

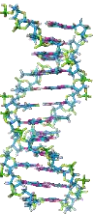
Setor de Biologia Molecular

Detecção Molecular do HPV

Agledison Vieira do Nascimento

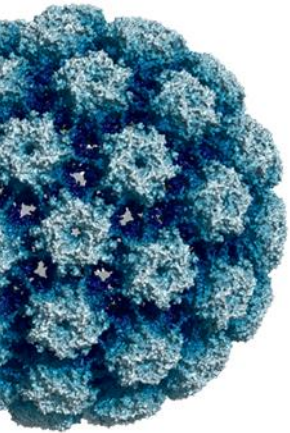
Farmacêutico

**Juazeiro do Norte-CE
2023**



ROTEIRO

- **HPV**
- **Captura Híbrida**
- **PCR/Eletroforese**
- **RT-qPCR**
- **Painel Molecular (Genotipagem)**



HPV

Papiloma Vírus Humano

Trata-se de uma das **infecções sexualmente transmissíveis (IST's)** mais frequentes.

Segundo a **Organização Mundial da Saúde**, mais de **630 milhões de homens e mulheres** estão **infectados pelo HPV**.

No **Brasil**, estima-se que haja **9 a 10 milhões de infectados** por esses vírus e que, a **cada ano, 700 mil casos novos surjam**, podendo ser considerado, portanto, uma **epidemia**.

HPV – Estrutura Morfológica

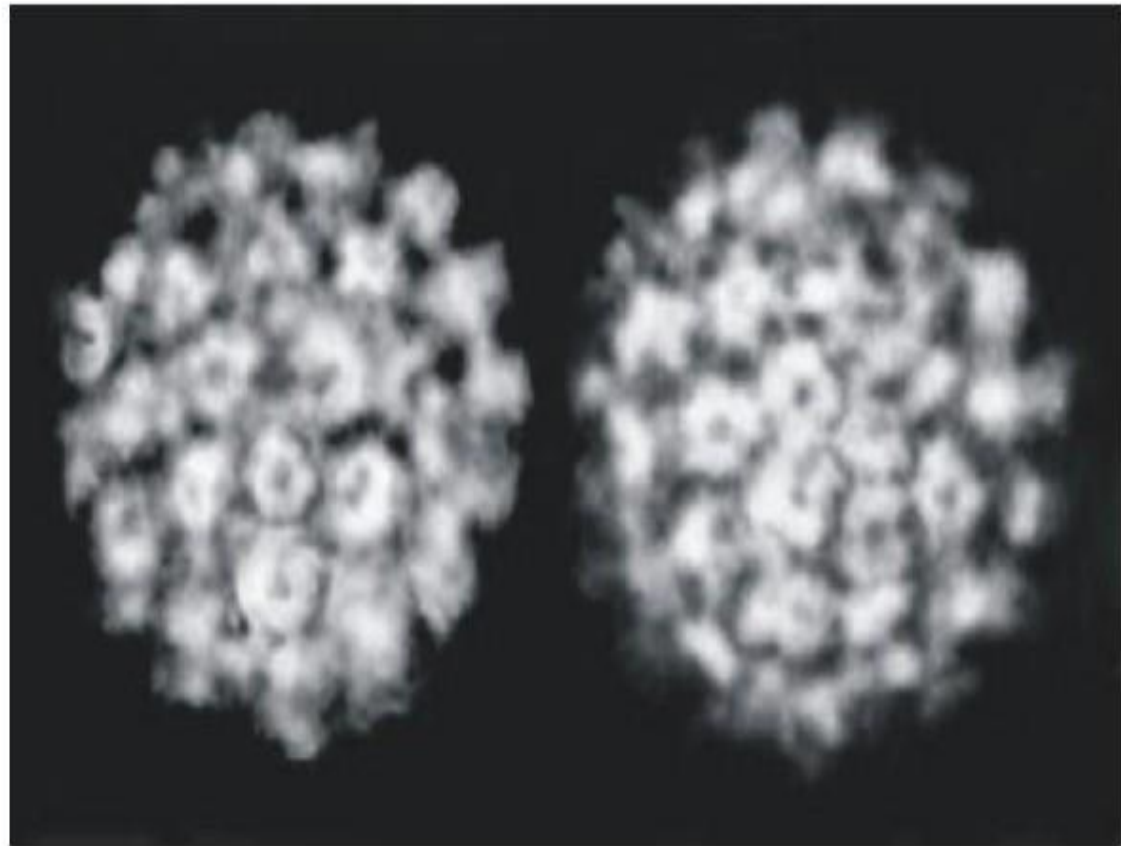
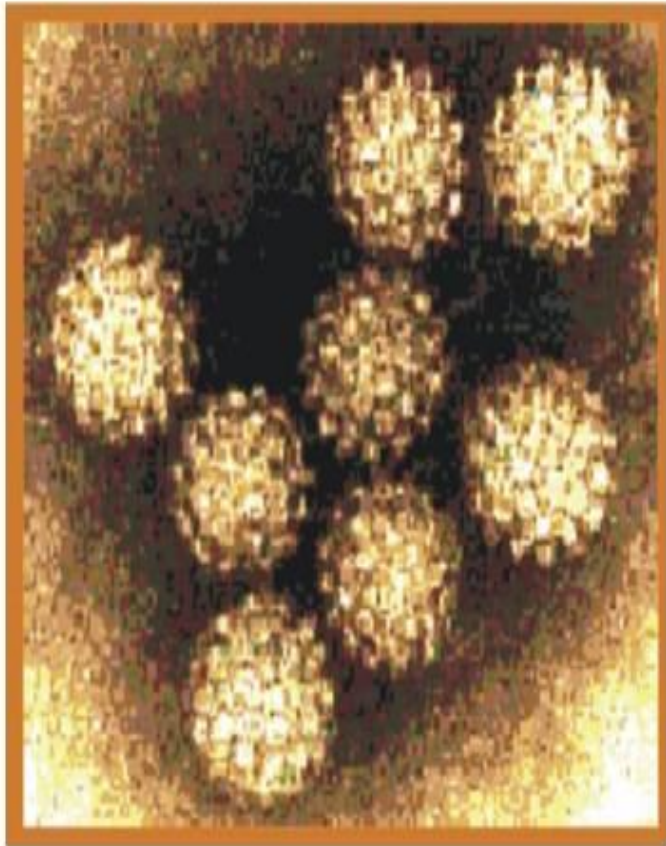
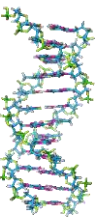
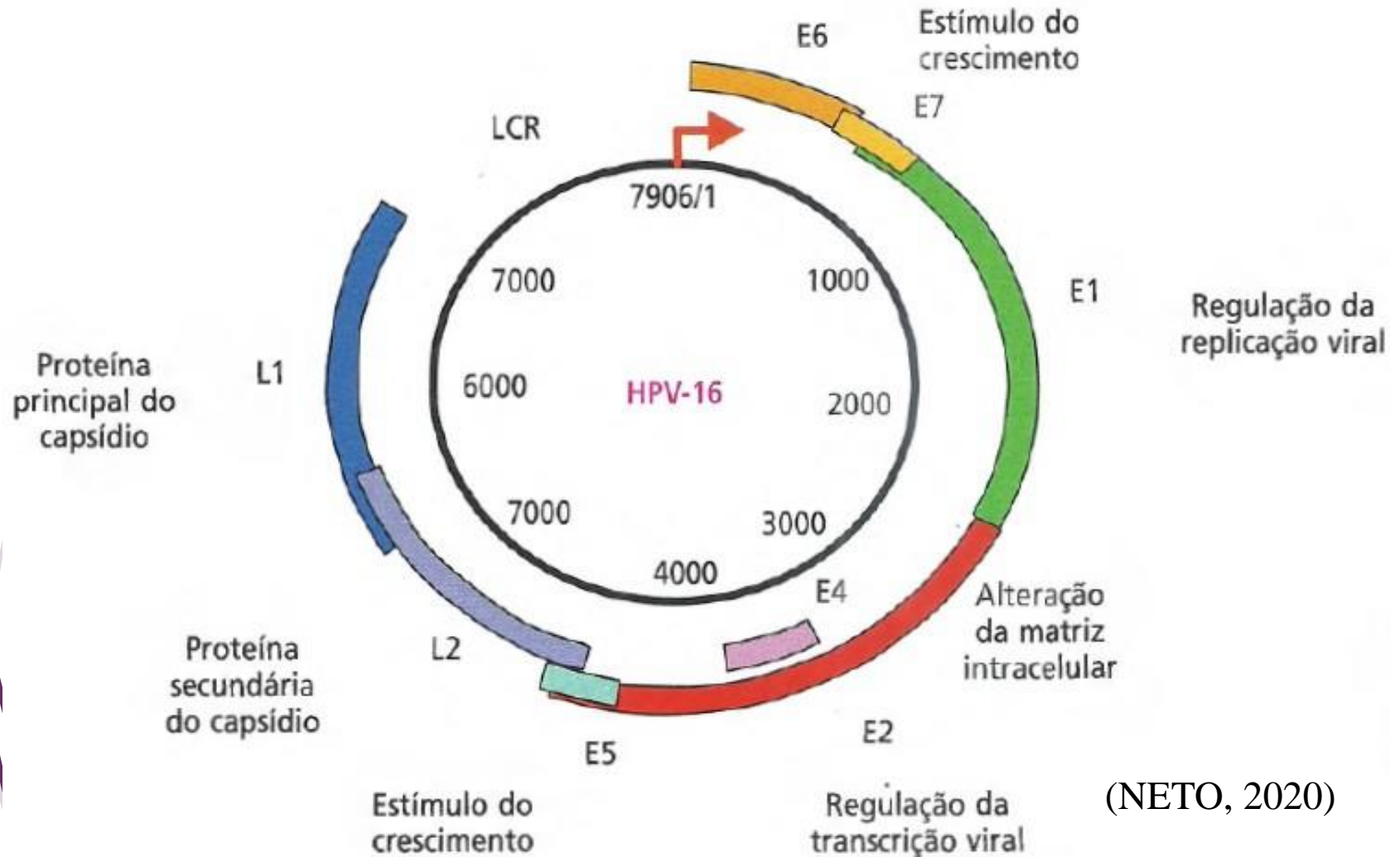
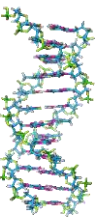


