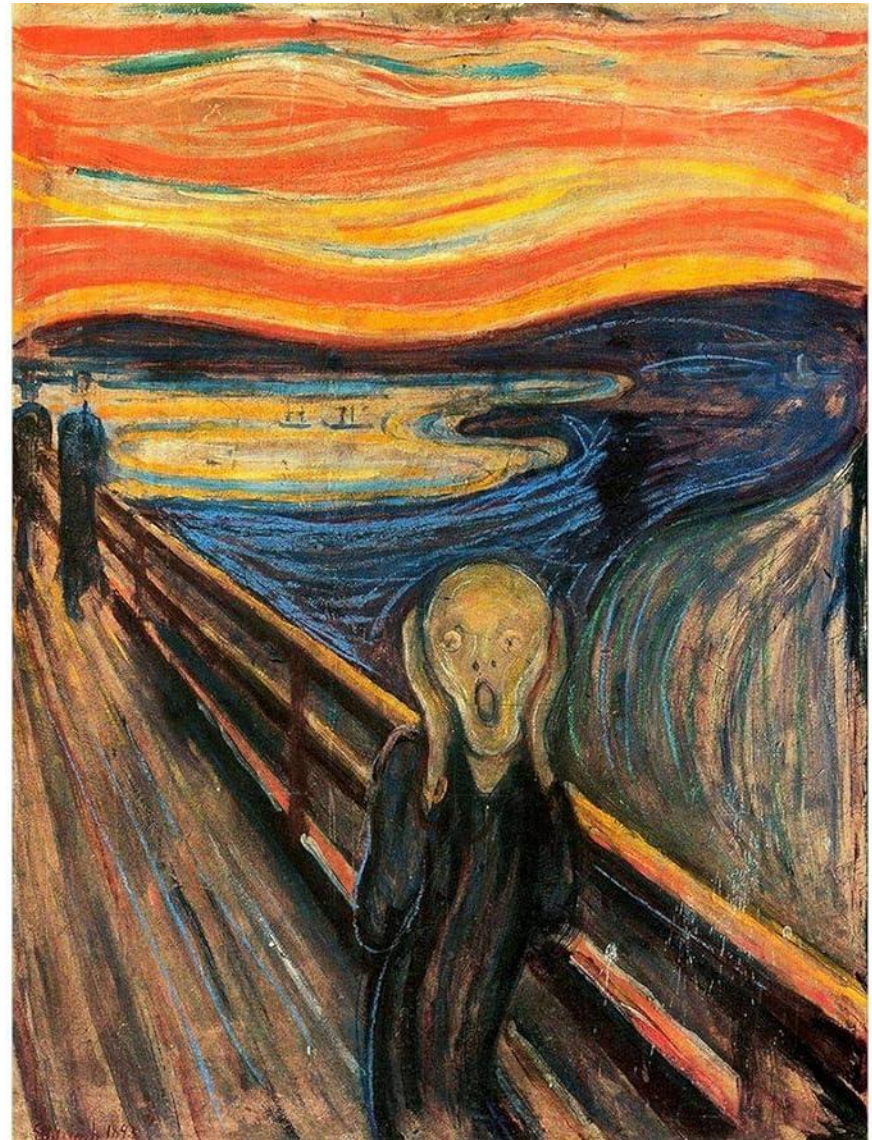
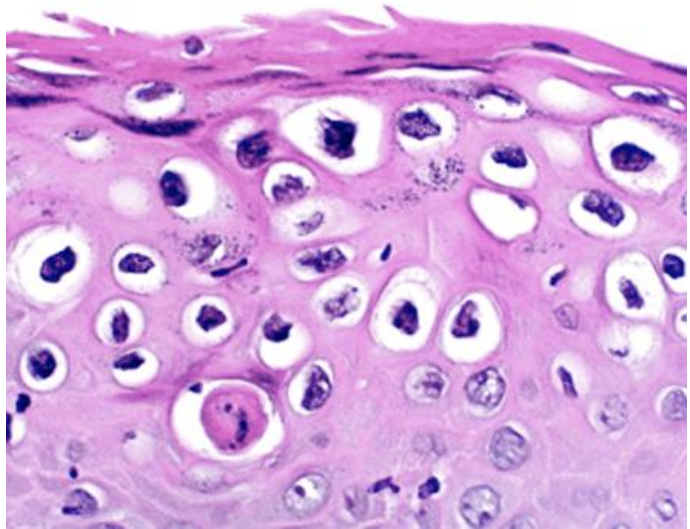
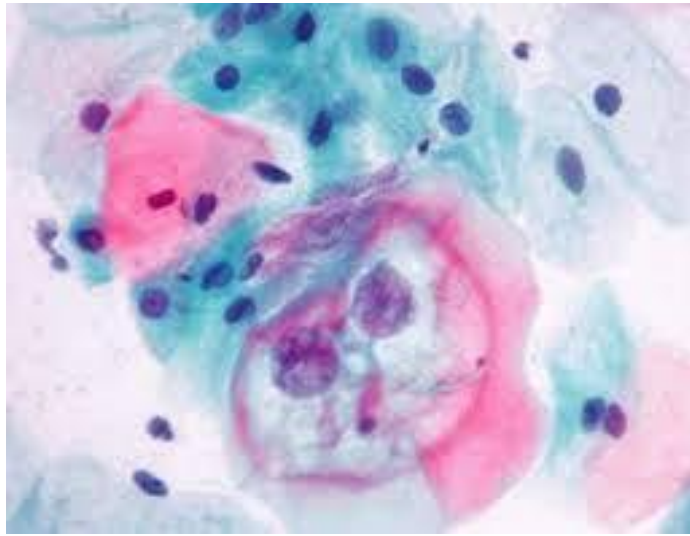


