

Biologia Molecular no Diagnóstico de Infecção :HPV

Maria Elizabeth Menezes, MSc; Ph.D
e-mail: melmenezes@dnanalise.com.br
DNAnálise Laboratório



Técnicas Moleculares

- HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU*
- SEQÜENCIAMENTO
- PCR
- CAPTURA HÍBRIDA
- INNO-LiPA
- MICROARRANJOS



Diagnóstico Molecular

☐ PCR qualitativo : Detectado ou não detectado.
Tipar por sequenciamento , Innolipa , Clart

PapiloCheck

☐ PCR quantitativa (rt PCR) : Detecta tipo específico / quantifica

☐ Captura Híbrida : Grupo específica (Alto e baixo potencial)

☐ INNO-Lipa : Tipo específica (25) ; qualitativo



Amostra: tipo e qualidade

- Fresca
- Bloco de parafina
- Biópsia
- Lâmina
- ??????????

Labquality Days
2012
Sverre Sandberg

DNAnálise 2012



Diagnóstico molecular

- Baseia-se na detecção do DNA do HPV
- O resultado depende da coleta da amostra
- A extração do DNA e a sua qualidade são fundamentais para a realização do exame.



Diagnóstico Molecular

COLETA DE COLO UTERINO E/OU VAGINA

1. não efetuar exame digital (toque), colposcopia ou assepsia prévia
2. presença de sangue (não menstrual) ou de conteúdo vaginal alterado não modifica o resultado
3. se houver necessidade da coleta de citologia, esta deve ser realizada em primeiro lugar
4. introduzir 1 a 1,5 cm da escova no canal cervical e rodá-la 3 vezes no sentido horário. a seguir, escovar a ectocérvix e, se desejar, as paredes vaginais

