

# **Técnicas de detección del HPV.**

**Anatomía Patológica. Patología Molecular.  
Hospital General Universitario Valencia.**

José Angel García  
Biólogo Adjunto (F.E.A.)

# HPV: DETECCION Y TIPAJE

Los 4 nt, en grupos de 20 y en un orden determinado, pueden etiquetar un "lugar genómico" específico y único.

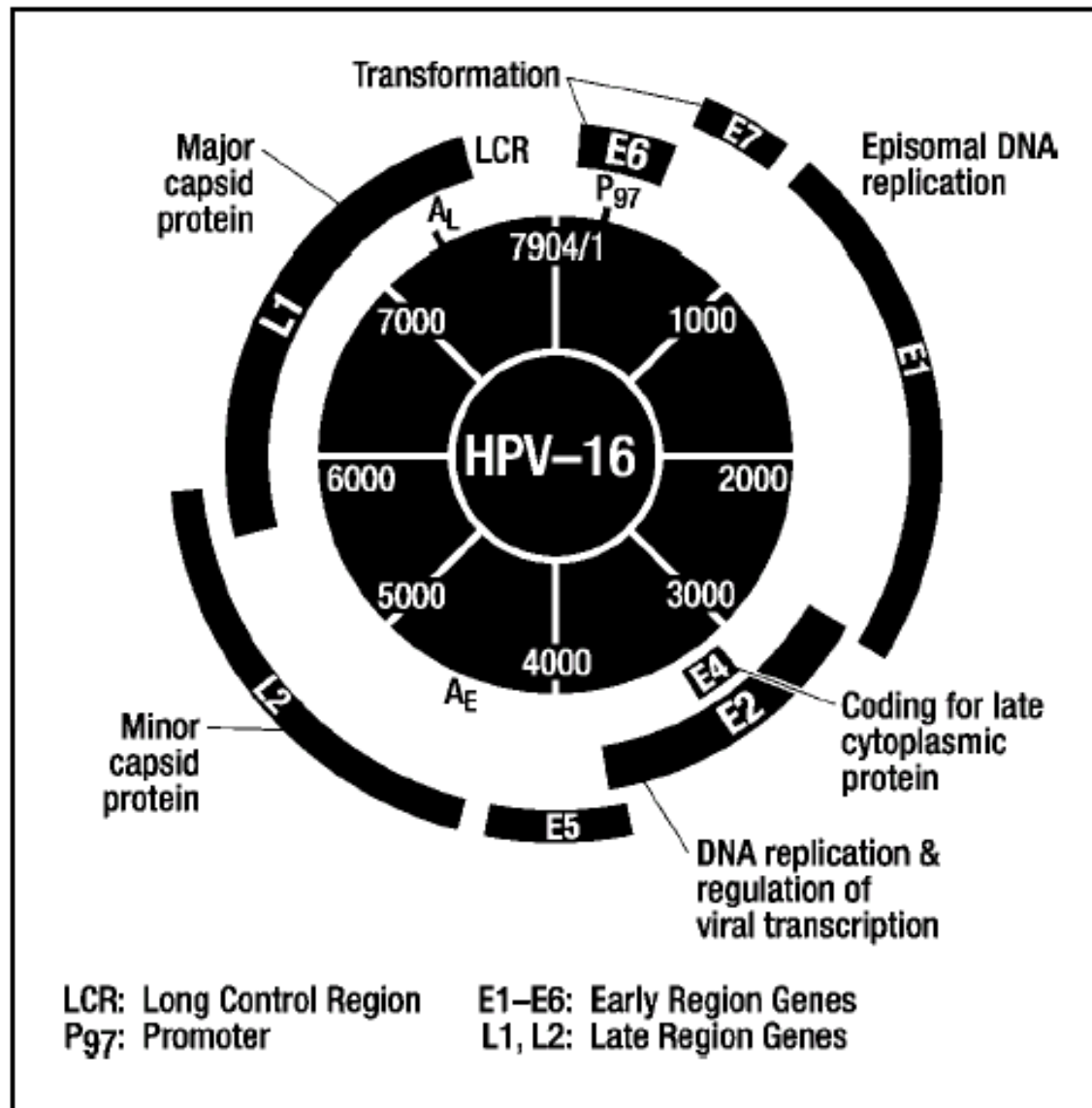


Figure 2. Genomic map of human papillomavirus 16.