Genotipado de HPV

Aspectos técnicos

119º REUNIÓN DE LA ASOCIACIÓN TERRITORIAL VALENCIANA DE LA SOCIEDAD
ESPAÑOLA DE ANATOMÍA PATOLÓGICA
Valencia, 22 de marzo de 2024

Silvia Tena Solsona (TEAP)
Hospital Vithas Castellón



PROCEDIMIENTO

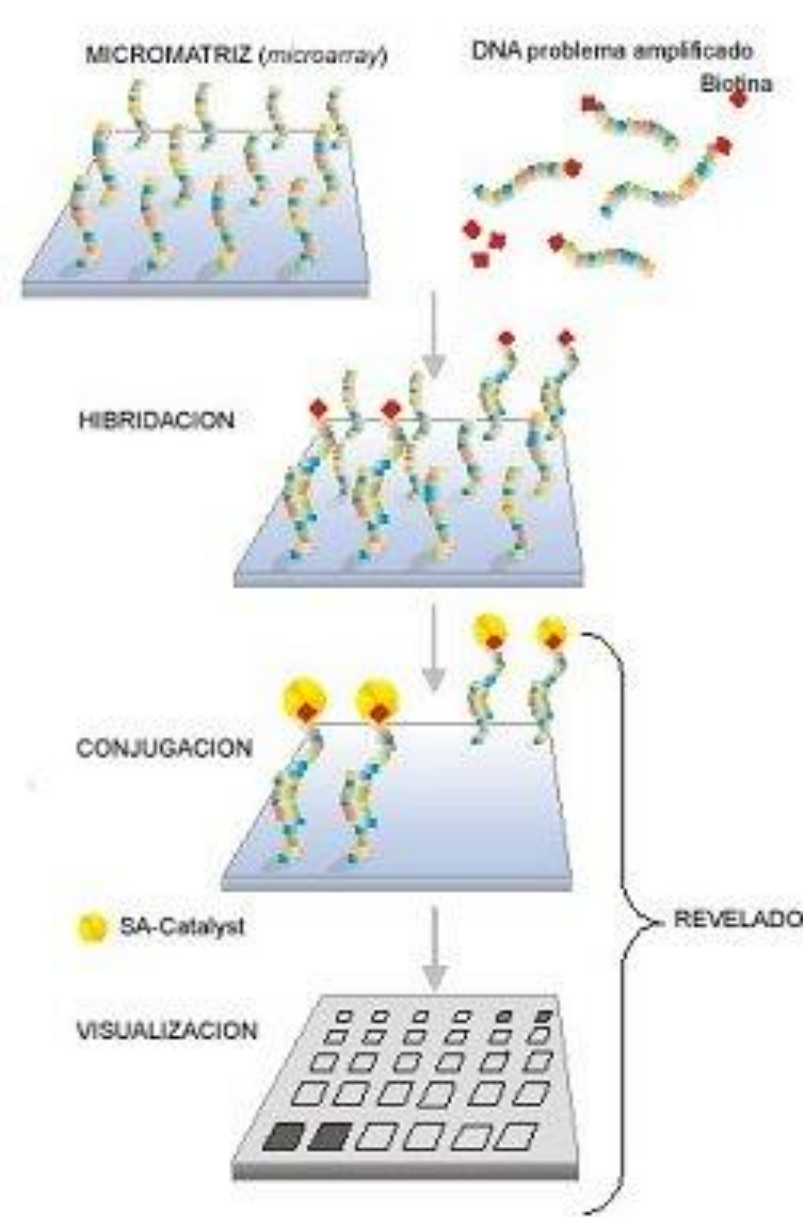
- PCR (Fotocopiadora biológica: se obtienen millones de copias a partir de unas pocas moléculas de ADN)

