

# Rol del laboratorio en el apoyo y monitoreo de la introducción de la vacuna contra Virus Papiloma Humano (HPV)

*Dra. María Alejandra Picconi*

Jefe Servicio Virus Oncogénicos

Laboratorio Nacional de Referencia de HPV

Laboratorio Regional de Referencia de HPV, OPS- OMS HPV LabNet

Instituto Malbrán, Buenos Aires

E-mail: [mapicconi@anlis.gov.ar](mailto:mapicconi@anlis.gov.ar)

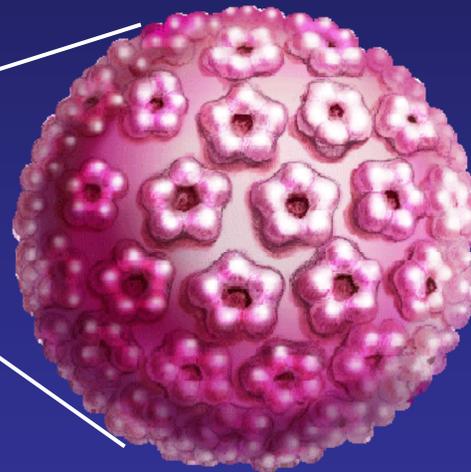
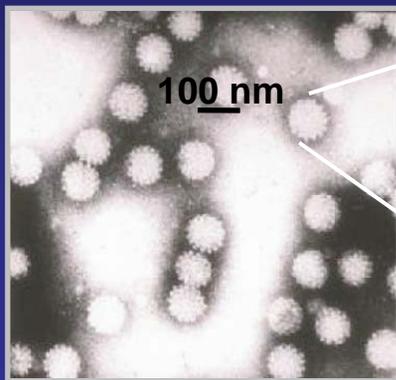


# Temario

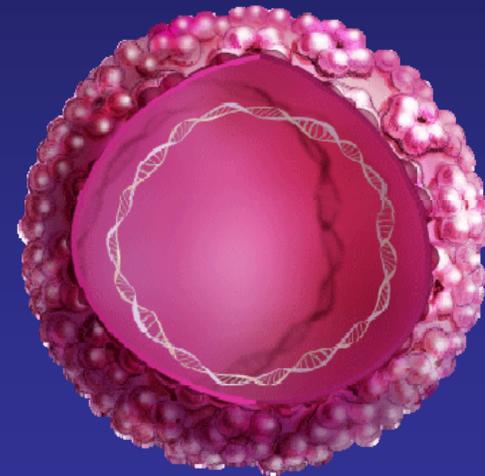
- **Virus Papiloma Humano (HPV): un virus especial**
- ¿Por qué vigilar la infección por HPV?
- Introducción a los métodos de laboratorio para el estudio de la infección por HPV. Criterio de selección de métodos según el objetivo
- Red Argentina de Laboratorios de HPV: un primer paso que sirvió de experiencia
- Rol del Laboratorio Regional de Referencia para OPS dentro de la HPV LabNet (OMS): iniciativas para organizar una Red de Lab Regional para la vigilancia de HPV

# Virus papiloma humano (HPV)

- Familia *Papillomaviridae*
- Tropismo epitelial: infecta piel y mucosas



Cápside proteica,  
sin envoltura



Genoma: ADN circular  
(8.000 pb)

(Burd EM. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16:1–17. )