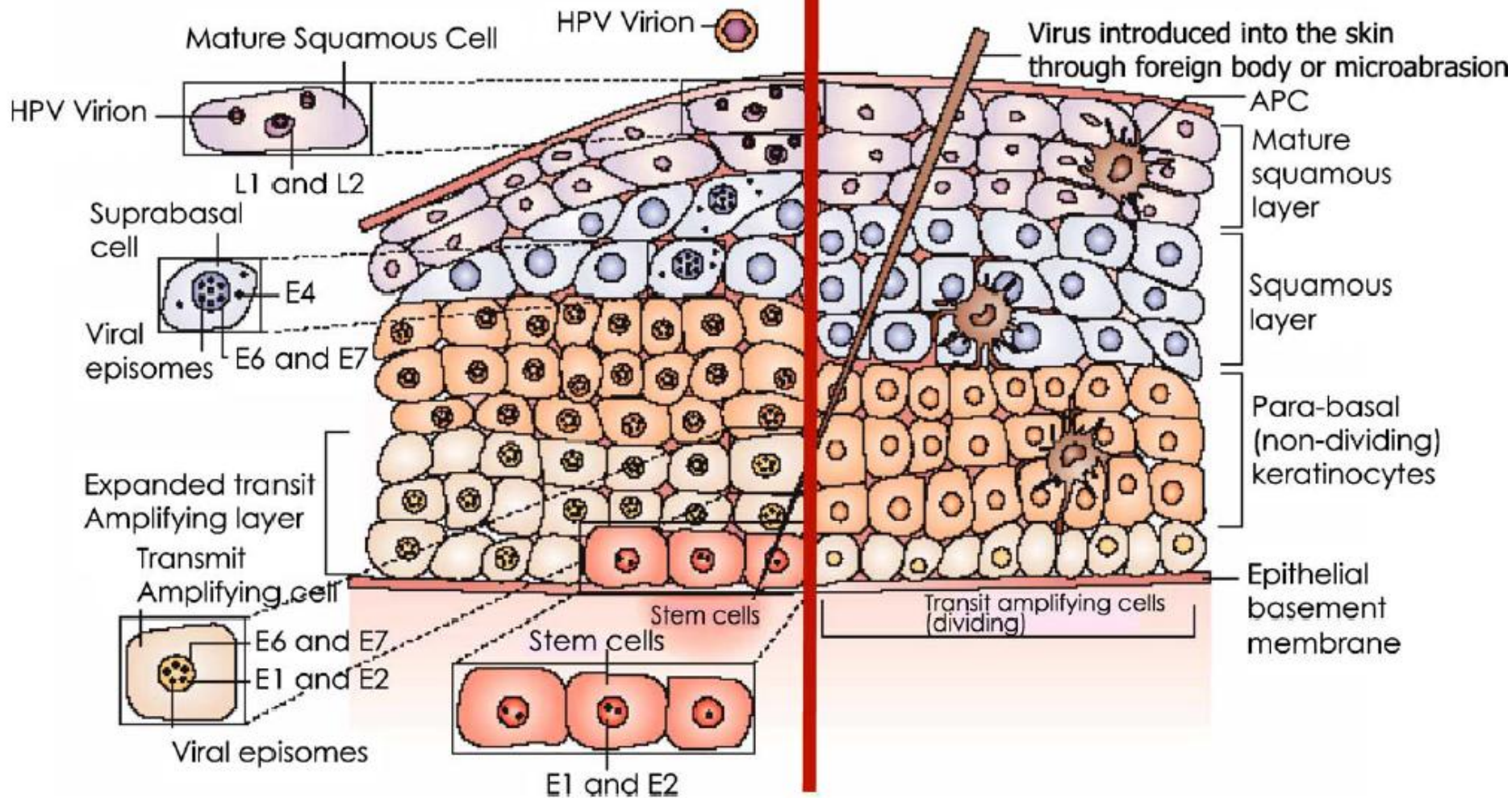
# HPV: DETECCION Y TIPAJE

N. Muñoz, et al. / Vaccine 24S3 (2006) S3/1–S3/10

S3/3

## INFECTED

## NORMAL



# HPV: DETECCION Y TIPAJE

## TECNOLOGIAS APLICADAS

### 1. Sistemas de amplificación de la señal:

a. Hybrid Capture II (hc2).(¿hc3?)

### 2. Sistemas amplificación del ADN viral (target).

a. Amplificación ADN viral (PCR).

b. Análisis del ADN amplificado

Hibridación:

*-En Microplaca*

*-Inversa*

Secuenciación directa

*Real-time PCR (melting curves)*

# HPV: DETECCIÓN Y TIPAJE

## 1. Sistemas de amplificación de la señal:

a. **Hybrid Capture II (hc2):** Hibridación del ADN viral con sondas de ácido ribonucleico (ARN) / **¿Prototipo hc3?**