AMPLIFICACIÓN de fragmentos específicos del genoma vírico.

DESNATURALIZACIÓN: Separación de las dos hebras de ácido nucleico diana.

- HIBRIDACIÓN:

Hibridación de ácidos nucleicos con sondas específicas para cada tipo de HPV.



Las sondas, inmovilizadas sobre la superficie, capturan sus productos amplificados complementarios marcados con biotina. A través de la biotina se une el conjugado, produce un precipitado sobre la zona en la que se produce la hibridación.

TECNICA DE DETECCION DE HPV (VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO) Y GENOTIPADO

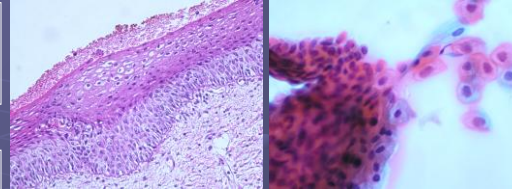
Silvia Tena Solsona, Elena Gonzalez Prats
Departamento de Anatomía Patológica
Hospital Rey Don Jaime Castellón



INTRODUCCIÓN

Actualmente está demostrado que algunos tipos de HPV están relacionados con el carcinoma de cérvix y otros tumores del tracto anogenital masculino y femenino.

Se han identificado más de 100 diferentes tipos de HPV, pudiéndose clasificar como de alto y bajo riesgo de padecer cáncer de cérvix.



OBJETIVO

La técnica que nosotros realizamos en nuestro hospital, mediante amplificación genómica, detectamos 35 virus (genotipos) de mayor importancia clínica y se clasifican:

ALTO RIESGO: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82

BAJO RIESGO: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81

RIESGO INDETERMINADO: 62, 71, 83, 84, 85, 89

Los tipos de muestras con las que podemos trabajar:

- Citología líquida (en nuestro hospital no la realizamos)
- Torunda
- Tejido incluido en parafina

MATERIAL Y MÉTODO

Termociclador también conocido como **máquina de PCR** permite realizar los ciclos de temperaturas necesarios para una **reacción en cadena de la polimerasa** de amplificación de **ADN**. Utilizamos ciclos de 94° para desnaturalización; 55° para hibridación de los primers; y 72° para extensión.

La detección se realiza mediante amplificación con PCR de un segmento del genoma de Papilomavirus (HPV) de 450 pares de bases localizado en la región L1 del virus.

El producto amplificado se hibrida posteriormente con sondas de captura específicas para cada tipo vírico.



RESULTADOS

Nuestra experiencia de un año de trabajo con la técnica de detección de HPV, no ofrecen duda en cuanto a la elección de este método de tipificación genómica del Papilomavirus.

Nuestros resultados durante este año sobre 277 muestras estudiadas:

- 140 negativos para todos los tipos estudiados (50%).
- 10 el control de DNA ha resultado negativo, por lo que la muestra no resulta valorable.
- 127 positivos para HPV, de estos:
 - 78 han dado un tipo positivo
 - 26 han dado dos tipos positivos
 - 15 han dado 3 tipos positivos
 - 4 han dado 4 tipos positivos
 - 3 han dado 5 tipos positivos
 - 1 han dado 6 tipos positivos

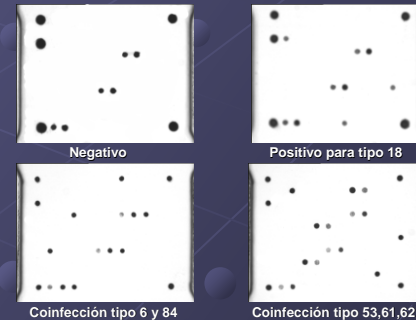
CONCLUSIONES

• La mayor parte de los positivos que tenemos son de alto riesgo, se debe a que el microarray contiene más sondas específicas correspondientes a virus de alto riesgo que de medio y bajo riesgo juntos, el que más frecuentemente infecta es el tipo 16.