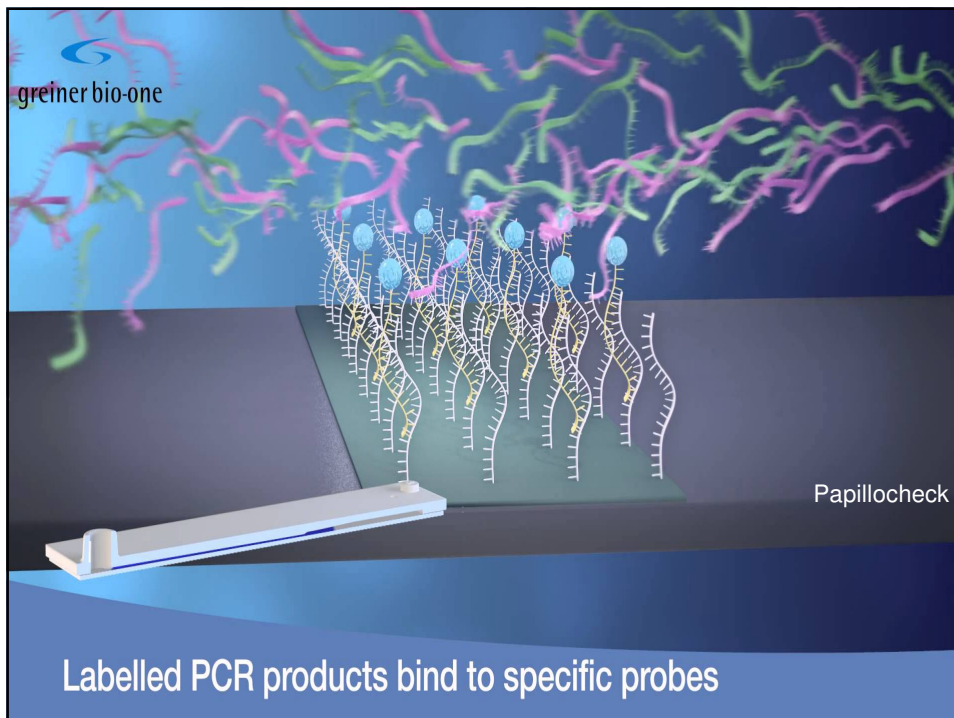
OBS: RECOMENDA-SE ABSTINÊNCIA SEXUAL DE 3 DIAS E EVITAR O PERÍODO MENSTRUAL

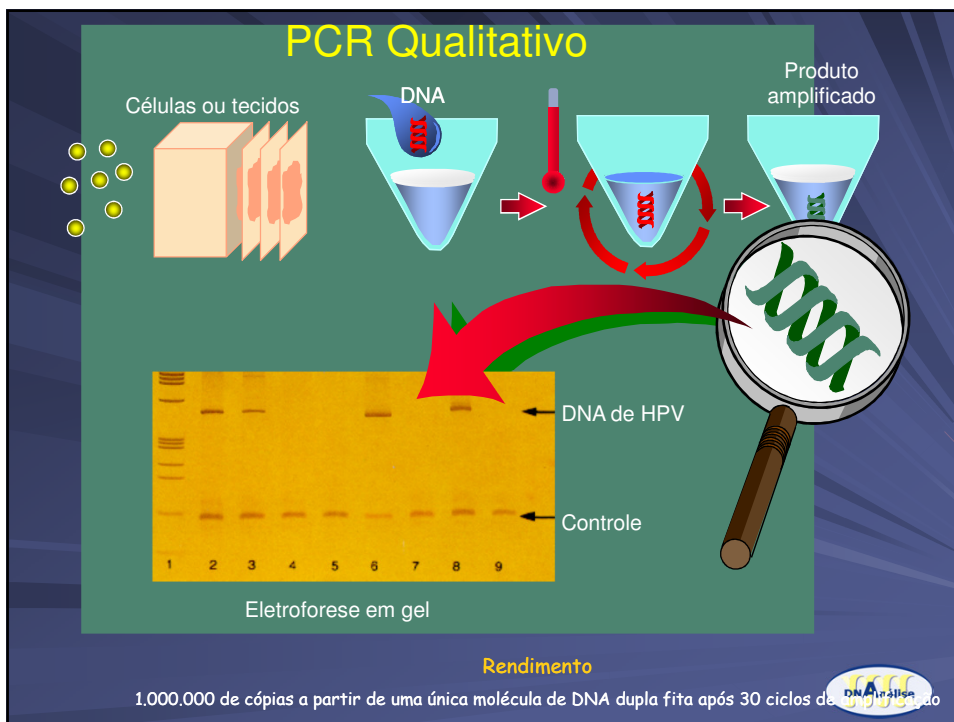
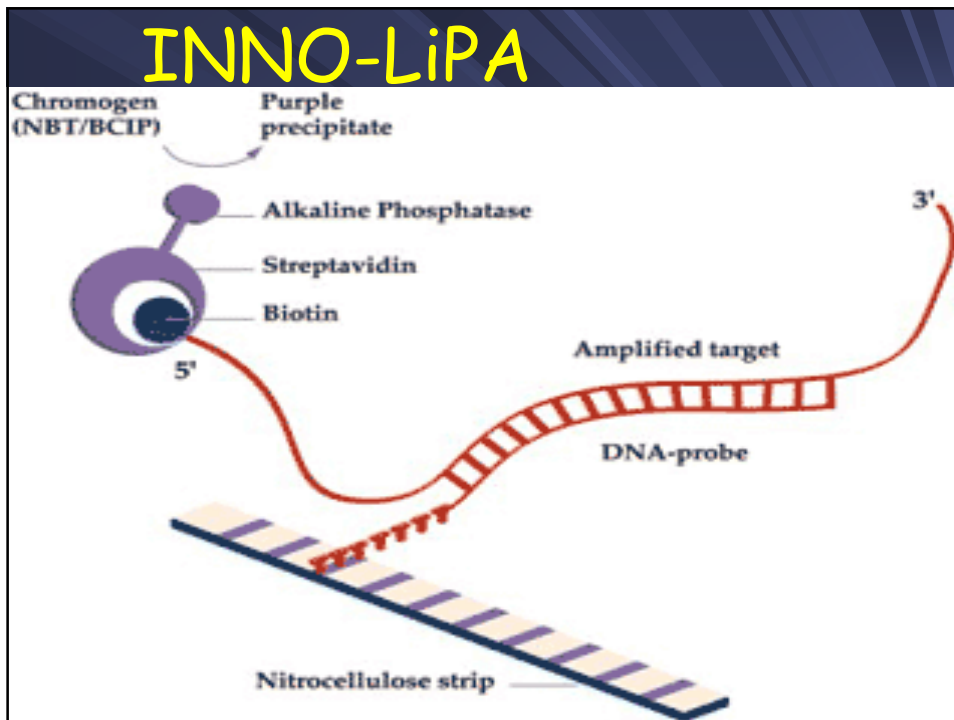