1. 

**HYBRIDIZE RNA PROBE WITH TARGET DNA**  
Target DNA combines with specific RNA probes, creating RNA:DNA hybrids.

2. 

**CAPTURE HYBRIDS**  
RNA:DNA hybrids are captured onto a solid phase coated with universal capture antibodies specific for RNA:DNA hybrids.

3. 

**AMPLIFY SIGNAL**  
Captured RNA:DNA hybrids are detected with multiple antibodies conjugated to alkaline phosphatase. Resulting signal is amplified to at least 3000-fold.



“13 high-risk HPV types (16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68), and the 5 low-risk types (6/11/42/43/44)”

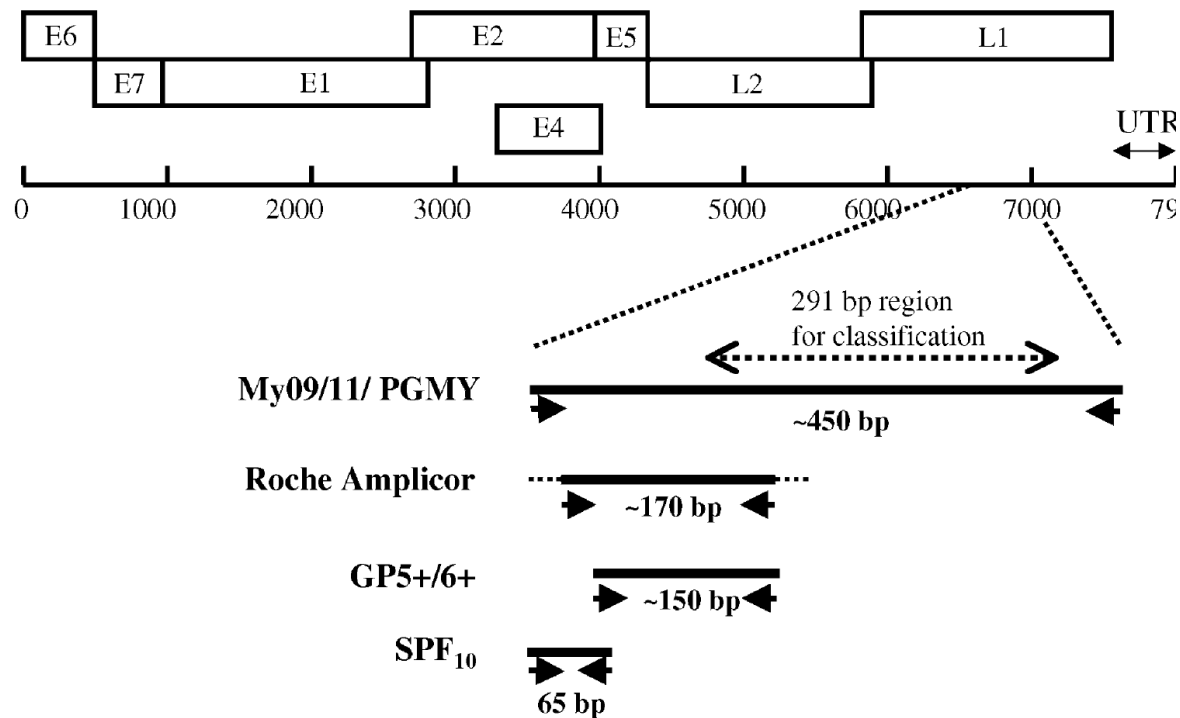
## Sistemas de Amplificación de la señal: Ventajas/Inconvenientes