## CLASIFICACION DE LOS HPV: no todos los tipos virales son igualmente oncogénicos

Los HPV se clasifican en *tipos* en base a diferencias en sus genes

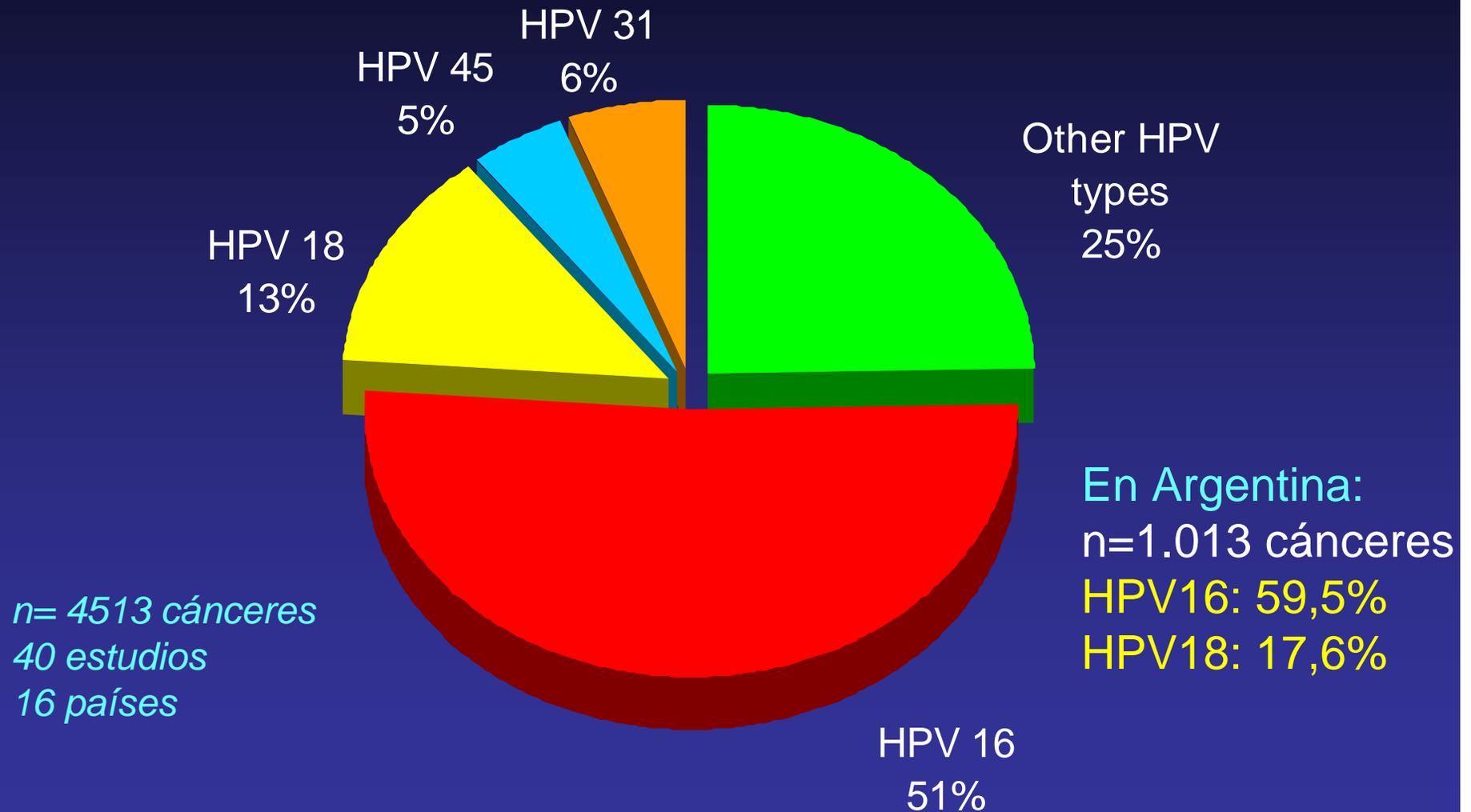
Tracto anogenital: **40 tipos de HPV**

HPVs de **Bajo riesgo**: 6,11,40,42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 y CP6108

HPVs de **Alto riesgo**: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59

(Muñoz et al, Vaccine 2006)

## Association between different HPV types and cervical cancer in Latin America and the Caribbean: a systematic review of epidemiological studies.