Figura 1: Morfologia do papilomavirus humano (HPV).

HPV – Estrutura Genômica

3

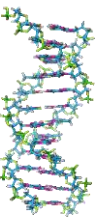


(NETO, 2020)

Regulatória (LCR ou *long control region*), precoce (*Early* ou *E*) e tardia (*Late* ou *L*)

HPV - Genótipos

4



Mais de 200 tipos de HPV descritos

Aproximadamente 40 tipos infectam o trato anogenital

Pelo menos 20 subtipos estão associados ao carcinoma do colo uterino

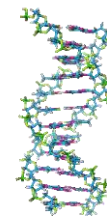
- **Baixo risco oncogênico:** detectados em lesões anogenitais benignas e lesões intraepiteliais de baixo grau - tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 e 81.
- **Alto risco oncogênico:** detectados em lesões intraepiteliais de alto grau e, especialmente, nos carcinomas - tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82.

HPV - Oncogênico

5

TABELA 5-3 Vírus oncogênicos humanos

(MADIGAN, 2016)



Tipo de vírus	Família do vírus	Tipo de câncer associado
HTLV-1	Retrovírus (vírus RNA)	Leucemia de células T/linfoma
Hepatite B	Hepadnavírus (vírus DNA hepatotrófico)	Carcinoma hepatocelular
Hepatite C	Hepadnavírus	Carcinoma hepatocelular
Epstein-Barr	Herpes-vírus (vírus DNA)	Carcinoma de nasofaringe Linfoma de Burkitt Linfoma imunoblástico Doença de Hodgkin
HHV-8 (KSHV)	Herpes-vírus	Sarcoma de Kaposi Linfoma de cavidade corporal
HPV sorotipos 16, 18, 33, 39	Papilomavírus (vírus DNA)	Carcinoma de colo de útero Carcinoma anal
HPV sorotipos 5, 8, 17	Papilomavírus	Câncer de pele

Legenda: HTLV, vírus linfotrófico humano da leucemia/linfoma de células T; HHV-8, herpes-vírus humano 8; KSHV, herpes-vírus do sarcoma de Kaposi.

Colo de útero

Ânus

Vulva

Vagina

Pênis

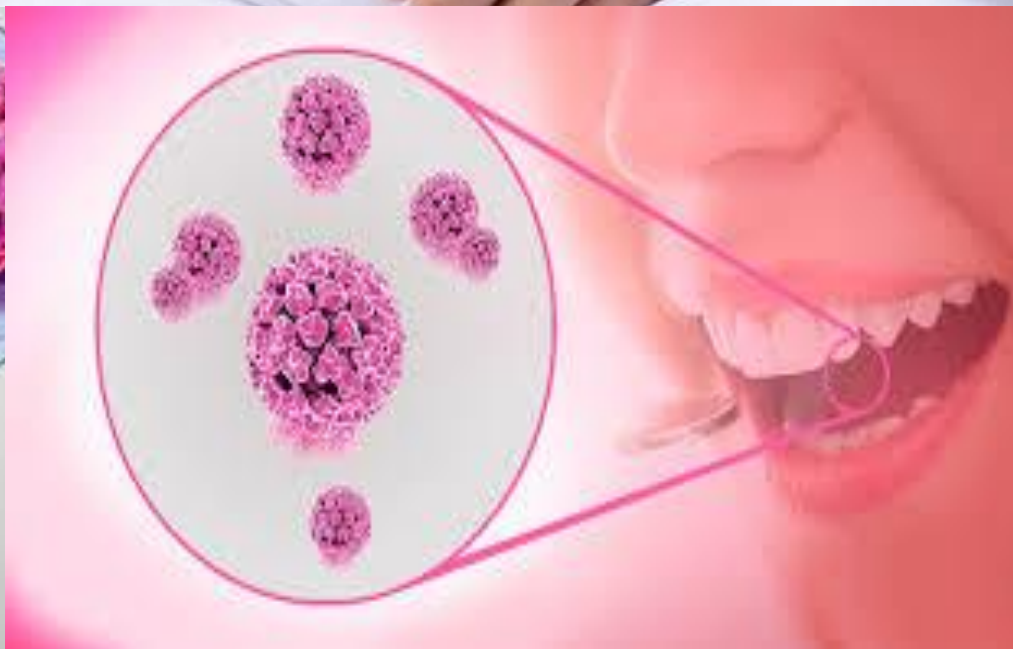
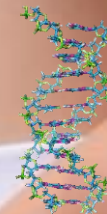
Orofaringe

Laringe

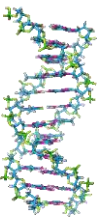
Língua

Cabeça e Pescoço

HPV



HPV – Mecanismo Patogenicidade



7

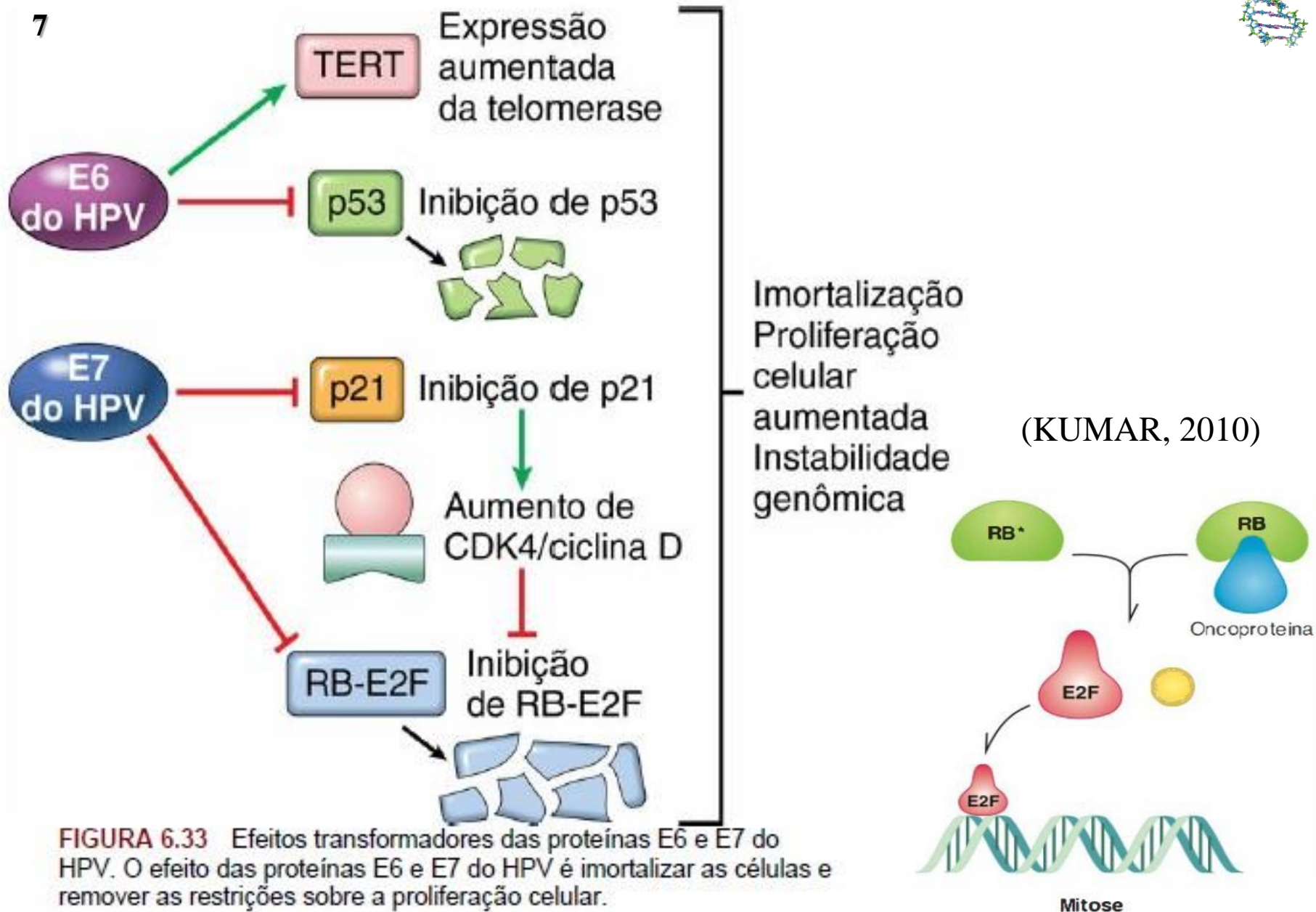
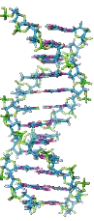