• Lo ideal son las muestras tomadas con torunda, ya que dan menos problemas con respecto a los controles de DNA. Las muestras en bloques de parafina dan más resultados no valorables.

• Si la muestra es de varón tenemos más probabilidades que a la hora de la lectura nos de que no reconozca DNA. Probablemente por que las células de cérvix descaman mejor que las de glande.

• Nuestra elevada tasa de coinfección indica lo adecuado de un método de hibridación múltiple frente a los métodos de fragmentación del amplificado con enzimas de restricción que tienen problemas para la detección de coinfecciones.



VI Congreso Nacional de la Federación
Estatad de Técnicos Superiores Sanitarios
Barcelona, mayo de 2009

MUESTRAS

- Frotis en torundas

Torunda seca y estéril de algodón.

Conservar a 4°C (-7 días) o a -20°C (+7 días).

- Citología líquida

Conservar a 4°C.

- Tejido fijado en formol e incluido en parafina



RECOMENDACIONES

1. **La técnica se debe realizar en dos áreas separadas físicamente**, para evitar la contaminación de las muestras. Cada una de las áreas debe tener su propio material de trabajo.
 - **Área pre-PCR:** Extracción del ADN y preparación de las muestras.
 - **Área post-PCR:** Amplificación y visualización del producto amplificado.
2. **Utilizar guantes en todo momento.**
3. **Limpiar las zonas de trabajo:** lejía diluida al 10%.
4. **Emplear siempre puntas con filtro.**
5. **Emplear material de laboratorio desechable y autoclavado.**
6. **Desechar** la punta de la micropipeta tras cada pipeteo.
7. **Mantener cerrados** los eppendorf con las muestras y cajas de puntas, cuando no se estén usando.