- Sesgo: falso-negativos y estudios epidemiológicos
- Alta reproductibilidad
- No requiere técnico cualificado
- Reacciones cruzadas
- Muestra clínica obtenida, transportada y utilizada en medio y condiciones de proveedor

# HPV: DETECCIÓN Y TIPAJE

## 2. Sistemas amplificación del ADN viral (target).

### a. Amplificación ADN viral (PCR).



# HPV: DETECCION Y TIPAJE

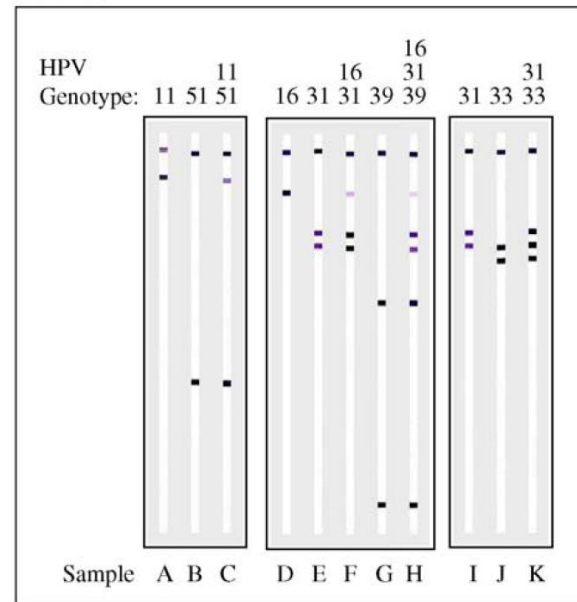
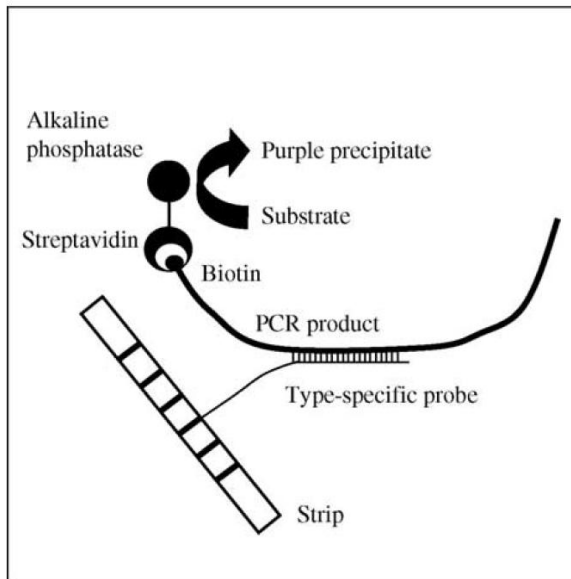
## 2. Sistemas amplificación del ADN viral (target).