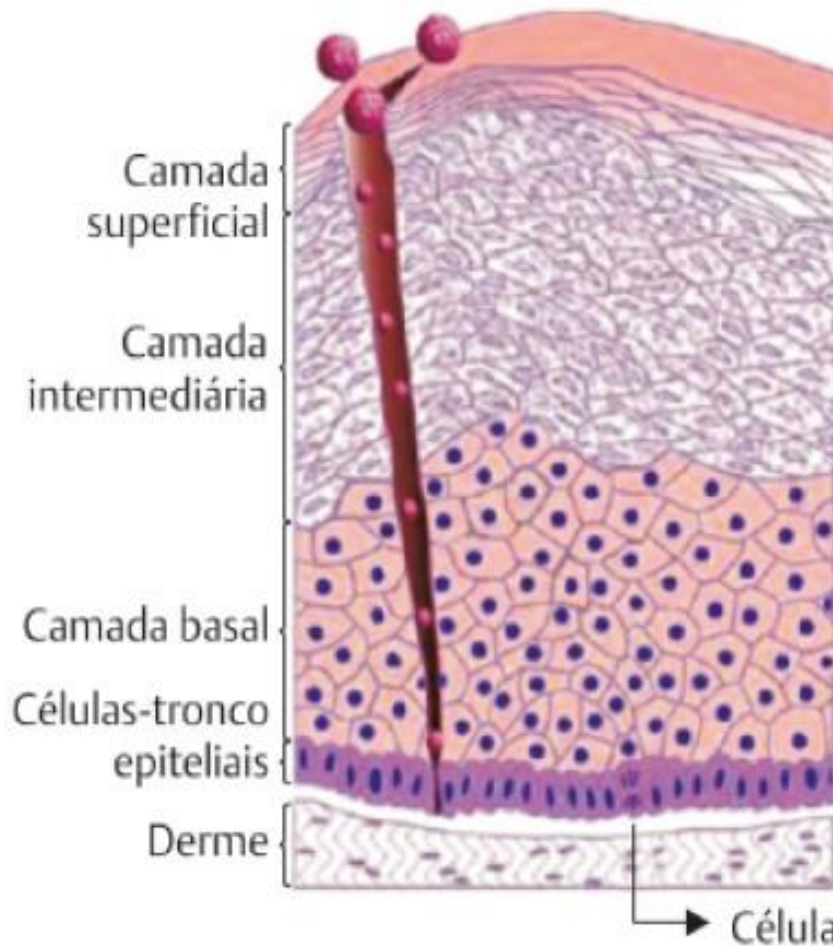
FIGURA 6.33 Efeitos transformadores das proteínas E6 e E7 do HPV. O efeito das proteínas E6 e E7 do HPV é imortalizar as células e remover as restrições sobre a proliferação celular.

HPV - Infecção

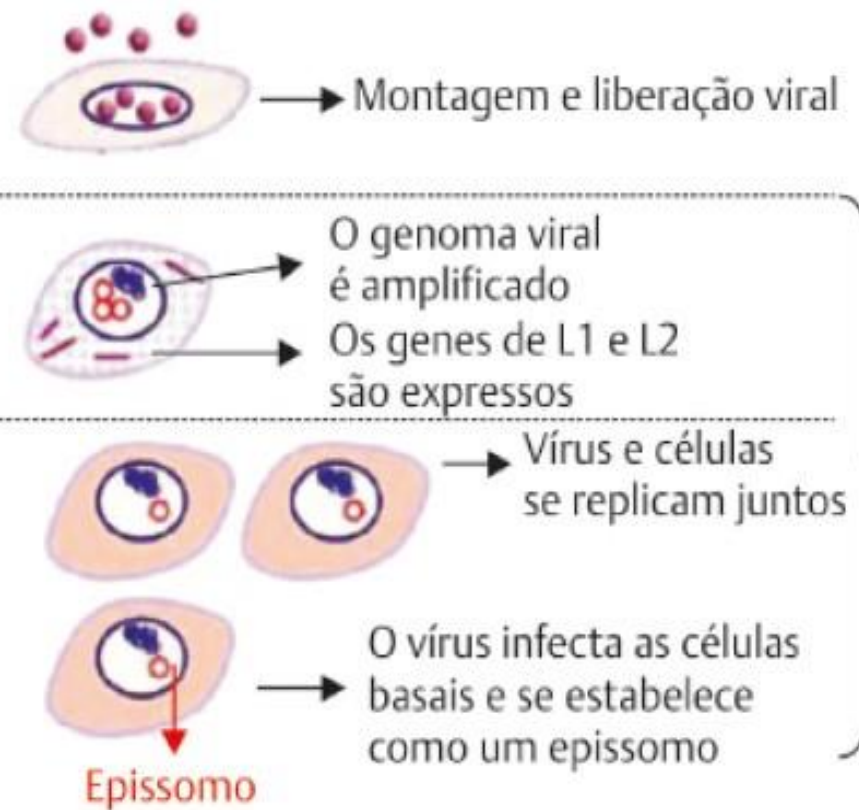
8



Epitélio escamoso infectado



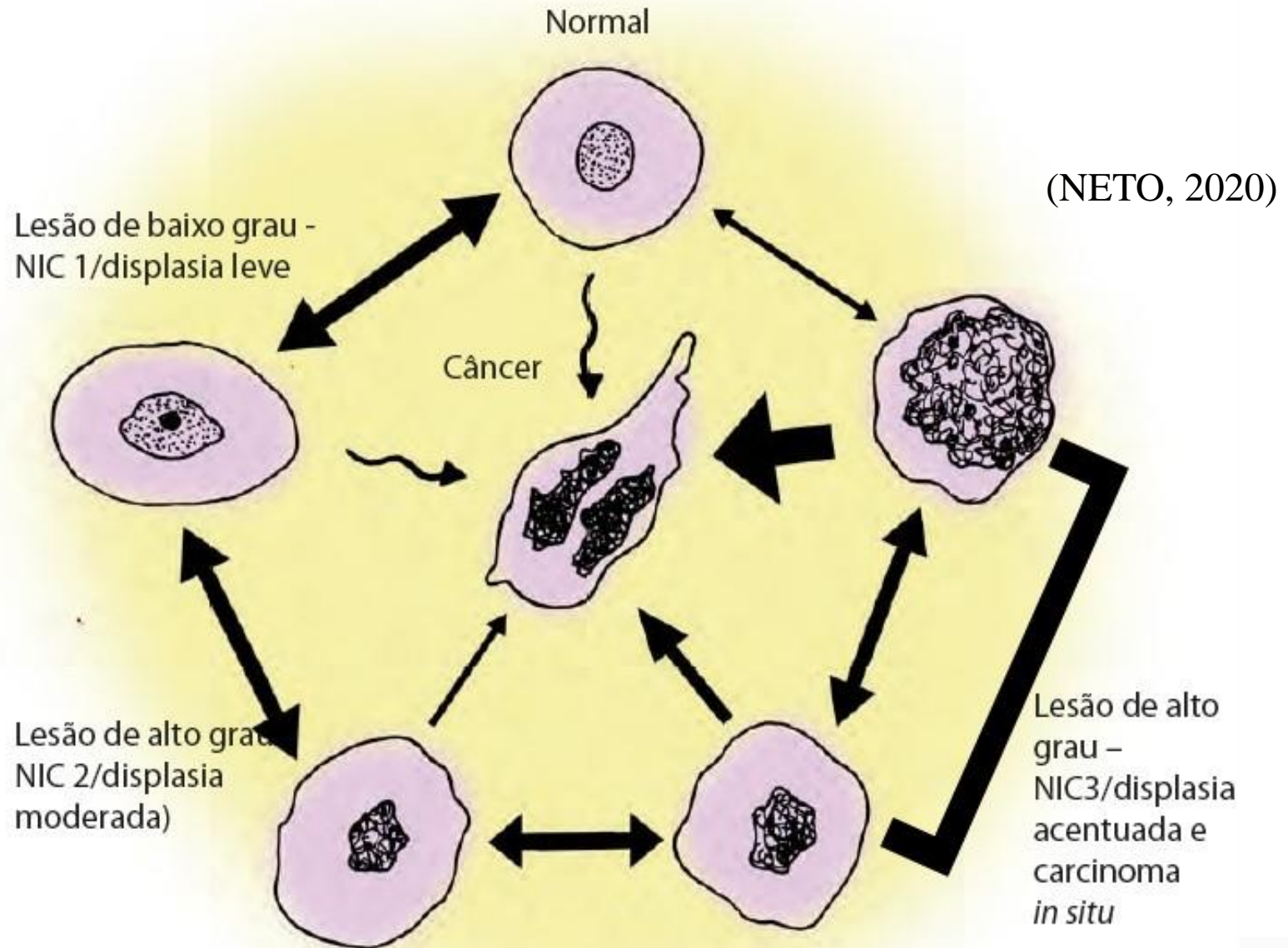
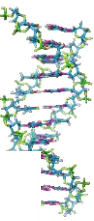
Ciclo de infecção do HPV