INCONVENIENTES

Extracción manual del DNA

- Riesgo de contaminación
- Duración de la técnica
- Material

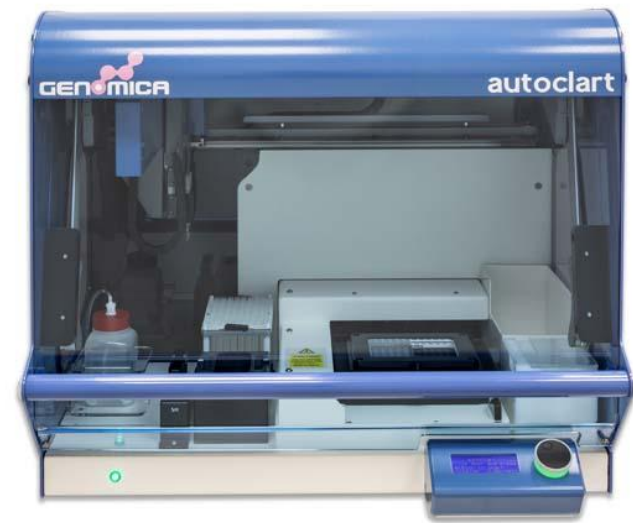




HPX-e-BRID

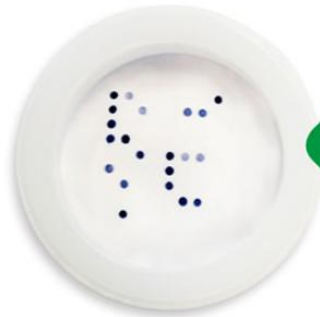
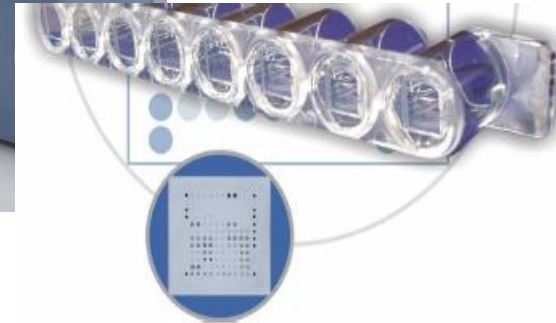
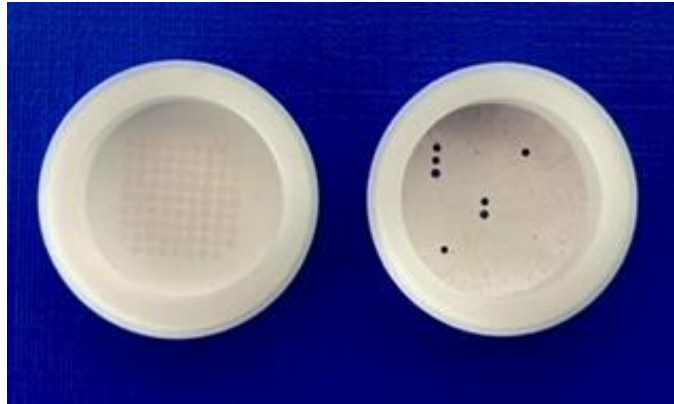


15 test



24 test





| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|---|---|----|----|-----------------------------|-----------------------------|----|----|----|--------------------------------|
| A | B | 33 | 58 | 42 | 71 | 16 | 52 | B | |
| B | B | 35 | 59 | 43 | 72 | 18 | 53 | 6 | 69 |
| C | C | 39 | 66 | ⁴⁴ ₅₅ | 26 | 56 | 11 | 70 | |
| D | U | 45 | 68 | 54 | 84 | 31 | 58 | 40 | 71 |
| E | | 16 | 51 | 73 | 61 | B | 33 | 59 | ⁴⁴ ₅₅ 72 |
| F | | 18 | 52 | 82 | ⁶² ₈₁ | C | 35 | 66 | 54 |
| G | | 26 | 53 | 6 | 67 | U | 39 | 68 | 61 84 |
| H | | 31 | 56 | 11 | 69 | 42 | 45 | 73 | ⁶² ₈₁ |
| I | | | | B | 40 | 70 | 43 | 51 | 82 67 |

ALTO RISCO

16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 e 82

BAIXO RISCO

6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 55, 61, 62, 67, 69, 70, 71, 72, 81 e 84

Alto riesgo oncogénico: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 67, 68, 70, 73, 82 y 85.

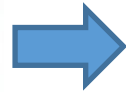
Bajo riesgo oncogénico: 6, 11, 40, 42, 44, 54, 61, 62, 71, 72, 81, 83, 84 y 89.

hybriSpot24

HS24- PLATAFORMA SEMIAUTOMÁTICA



Hibridación.
Hibridación de 1-24 muestras por run.
Descontaminación con luz UV.