### b. Análisis del ADN amplificado (PCR):

#### Hibridación:

*En Microplaca* (Molecular System Amplicor HPV)

*Inversa*: LiPA (Line Probe Assay), *HPV GenoArray*, ...

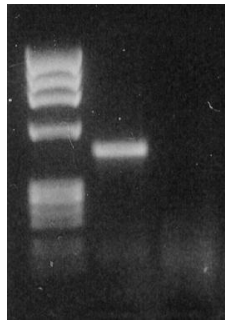


# HPV: DETECCION Y TIPAJE

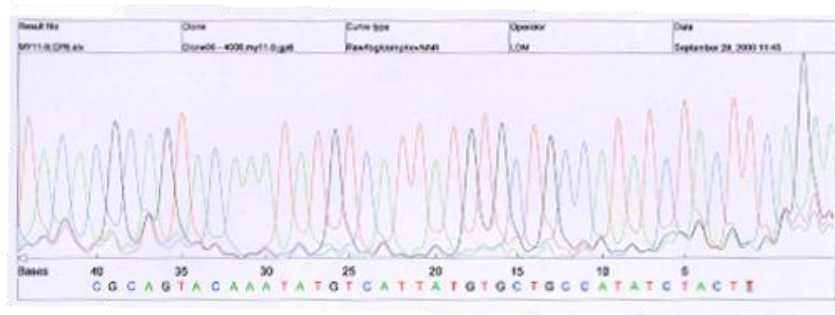
## 2. Sistemas amplificación del ADN viral (target).