Técnicas Baseadas em PCR

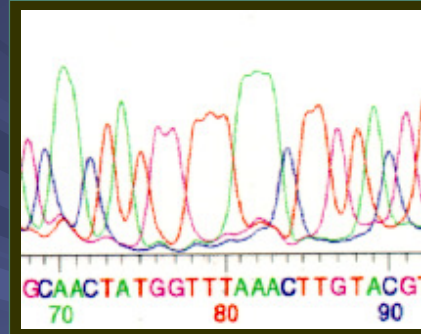
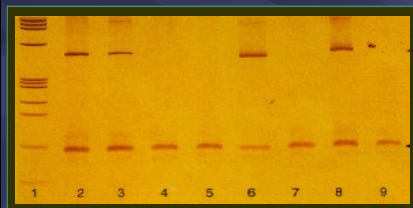
Considerações gerais

- Detectar vários tipos de HPV utilizando iniciadores desenhados para regiões conservadas do genoma viral.
- Condições de reação devem ser bem controladas.
- A identificação tipo-específica depende da especificidade dos iniciadores utilizados.





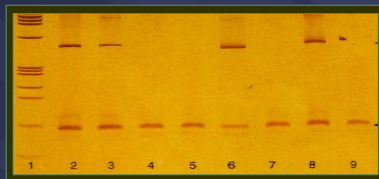
PCR/Seqüenciamento



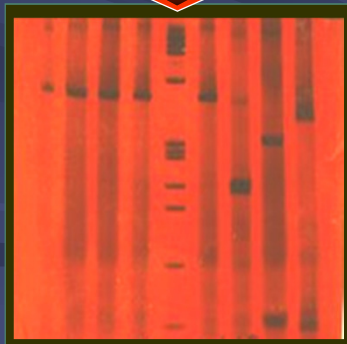
Todos os tipos e novos tipos podem ser discriminados



PCR/RFLP



Sensibilidade: < 0,01 cópias de genoma viral/célula

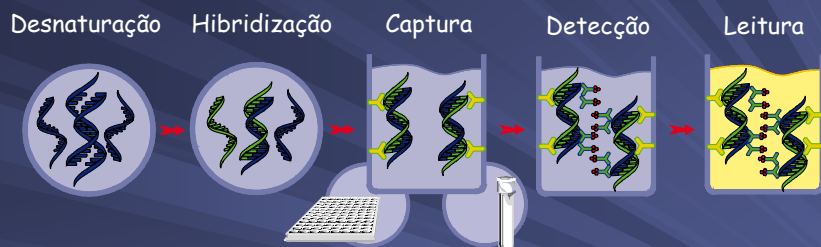


PCR - RFLP

São discriminados > 40 ≠ tipos



CAPTURA HÍBRIDA



5 Low-risk types: 6, 11, 42, 43, 46

13 High-risk types: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68



» Diagnóstico Molecular de HPV

CAPTURA HÍBRIDA®


Sensibilidade em microplaca: 1 pg/ml
(equivalente a 0,1 cópia de vírus por célula)

Interpretação:

- 1 a 50 pg/ml - carga viral baixa
- 50 a 200 pg/ml - carga viral intermediária
- acima de 200 pg/ml - carga viral alta



» Considerações Gerais

1. A captura híbrida contém sondas gênicas de 70% dos tipos de HPV de baixo risco e 99% dos oncogênicos;
2. Em virtude da biologia viral, a comparação do resultado da captura híbrida com o da citologia e anatomia patológica, só tem valor quando o intervalo de tempo entre as coletas for inferior a 30 dias;
3. $RLU/PCA < 50$
 $RLU/PCB < 50$
1.  infecção inicial ou fase de remissão espontânea..A critério Clínico indica-se repetir após 3 meses, para confirmar infecção ativa.
2. Para aferir eficácia ao tratamento indica-se colher nova amostra após 3 meses do término da terapêutica;
3. Após o tratamento, quando da ausência de manifestações colposcópicas e ou citológicas, o encontro de elevadas taxas das relações RLU/PCA, indicam alta probabilidade de recidiva.