(NETO, 2020)

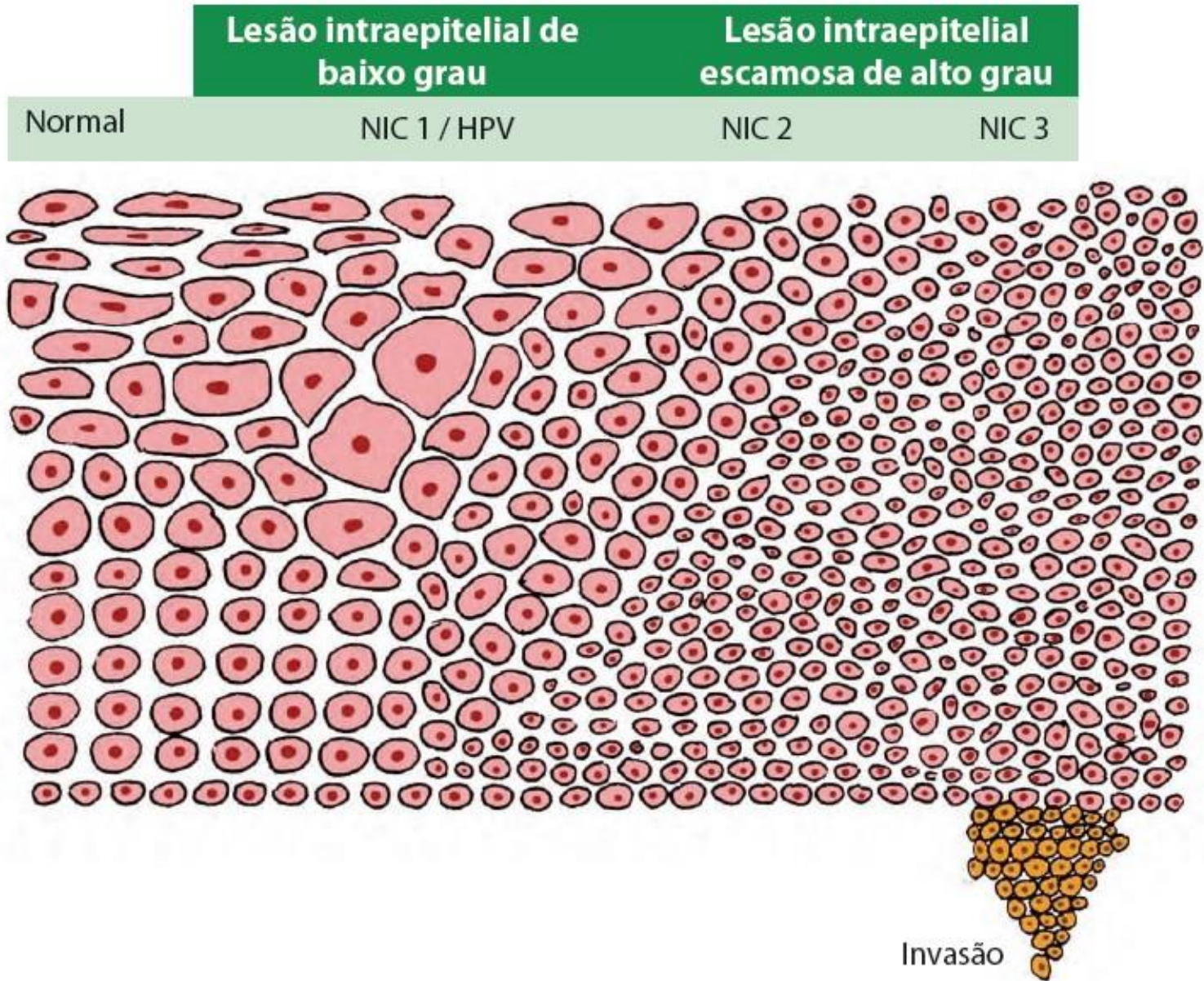
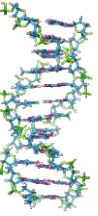
HPV - Lesões Celulares

9



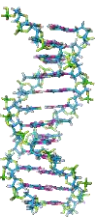
HPV – Lesão Tecidual

10



Invasão

HPV - HPV Alto e Baixo Risco



11

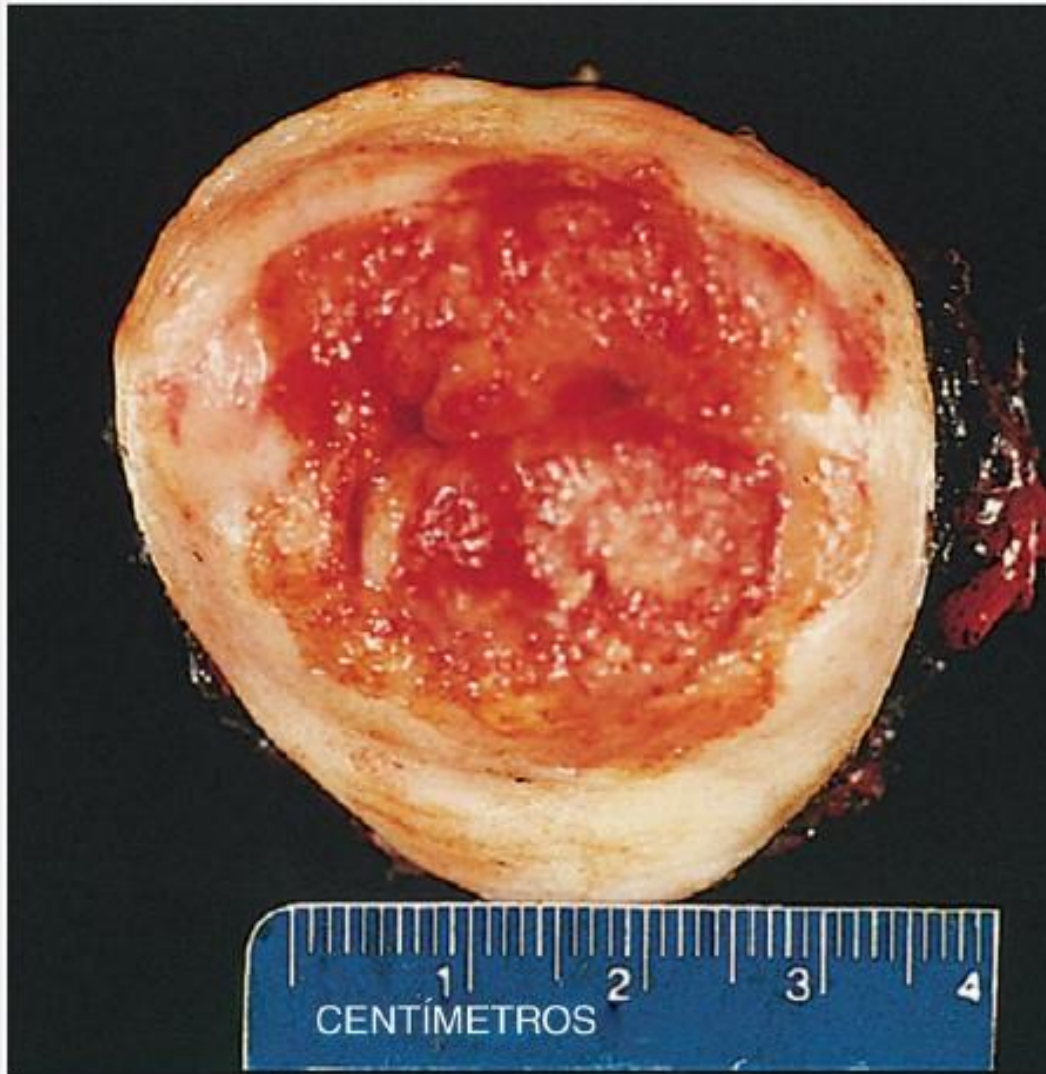
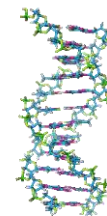


FIGURA 19.8 Óstio cervical com carcinoma cervical circunjacente, invasivo e exofítico.