*n= 4513 cánceres*  
*40 estudios*  
*16 países*

**En Argentina:**  
**n=1.013 cánceres**  
**HPV16: 59,5%**  
**HPV18: 17,6%**

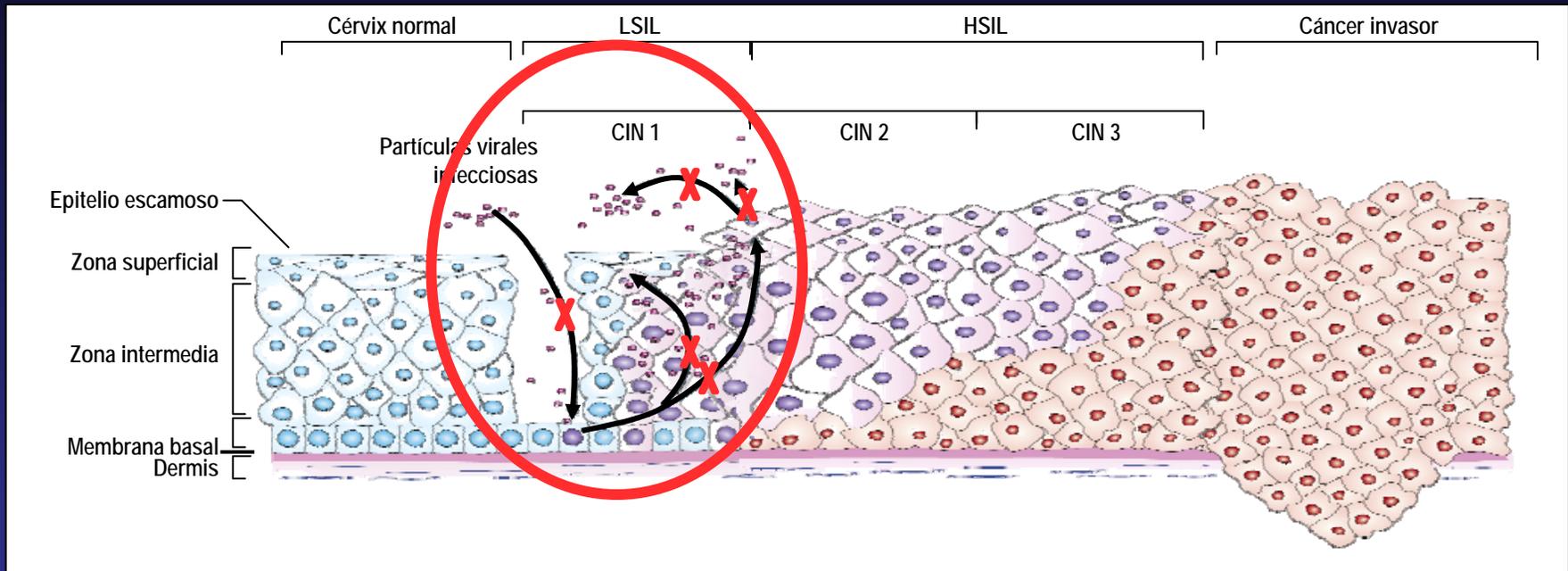
*(Ciapponi y col, 24<sup>th</sup> Int Papillomavirus Conference, Beijing 2007)*

# Temario

- Virus Papiloma Humano (HPV): un virus especial
- **¿Por qué vigilar la infección por HPV?**
- Introducción a los métodos de laboratorio para el estudio de la infección por HPV. Criterio de selección de métodos según el objetivo
- Red Argentina de Laboratorios de HPV: un primer paso que sirvió de experiencia
- Rol del Laboratorio Regional de Referencia para OPS dentro de la HPV LabNet (OMS): iniciativas para organizar una Red de Lab Regional para la vigilancia de HPV

# CARCINOGENESIS CERVICAL INDUCIDA POR HPV

## Vacuna



Infección por HPV → **inmunoprevenible**



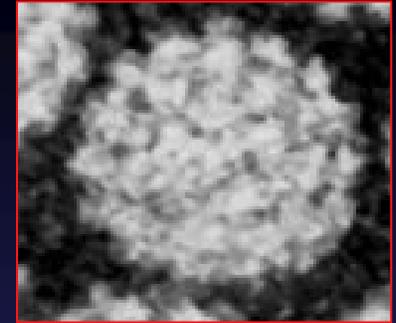
**VIGILANCIA**

*(Wood y col, Vaccine 2006; Stanley y col, Vaccine 2006)*

# Temario

- Virus Papiloma Humano (HPV): un virus especial
- ¿Por qué vigilar la infección por HPV?
- **Introducción a los métodos de laboratorio para el estudio de la infección por HPV. Criterio de selección de métodos según el objetivo**
- Red Argentina de Laboratorios de HPV: un primer paso que sirvió de experiencia
- Rol del Laboratorio Regional de Referencia para OPS dentro de la HPV LabNet (OMS): iniciativas para organizar una Red de Lab Regional para la vigilancia de HPV

# HPV: un virus especial



- **No es cultivable**
- **Detección de anticuerpos: baja sensibilidad**
  - Exposición natural: <70% seroconversión
- **El estudio del HPV requiere la detección del genoma viral**
  - Numerosos tipos virales (40 en tracto anogenital)
  - Muestra de células/tejido del sitio de la infección
  - Sólo se detectan infecciones actuales.
- **La infección por HPV no se trata, sino la enfermedad asociada.**

