Women Without History of Cervical Pathology

J Acquir Immune Defic Syndr • Volume 50, Number 2, February 1, 2009

- Citología líquida
- Escobillón seco

HIGH PREVALENCE OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS INFECTION IN THE ANUS, PENIS AND MOUTH IN HIV-POSITIVE MEN.

[AIDS](#), 2006 May 12;20(8):1201-4.

- Plasma

Fatal Fast-Evolution of Nasopharyngeal Squamous Cell Carcinoma in an HIV Patient with EBV and HPV (-16 AND -33) in Blood Serum

The Open AIDS Journal, 2008, 2, 1-2

Extracción de ADN de muestras parafinadas

- Desparafinar + PK+ Purificación
- PK+automatización (maxwell)
 - . Fácil
 - . Rápido
 - . DNA de calidad
 - . Sistema pequeño



Resultados de f-HPV en muestras cervicales respecto a la citología

Resultado Histológico (No)	HPV negativo No(%)	L.R. Positivo No(%)	H.R. Positivo No(%)
ASCUS (102)	25 (25%)	34 (33.%)	43 (42%)
HPV (1033)	300 (29%)	383 (37%)	350 (34%)
CIN I (466)	105 (22%)	127(27%)	234 (51%)
CIN II (146)	10 (7%)	21 (14%)	116 (80%)
CIN III (86)	1 (1%)	3 (3%)	84 (97%)
Carcinoma escamoso (120)	2 (1.7%)	0	118 (98.3%)
Adenocarcinoma (25)	0	0	25 (100%)

Comparison of MY09/11 consensus PCR and type-specific PCRs in the detection of oncogenic HPV types

C. E. Depuydt ^{# a}, G. A. V. Boulet ^{# b *}, C. A. J. Horvath ^b, I. H. Benoy ^a,
A. J. Vereecken ^a, J. J. Bogers ^{a, b}

^a Laboratory for Clinical Pathology (Labo Lokeren, campus RIATOL), Antwerp, Belgium

^b Applied Molecular Biology Research (AMBIOR) group, Laboratory for Cell Biology and Histology, University of Antwerp, Antwerp, Belgium

J. Cell. Mol. Med. Vol 11, No 4, 2007 pp. 881-891

The causal relationship between persistent infection with high-risk HPV and cervical cancer has resulted in the development of HPV DNA detection systems. The widely used MY09/11 consensus PCR targets a 450bp conserved sequence in the HPV L1 gene, and can therefore amplify a broad spectrum of HPV types. However, limitations of these consensus primers are evident, particularly in regard to the variability in detection sensitivity among different HPV types. This study compared MY09/11 PCR with type-specific PCRs in the detection of oncogenic HPV types. The study population comprised 15,774 patients. Consensus PCR failed to detect 522 (10.9%) HPV infections indicated by type-specific PCRs. A significant correlation between failure of consensus PCR and HPV type was found. HPV types 51, 68 and 45 were missed most frequently. The clinical relevance of the HPV infections missed by MY09/11 PCR was reflected in the fraction of cases with cytological abnormalities and in follow-up, showing 104 (25.4%) CIN2+ cases. The MY09/11 false negativity could be the result of poor sensitivity, mismatch of MY09/11 primers or disruption of L1 target by HPV integration or DNA degradation. Furthermore, MY09/11 PCR lacked specificity for oncogenic HPVs. Diagnostic accuracy of the PCR systems, in terms of sensitivity (MY09/11 PCR: 87.9%; type-specific PCRs: 98.3%) and specificity (MY09/11 PCR: 38.7%; type-specific PCRs: 76.14%), and predictive values for histologically confirmed CIN2+, suggest that type-specific PCRs could be used in a clinical setting as a reliable screening tool.

Table 3 Results of MY09/11 consensus PCR and type-specific PCRs and overview of follow-up for different cytological groups

MY09/11 PCR Type-specific PCRs HPV	+				-				+				-			
	HR-HPV				HR-HPV				HPV X				Negative			
Initial diagnosis	N	Follow-up		CIN2+ n	n	Follow-up		CIN2+ n	n	Follow-up		CIN2+ n	N	Follow-up		CIN2+ n
		%	n			%	n			%	n					
Squamous lesions																
Negative	401	11.2	367	80	42	8.6	34	6	1,776	28.9	1,349	0	2,142	38.6	1,626	1
ASC-US	1,217	33.8	1,069	173	186	37.9	142	24	2,965	48.3	2,253	2	2,861	51.6	2,166	0
ASC-H	93	2.6	81	17	25	5.1	23	8	139	2.3	107	0	62	1.1	49	1
L-SIL	1,418	39.4	1,357	265	170	34.6	142	20	995	16.2	762	2	251	4.5	193	1
H-SIL	427	11.9	356	236	54	11.0	54	40	107	1.7	86	7	17	0.3	16	1
Glandular lesions																
AGC	40	1.1	18	0	14	2.9	14	6	159	2.6	122	0	213	3.8	164	0
Total	3,596	100	3,248	771	491	100	409	104	6,141	100	4,679	11	5,546	100	4,214	4
Follow-up		%		90.3		%		83.3		%		76.2		%		76.0
CIN2+		%		23.7		%		25.4		%		0.2		%		0.1

Conclusión

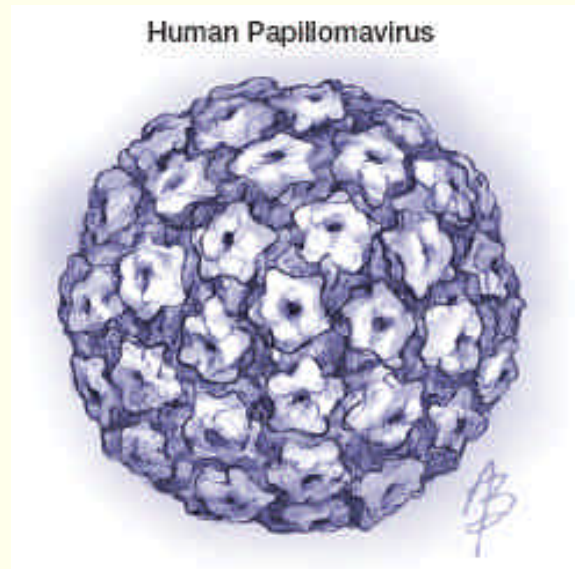
- Conocer el tipo específico de HPV es de gran valor para conocer la fuente de las infecciones.



Hecho indiscutible. Sin tipaje no hablaríamos de la importancia de la persistencia de tipo específico como marcador de progresión de las lesiones.

- Por lo tanto, puede ser considerado una herramienta indispensable para monitorizar el impacto de la vacunación en el riesgo de la adquisición de tipos de HPV individuales.

Múltiplex fluorescente PCR (*f*-HPV typing)



M.Paz Cañadas Castillo

**Dpto. Biología Molecular. GENERAL LAB
Laboratorio de retrovirología. IRSI CAIXA.
Hospital Germans Trias i Pujol. Barcelona
bmol@general-lab.com**