HPV - Vacinação

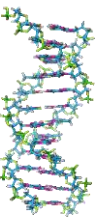
12



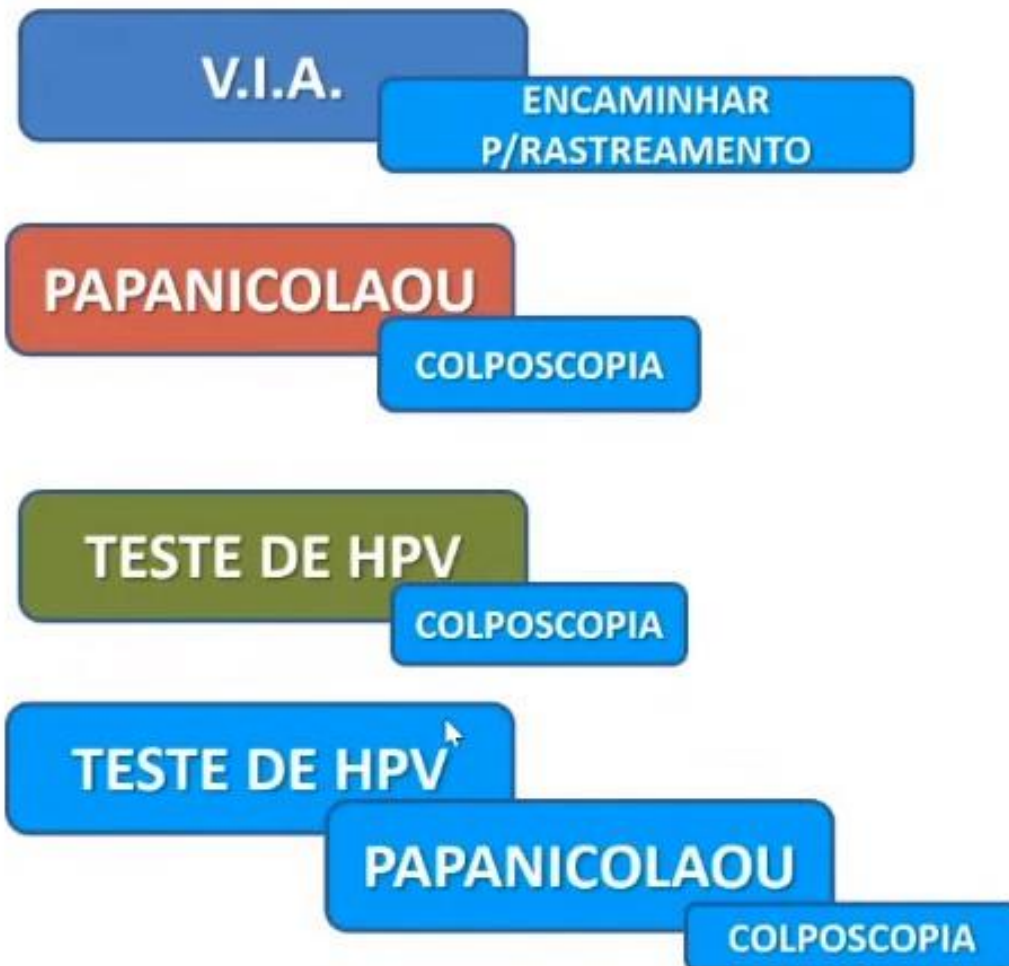
Quadro 2. Programa oficial de vacinação contra HPV do PNI de acordo com o gênero, para o período de 2017-2020 (PNI – Junho/2017)^(18,19) (CARDIAL et al, 2019)

Ano	Meninos e homens		Meninas e mulheres	
	Idade	Nº doses	Idade	Nº doses
2017-2018	11 e 14 anos	2 (0-6 meses)	9 e 14 anos	2 (0-6 meses)
2019	10 e 11 anos	2 (0-6 meses)		
2020	9 e 10 anos	2 (0-6 meses)		
2017-2020	HIV+ e imunossuprimido* 9 a 26 anos	3 (0-2-6 meses)	HIV+ e imunossuprimido* 9 a 26 anos	3 (0-2-6 meses)

* Imunossupressão por transplante e tratamento oncológico.



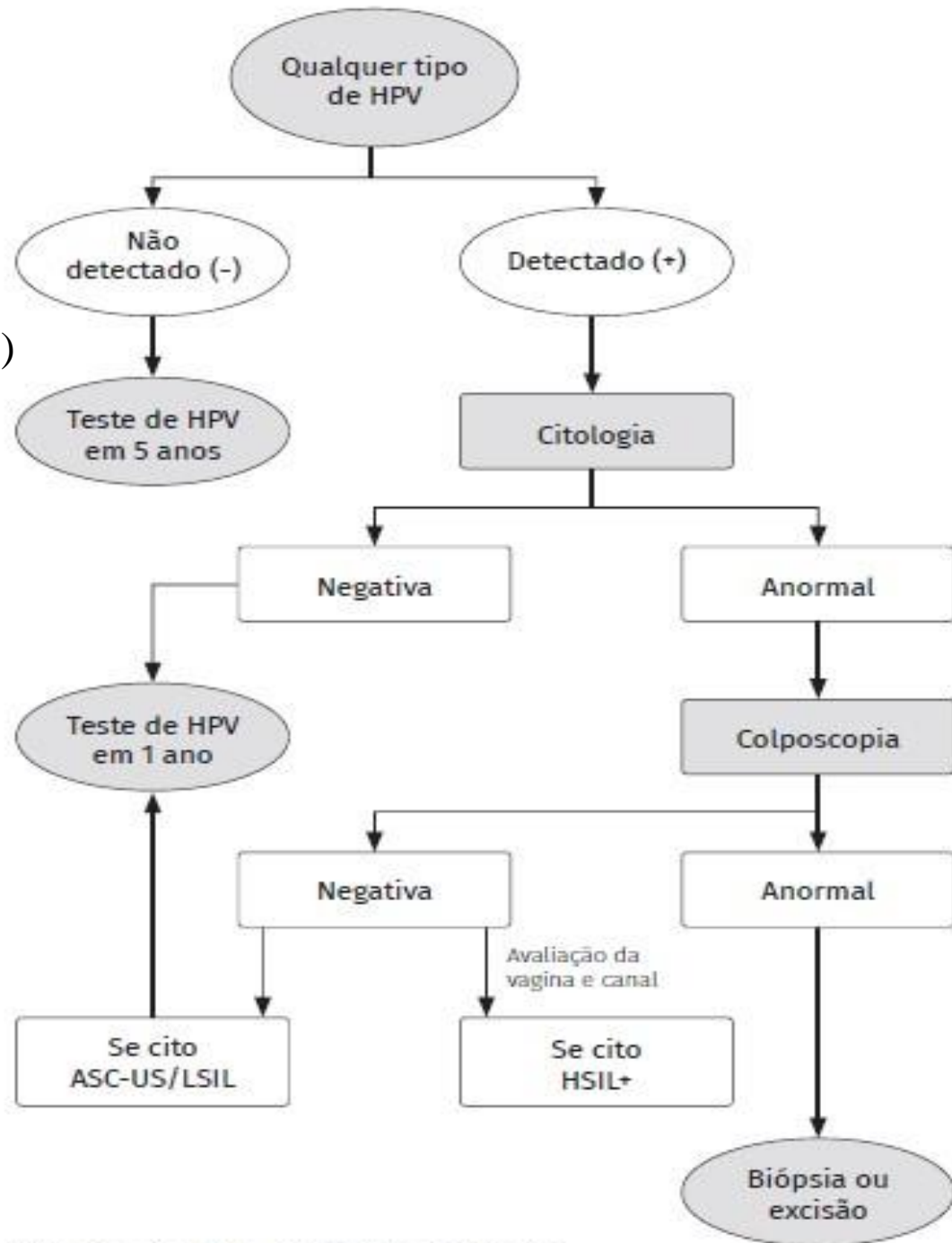
RASTREAMENTO DO CC: do que dispomos?