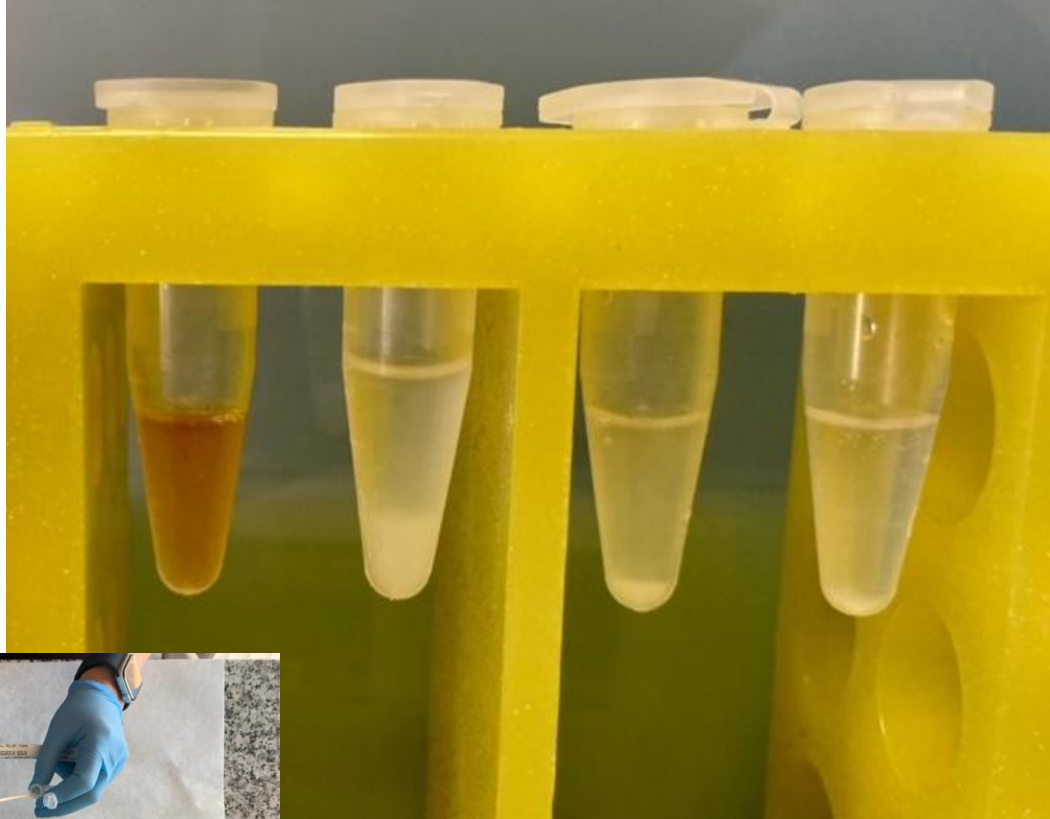


Ampliación.
Desnaturalización.
Hibridación.
Amplificación de 1-48 muestras.
Hibridación de 1-24 muestras.
Descontaminación con luz UV.

hybriSpot24 AUTO



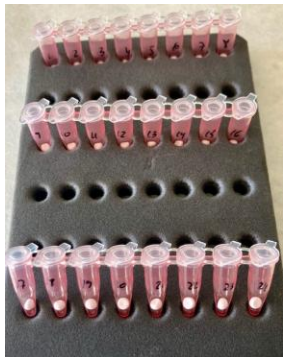
TORUNDAS



- Muestra hemática
Lavado: 2 min 2000 Rpm – quitar sobrenadante –
400 μ l agua bidestilada
- Muestra con bajo contenido de células
- Muestra con alto contenido de células



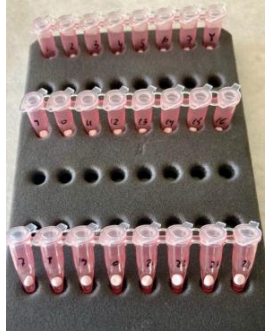
Eppendorf: 500 μ l agua bidestilada libre de DNAsa/Rnasa
VORTEX – 30 μ l muestra



SUSPENSIONES CELULARES



VORTEX- Eppendorf: 500 μ l muestra – 2 min 2000 Rpm – quitar sobrenadante - 500 μ l agua bidestilada libre de DNAsa/Rnasa – 2 min 2000 Rpm – quitar sobrenadante - 300 μ l agua bidestilada libre de DNAsa/Rnasa – VORTEX - 30 μ l muestra



- Muestra alto contenido celular
- Muestra bajo contenido celular

TEJIDO FIJADO EN FORMOL E INCLUIDO EN PARAFINA

Quitar con una hoja de bisturí la parafina sobrante alrededor de la pieza.

Micrótomo: 1-3 cortes de 5 μm y ponerlos en un tubo estéril de 1,5 m.