PCR Consenso

- Baseado na amplificação do alvo
- Requer testes de tipagem adicional
- Produtos espúrios podem diminuir a sensibilidade
- Amplificação *primer*-dependente de certos tipos de HPV

Captura Híbrida- 2

- Não requer amplificação do alvo
- Distinção dos HPV por grupo
- Não discrimina infecção por múltiplos tipos ou novos tipos de HPV
- Hibridização cruzada com tipos de HPV que não fazem parte do cocktail de alto risco
- Medida semiquantitativa da carga viral



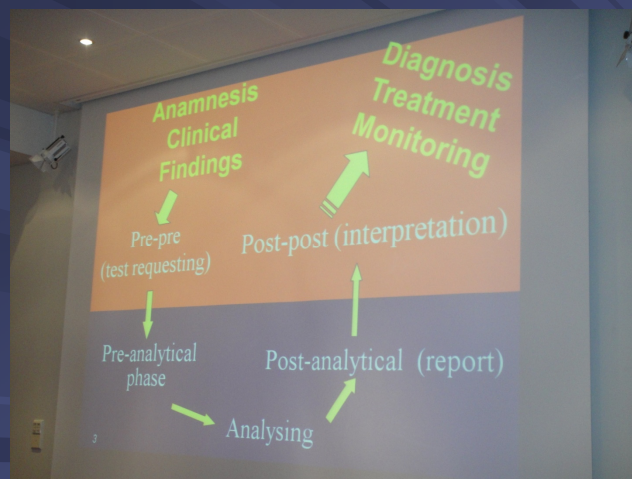
Critérios para Utilização de Técnicas de Diagnóstico em Programas de Triagem do Câncer do Colo do Útero

- ❖ Alta especificidade e sensibilidade para a detecção de amplo espectro dos HPV genitais de alto-risco;
- ❖ Empregar amostras não-invasivas e de obtenção simples (esfregaços, lavados);
- ❖ Possuir elevada reprodutibilidade intra- e inter-laboratório;
- ❖ Passível de realização em larga escala;
- ❖ Passível de automatização;
- ❖ Boa relação custo/benefício

Cuzick et al., Health Technol. Assess. Vol.3, 1999



O que deve ser reportado além do resultado?????



Labquality Days
2012
Sverre Sandberg



DNAnálise 2012

Prevalência de HPV de baixo e alto risco pela técnica de Biologia Molecular (Captura Híbrida II) em Santa Catarina

Verificar a prevalência e a incidência de HPV de baixo e alto risco oncogênico pela técnica de biologia molecular (Captura Híbrida 2), bem como a faixa etária mais acometida.



INTRODUÇÃO

♂ Diagnóstico infecção por HPV leva em conta dados da história, exame físico e complementares; (IPOG, 2006).

♀ Técnicas utilizadas:
Papanicolaou, Inspeção Ácido Acético 5%, Colposcopia, Penioscopia, Biópsia, Hibridização "in situ", Captura Híbrida e PCR; (IPOG, 2006).



MATERIAIS E MÉTODOS

♂ Este estudo constituiu em uma análise retrospectiva de 12.211 exames realizados através da consulta do banco de dados do Laboratório DNAnálise, referência em Biologia Molecular em SC.

♀ Foram incluídos no estudo os exames que apresentavam resultado positivo para HPV, incluindo os dois grupos, de baixo e alto risco, de ambos os sexos, independente da faixa etária.



RESULTADOS

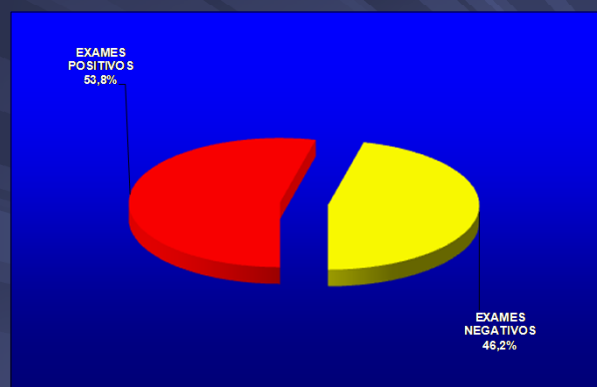


FIG. 1 – Distribuição percentual do número de exames positivos e negativos para HPV.