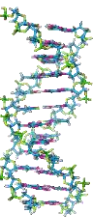
HPV

13

(CARVALHO et al, 2022)



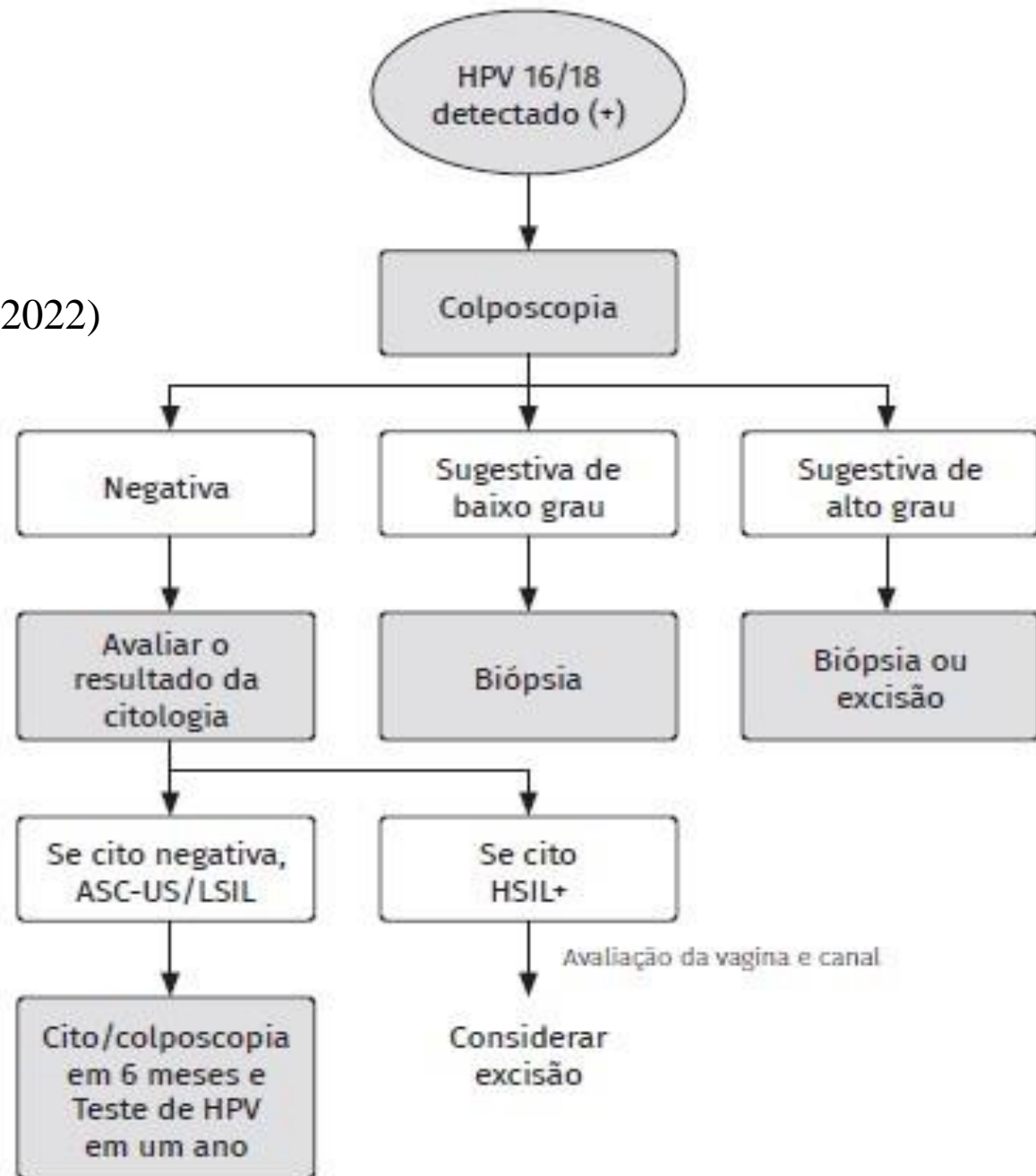
Cito: citologia; HSIL+: ASC-H, HSIL, AGC ou AIS.



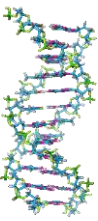
HPV

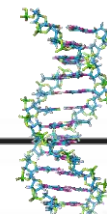
13

(CARVALHO et al, 2022)



Cito: citologia; HSIL+: ASC-H, HSIL, AGC ou AIS.



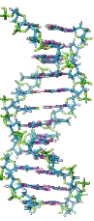
**Table 1_Summary of HPV Molecular Diagnostic Techniques**

Test	Principle	Comments	Low-Risk Strains	High-Risk Strains
Reverse Line Blot (Roche)	Target amplification; genotyping; consensus PCR and line blot	Research use only	6, 11, 61, 62, 64, 67, 69, 72, 81, 89	16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51 to 59, 66, 68, 73, 82, 83, 84
LINEAR ARRAY HPV Genotyping Test (Roche)	Target amplification; genotyping; PCR followed by line hybridization	CE-Marked for use in Europe	6, 11, 40, 42, 53, 54, 55, 61, 62, 64, 67, 69, 70, 71, 72, 81, 84, IS39, CP6108	16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82, 83
INNO-LIPA HPV Genotyping Extra (Innogenetics)	Target amplification; genotyping; SPF10 primers at L1 region, reverse hybridization	CE-Marked for use in Europe	6, 11, 40, 43, 44, 54, 70	16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 71, 73, 74, 82
AMPLICOR HPV (Roche)	Target amplification; detection; PCR and nucleic acid hybridization	CE-Marked for use in Europe	N/A	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68
PapilloCheck (Greiner Bio-One)	Target amplification of E1 for genotyping; PCR/DNA-array	CE-Marked for use in Europe	6, 11, 40, 42, 43, 44	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 82
Multiplex HPV Genotyping Kit (Multimetrix)	Target amplification; genotyping; PCR and fluorescent bead array	Research use only	6, 11, 42, 43, 44, 70	16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82
GenoID Real-Time HPV Assay (GenoID)	Target amplification for detection or semi-genotyping; real-time PCR	CE-Marked for use in Europe	6, 11, 42, 43, 44 (Lightcycler only)	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68
Digene Hybrid Capture II (HC2) HR HPV DNA Test (Digene/Qiagen)	Signal amplification for detection; hybrid capture, semi-quantitative	FDA-approved	N/A	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68
Digene Hybrid Capture II (HC2) HPV DNA Test (Digene/Qiagen)	Signal amplification for detection; hybrid capture, semi-quantitative	FDA-approved	6, 11, 42, 43, 44	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68
CareHPV (Qiagen)	Signal amplification for detection; rapid test related to HC2	For use in developing countries	N/A	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68
Cervista HPV HR (Hologic)	Signal amplification for detection; Invader technology	FDA-approved	N/A	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68
Cervista HPV 16/18 (Hologic)	Signal amplification for genotyping; Invader technology	FDA-approved	N/A	16, 18

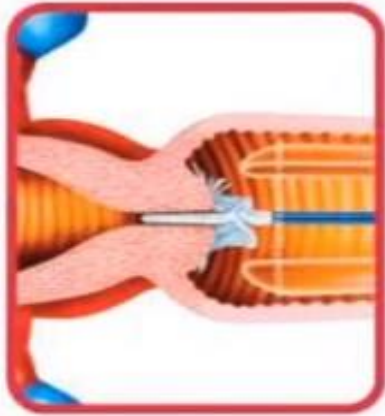
(ARNEY; BENNETT, 2010)

HPV

15



1. Coletar



2. Destacar



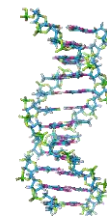
3. Enviar



100% das células coletadas são transferidas para o frasco.