### b. Análisis del ADN amplificado (PCR):

#### Secuenciación directa

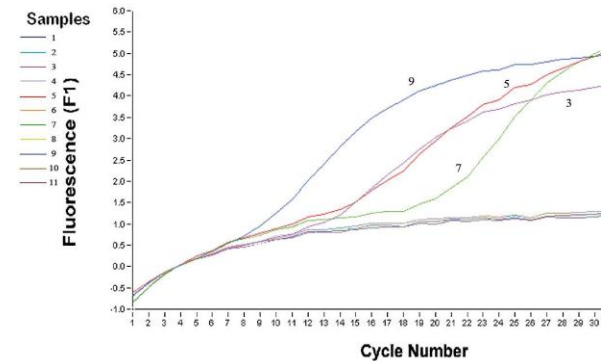


PCR CONVENCIONAL

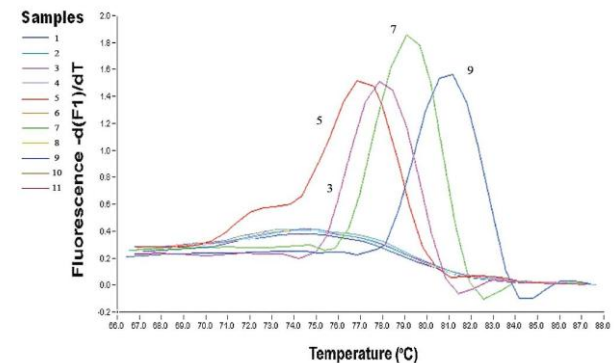


SECUENCIACION DIRECTA  
homología de secuencias  
(genotipado) por GenBank

#### Análisis por *real-time PCR* (melting curves)



REAL-TIME PCR



MELTING CURVES



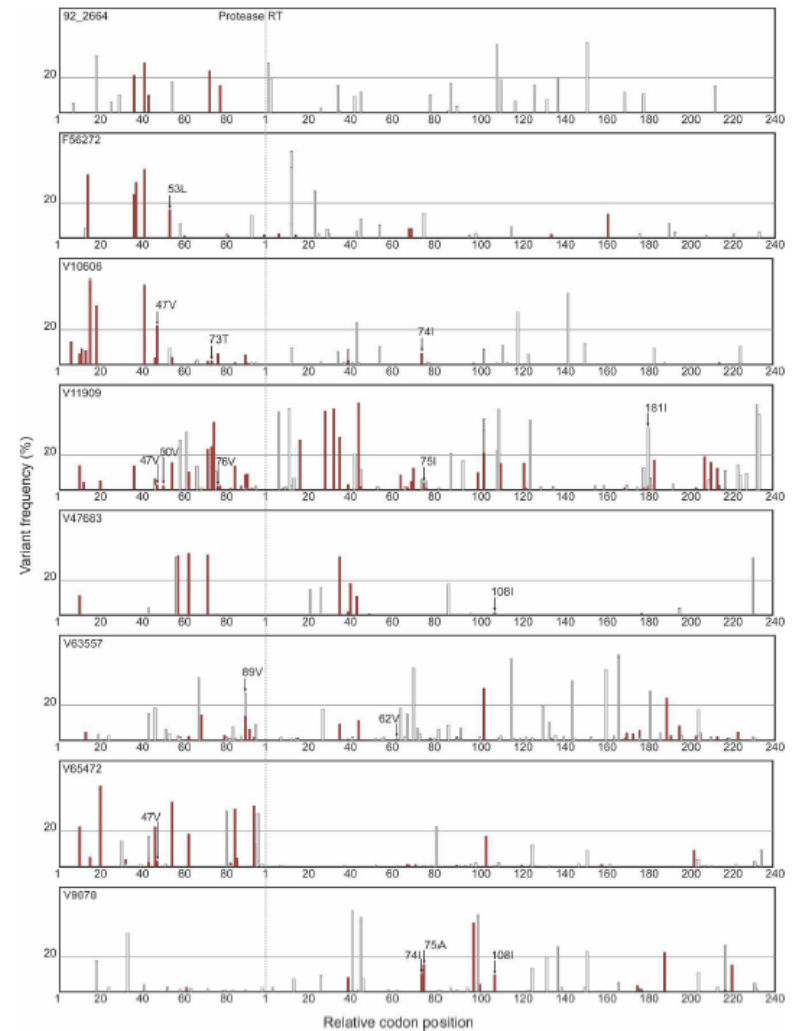
## 2. Sistemas amplificación del ADN viral (target).

### b. Análisis del ADN amplificado (PCR):

Nuevas tecnologías:

HRM

Pirosecuenciación



GENOME  
RESEARCH

Characterization of mutation spectra with ultra-deep pyrosequencing: Application to HIV-1 drug resistance  
Charin Wang, Yanyu Meng, Shaoqun Chen, Melissa Roughg and Robert W. Shafer  
Genome Res. published online June 28, 2007  
Access the most recent version at doi:10.1101/g.648307

# **HPV: DETECCION Y TIPAJE**

## **Sistemas amplificación del ADN viral: Ventajas/Inconvenientes**

- **Variabilidad interlaboratorios**
- **Contaminación: falso positivos**
- **Detección de todos los tipos de HPV existentes (sólo en Secuenciación Directa)**
- **Reproductibilidad menor**
- **Requieren técnico de laboratorio cualificado**
- **Muestra clínica de todo tipo: frescas, fijadas, parafinadas, citologías de archivo, escobillones secos o con medio de transporte...**
- **Disponibilidad del ADN viral**

# HPV: DETECCION Y TIPAJE

## Recomendaciones de la American Society for Clinical Pathology (2007): estándar mínimo para la implementación clínica.

- Detección, al menos de los 13 HPV de alto riesgo (16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68). [HPVs 26, 53, 66, 73 y 82 = 15% de HR-HPV; hpv 16 = 33%; *Vaccine, 2008, in press*].
- Sensibilidad del 92%, especificidad del 85% en CIN3.  
 $\kappa \geq 0.7$  ( $\kappa = 0.8$ ) [*Gynecologic Oncology, 2008, in press*].
- Uso de control interno de muestra adecuada.