- Aceite mineral
- Restos tisulares

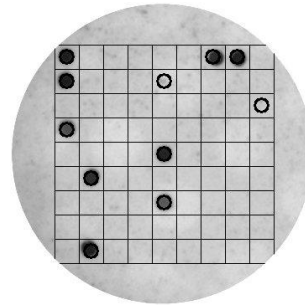
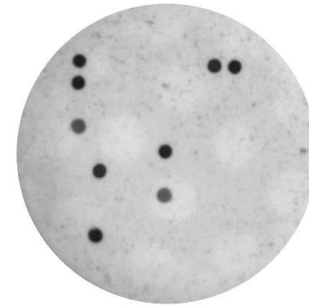
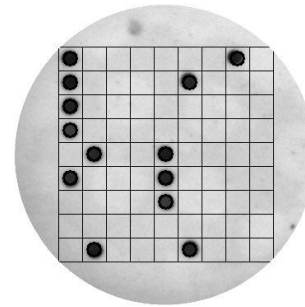
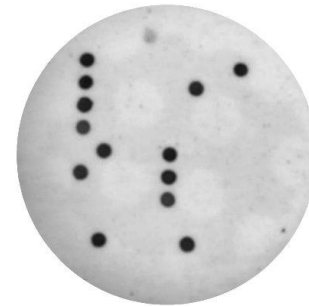
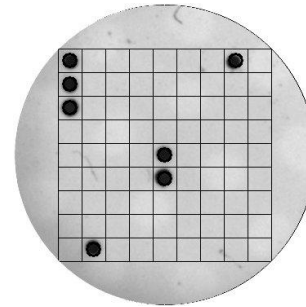
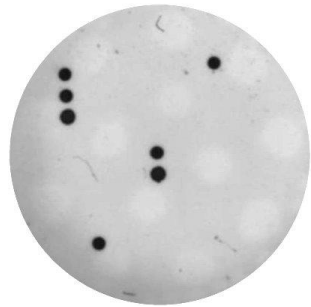
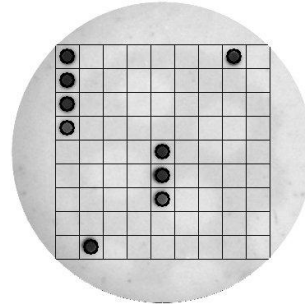
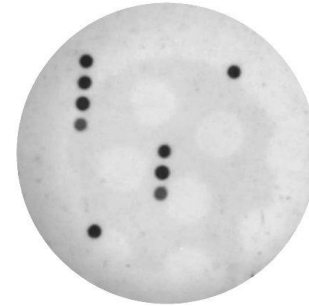
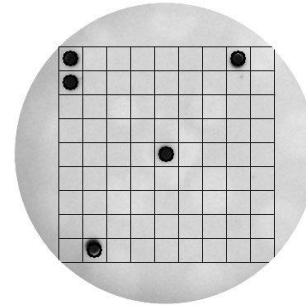
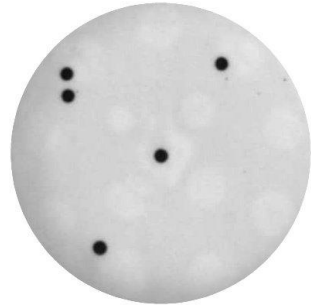
400 μm aceite mineral – Termobloque 95 $^{\circ}$ 2 min – 2 min 2000 Rpm – quitar sobrenadante – 60 μl buffer de extracción + 1,5 μl DNA Release – Termobloque 60 $^{\circ}$ 30 min - Termobloque 98 $^{\circ}$ 10 min – 2 min 2000 Rpm.

3 μl muestra + 27 μl agua bidestilada libre de DNAsa/Rnasa



RESULTADOS

| | | | | | | | | |
|----------|----------|----|-------|----------|----|----|----------|----|
| B | 33 | 58 | 42 | 71 | 16 | 52 | B | |
| B | 35 | 59 | 43 | 72 | 18 | 53 | 6 | 69 |
| C | 39 | 66 | 44/55 | | 26 | 56 | 11 | 70 |
| U | 45 | 68 | 54 | 84 | 31 | 58 | 40 | 71 |
| 16 | 51 | 73 | 61 | B | 33 | 59 | 44/55 | 72 |
| 18 | 52 | 82 | 62/81 | C | 35 | 66 | 54 | |
| 26 | 53 | 6 | 67 | U | 39 | 68 | 61 | 84 |
| 31 | 56 | 11 | 69 | 42 | 45 | 73 | 62/81 | |
| | B | 40 | 70 | 43 | 51 | 82 | 67 | |



B control de hibridación

C control interno de PCR

U Sonda Univerdal screening HPV

X Sondas específicas para los 35 genotipos de alto y bajo riesgo

OBSERVACIONES

Resultado blanco: material insuficiente, PCR inhibida o lisis celular.

Bloque parafina (PCR inhibida): restos tisulares o aceite mineral.

Precipitados del cromógeno en el Chip: alto contenido celular o sangre.

Sondas duplicadas para garantizar la fiabilidad.



рахмат
danke

謝謝

ngiyabonga

teşekkür ederim

спасибо

bedankt

dziękuję

obrigado

thank you

gracias

tapadh leat

sukriya

kop khun krap

taiku

go raibh maith agat

terima kasih

grazie

arigatō

takk

dakujem

তোমাকে ধন্যবাদ

감사합니다

xiexie

ευχαριστώ
merci

merci