CAPTURA HÍBRIDA



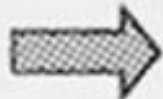
Desnaturação do DNA



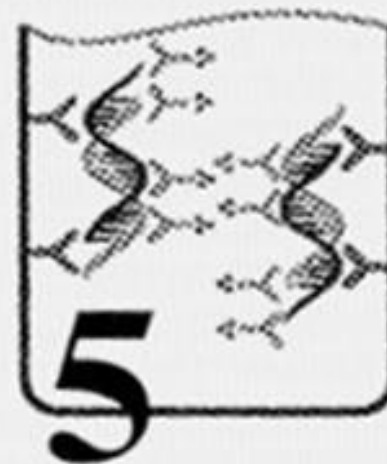
Hibridização com sonda de RNA



Captura dos híbridos

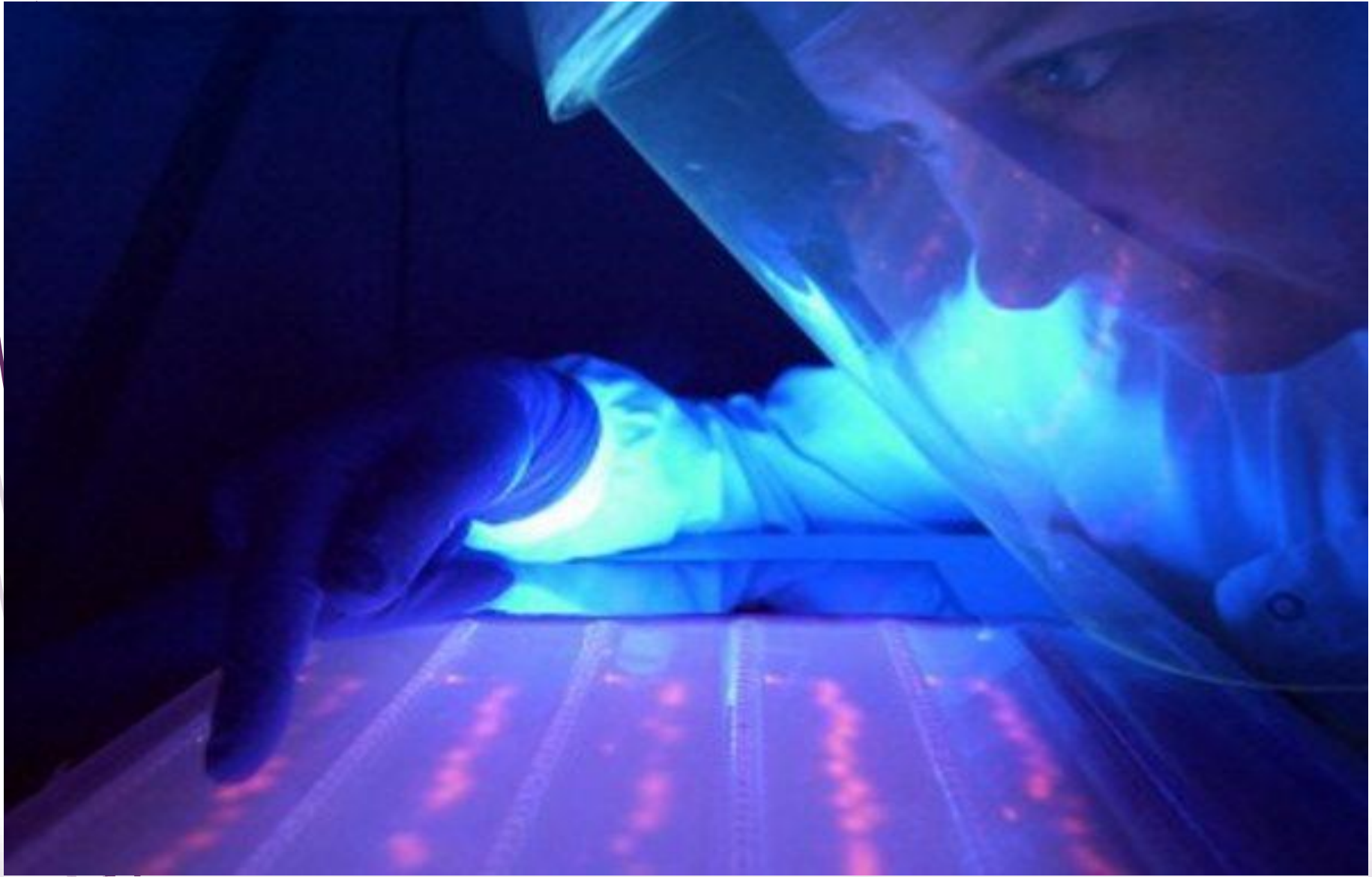
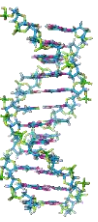


Reação com
anticorpo conjugado

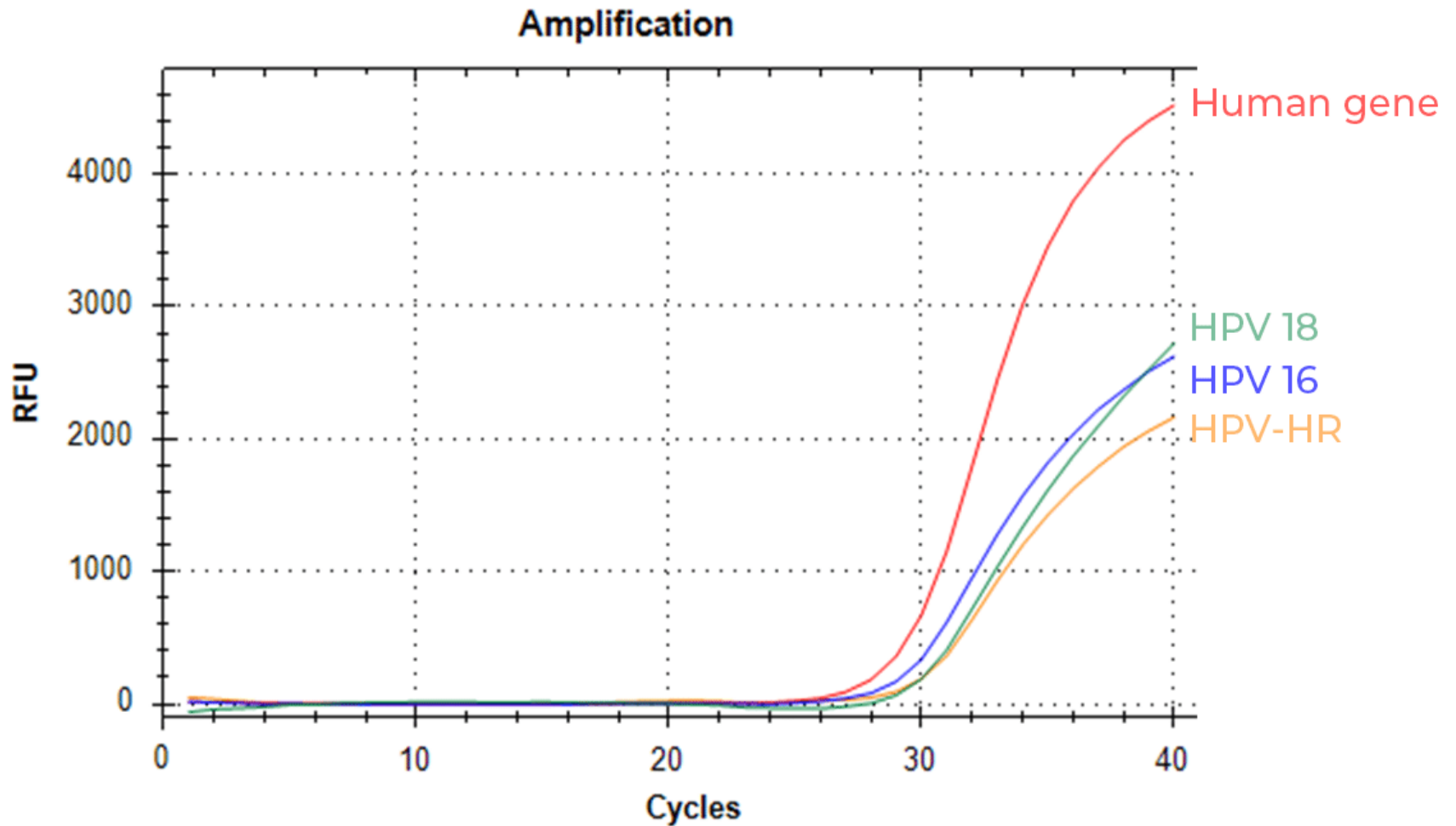
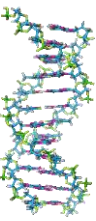


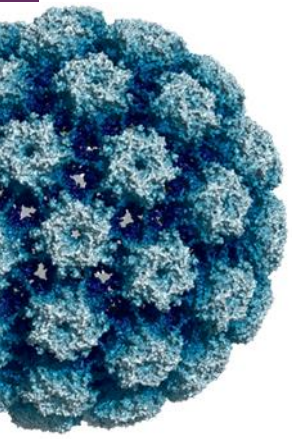
Amplificação do
sinal por
quimioluminescência

PCR/ELETROFORESE



RT-qPCR





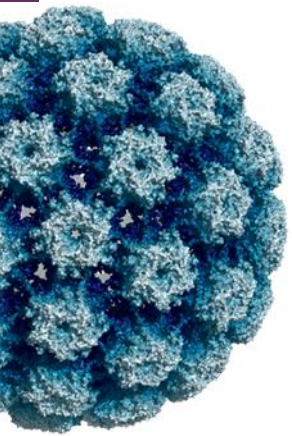
Multi HPV Flow-Chip

Teste de diagnóstico *in vitro* para a **detecção** e **genotipagem simultânea** de 35 diferentes tipos do HPV,

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

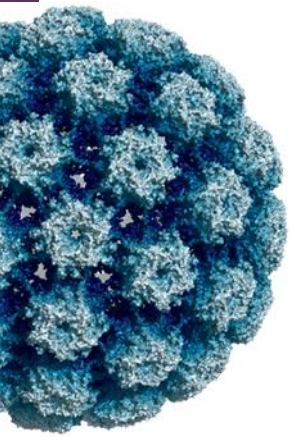
Baixo risco (**6**, **11**, 40, 42, 43, 44, 54, 55, 61, 62, 67, 69, 70, 71, 72, 81 e 84)

Amostras de swabs citológico e retal, tecidos em parafina e citologia em meio líquido.