RESULTADOS

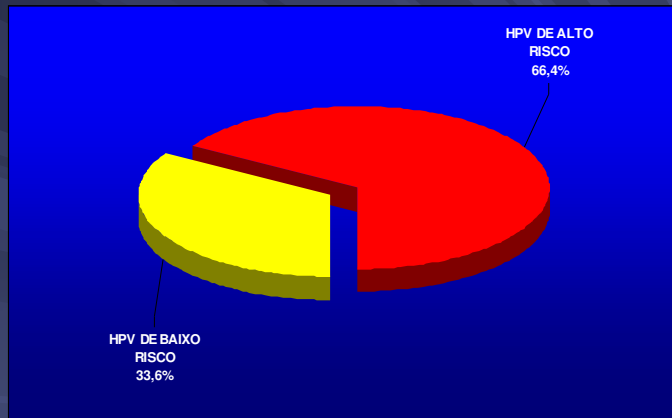


FIG. 2 – Distribuição percentual da prevalência de HPV de baixo e alto risco.



RESULTADOS

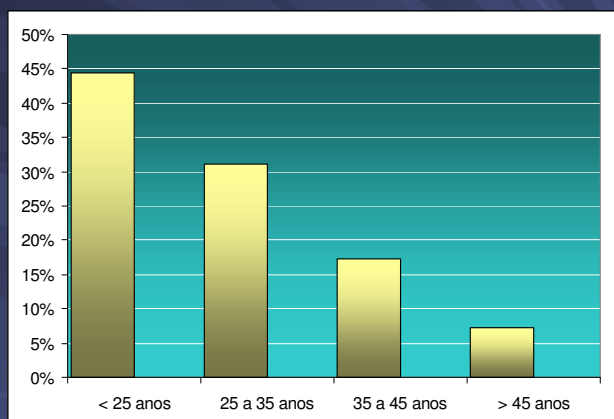


GRÁFICO 1 – Incidência de HPV positivos de alto e baixo risco por faixa etária.



RESULTADOS

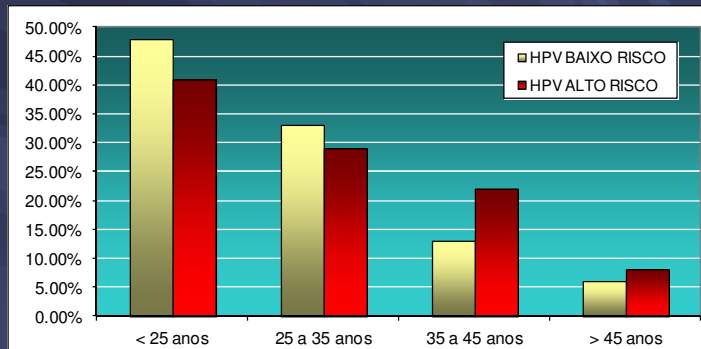


GRÁFICO 2 – Distribuição da incidência de HPV de baixo e alto risco por faixa etária .



CONCLUSÃO

♂ Observou-se a grande incidência do HPV na população estudada, apresentando 53,8% de positividade, onde destes, 66,4% foi de HPV de alto risco;

♀ Quando comparada a prevalência, o HPV de baixo risco teve uma maior incidência na população < de 25 anos (48%), até os 35 anos (33%);

♂ Sendo que na faixa etária de 35 a 45 anos (22%), e > 45 anos (8%) a maior incidência foi de HPV de alto risco.



CONCLUSÃO

♀ A maior parte destes diagnósticos dá-se entre 25 a 35 anos, enquanto os diagnósticos de câncer cervical são mais frequentes entre 35 e 45 anos.

♂ Com isso, destaca-se a importância da detecção do HPV através de metodologias mais sensíveis, como testes de biologia molecular (Captura Híbrida), para garantir o diagnóstico precoce deste que vem sendo considerado o maior agente causador de câncer de colo uterino .



- Na tabela faltava era o HPV 11 no Papilochek estar com o quadrado a escuro. A tipagem por nós efectuada (INSA e IPO) não foi por RFLP, foi por PCR e hibridação dos produtos de PCR em tiras de nitrocelulose no caso do Inno-Lipa e em micro-arrays no caso do Papilochek e Clart.