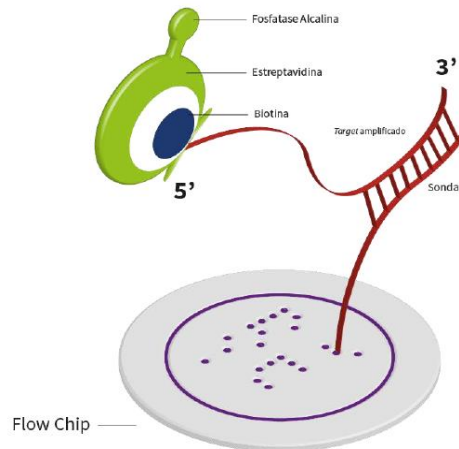
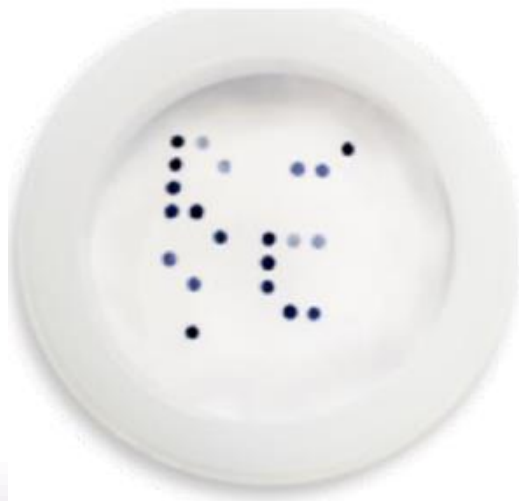
Multi HPV Flow-Chip

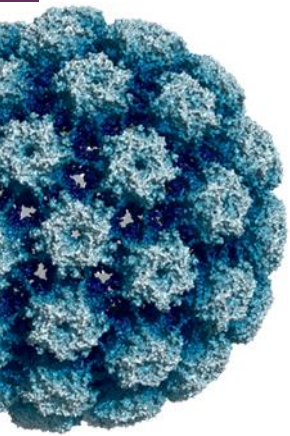
- ❖ Identifica a presença do **material genético do patógeno**
- ❖ Permite detecção já nos **primeiros dias da infecção**
- ❖ Permite identificar infecção **antes do aparecimento de sintomas**
- ❖ Técnica permite **rápida liberação** (aproximadamente **4 h**)
- ❖ Técnica de **interpretação assertiva**
- ❖ Metodologia com **alta sensibilidade** e **especificidade**
- ❖ **Mais sensível** e **informático** que os métodos de sorologia



Multi HPV Flow-Chip

O princípio do ensaio é baseado na **amplificação da região L1 do HPV** por **PCR Multiplex**, seguido por **hibridização reversa (*Dot Blot*)** com sondas específicas de DNA imobilizadas em um chip composto por membrana de nylon (**Tecnologia Flow-Chip**)





Multi HPV Flow-Chip

- ❖ **Sondas** de DNA fita simples são utilizadas para **localizar um gene do HPV**
- ❖ Detecção de **sequências de nucleotídeos específicas do HPV**
- ❖ Membrana de nylon: **Tecnologia Flow-Chip**
- ❖ Ligação dos produtos de PCR **biotinilados** às sondas complementares presentes na membrana
- ❖ Sinal de hibridização: **Reação colorimétrica enzimática**
- ❖ Substrato + cromógeno = **precipitado roxo;**
Presença do alvo





Multi HPV Flow-Chip



	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	44/45		26	56	11	70
D	U	45	68	54	84	31	58	40	71
E	16	51	73	61	B	33	59	22/55	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	

Legenda:

- **B**: Controle de hibridização.
- **C**: Controle de amplificação endógeno MM HPV (fragmento B-Globina humana).
- **U**: Sonda Universal para HPV.
- **X**: Sondas específicas para cada genótipo.



hybriSpot24



INOVAÇÃO!
TECNOLOGIA!
QUALIDADE!

PCR
Convencional
Multiplex

Hibridização
Reversa Chip

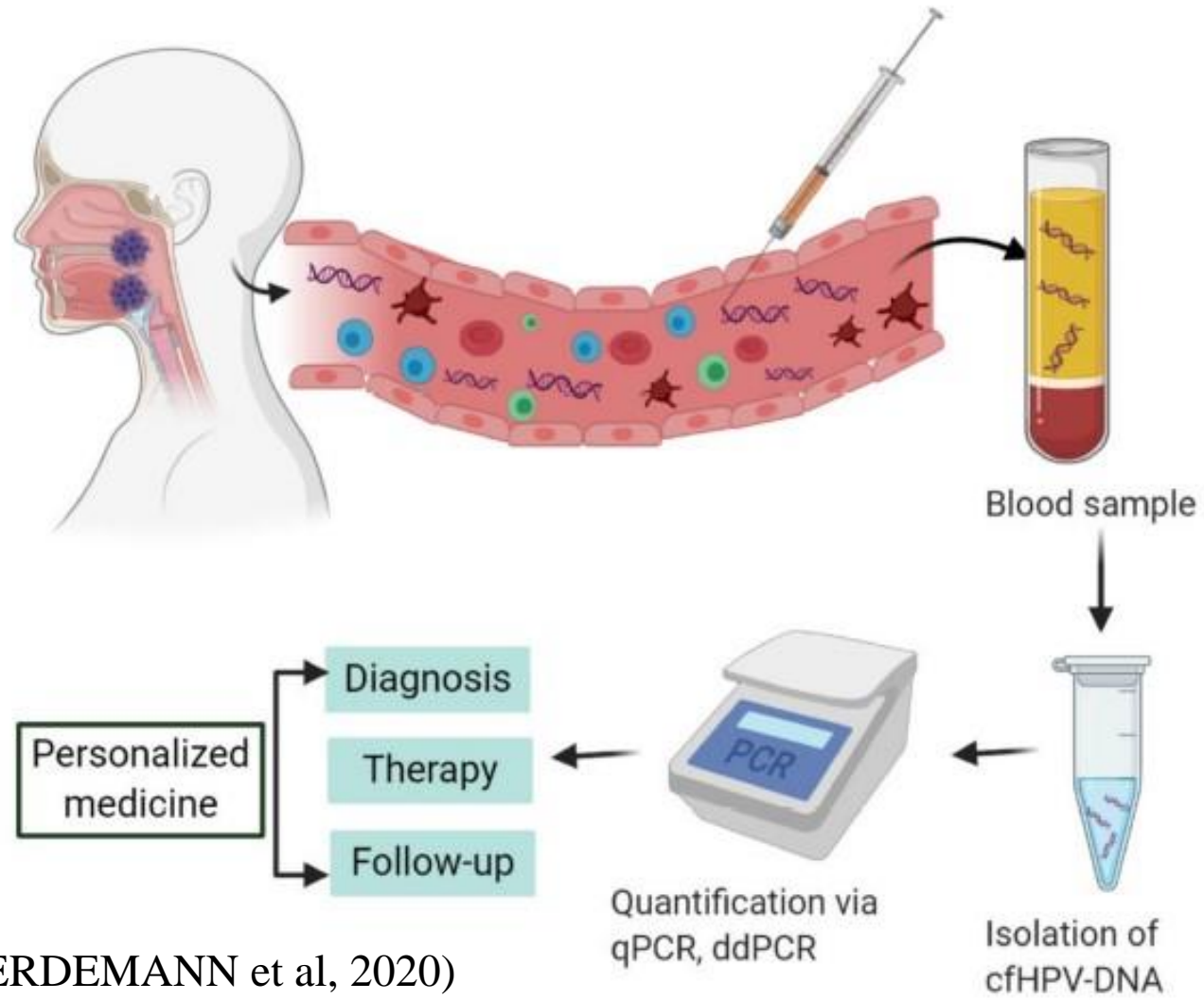
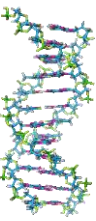
Marcação
Estreptavidina

Revelação
Cromógeno-
Substrato



HPV

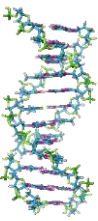
25



(WUERDEMANN et al, 2020)

Primary Tumor CTC Red blood cells White blood cells Platelets ctDNA

REFERÊNCIAS



ARNEY, A.; BENNETT, K. M. Molecular diagnostics of human papillomavirus. **Laboratory Medicine**, v. 41, n. 9, p. 523-530, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero**. 2016.

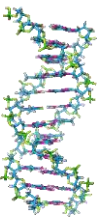
BRASIL. Ministério da Saúde . **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis – IST**. 2022.

CARDIAL, M.; et al. Papilomavírus humano (HPV). **Rev Femina**, v. 47, n.2, p. 94-100, 2019.

CARVALHO, C.F; et al. Rastreamento do câncer do colo do útero com teste de DNA-HPV: atualizações na recomendação. **Rev Femina**. 2022;50(4):200-7.

MADIGAN, M.; et al. **Microbiologia de Brock**-14^a Ed. Artmed Editora, 2016.

REFERÊNCIAS



KROUPIS, C.; VOURLIDIS, Nikolaos. Human papilloma virus (HPV) molecular diagnostics. **Clinical chemistry and laboratory medicine**, v. 49, n. 11, p. 1783-1799, 2011.

KUMAR, V. **Robbins & cotran-patologia bases patológicas das doenças** 8a edição. Elsevier Brasil, 2010.

NETO, J.C.S. **Citologia Clínica do trato genital feminino**. Thieme Revinter, 2020.

PINTO, A.P; et al. Co-fatores do HPV na oncogênese cervical. **Revista da associação médica brasileira**, v. 48, p. 73-78, 2002.

WUERDEMANN, N.; et al. Cell-Free HPV-DNA as a biomarker for oropharyngeal squamous cell carcinoma—a step towards personalized medicine?. **Cancers**, v. 12, n. 10, p. 2997, 2020.



Setor de Biologia Molecular

Muito Obrigado!!!

Agledison Vieira do Nascimento
Farmacêutico

Juazeiro do Norte-CE
2023