# Técnicas de estudio de HPV en el laboratorio virológico (I)

**Detección de ácidos nucleicos virales mediante:**

**A. Amplificación génica por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

**B. Hibridación con señal amplificada**

# Técnicas de estudio de HPV en el laboratorio virológico (II)

## A. Detección de ácidos nucleicos virales mediante PCR

- **Primers *consenso***
- **Primers *tipo-específicos***

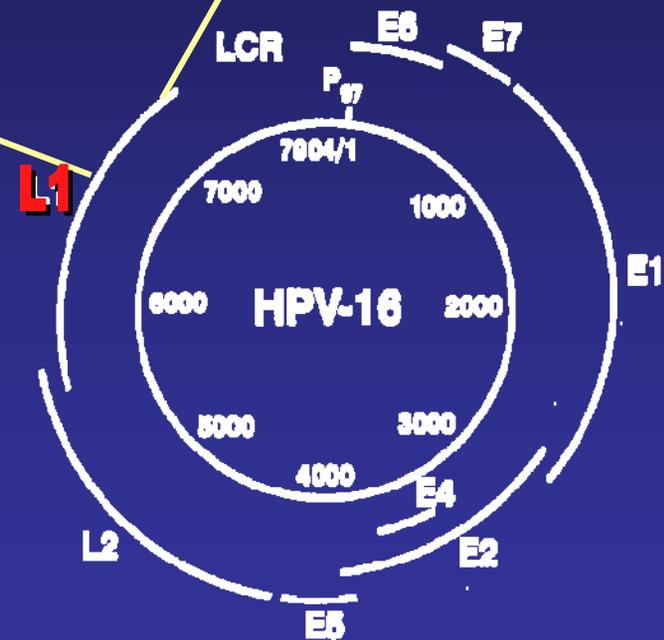
# Detección y tipificación de HPV por *PCR consenso*



## Primers consenso:

- ★ MY 09, 11 / PGMY (450 pb)
- ★ GP 5+, 6+ (140 pb)
- ★ SPF (65 pb)

**Requieren un paso posterior a la PCR para la tipificación viral**



(Bernard y col, 1994; Jacobs y col., 1997; Gravitt y col, 1998; Kleter y col, 1999)



# Detección y tipificación de HPV por *PCR tipo específica*

## Primers *tipo-específicos*

- Regiones blanco: fragmentos de E6 o E7
- PCR convencional o PCR en tiempo real



**Requiere una reacción de PCR para cada tipo viral**

(Gravitt y col., *J. Virol Methods* 2003)

# Técnicas de diagnóstico de HPV en el laboratorio virológico (III)

## **B.** Detección de ácidos nucleicos virales por hibridación con señal amplificada

- **Hibridación *in situ***
- **Hibridación en fase líquida:  
Captura de híbridos (hc2)**

# Detección de HPV por captura de híbridos

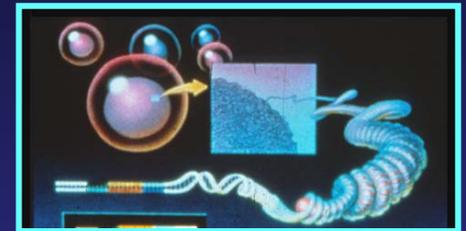
- *Mezcla A* (5 HPV BR): HPV 6, 11, 42, 43 y 44  
*Mezcla B* (13 HPV AR): HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68
- **Se mide luz emitida:** proporcional a la cantidad de DNA viral
- Base para la reciente prueba *Care HPV: más rápida y accesible* (Proyecto piloto PATH en Perú, Uganda, India y Vietnam)

# Criterio de selección de métodos según el objetivo

## Sensibilidad *analítica* vs. sensibilidad *clínica*

- Objetivo analítico = Detectar HPV

**Sensibilidad *analítica*:** *número de genomas que son identificados en una muestra por un determinado ensayo*



- Objetivo clínico = Detectar enfermedad asociada a HPV

**Sensibilidad *clínica*:** *proporción de mujeres con enfermedad, identificadas por un ensayo con resultado positivo*



# Vigilancia laboratorial de la infección por HPV en la era vacunal

## Métodos de *alta sensibilidad analítica*

[1-10 copias] (basados en PCR)

- Evaluación del impacto de la vacunación sobre la prevalencia de los genotipos relacionados con la vacuna (tipos incluidos en la fórmula y protección cruzada contra virus relacionados)
- Discriminación de los tipos presentes en infecciones múltiples
- Monitoreo de un potencial reemplazo de genotipos

(Stanley y col, *Vaccine* 2006; Pagliusi y col, *Dis Markers*, 2007; Meeting Report, OMS, 2007 )

# Tamizaje poblacional en la era vacunal

**Métodos de *alta sensibilidad clínica* [5.000 copias]**  
(Hibridación con señal amplificada, hc2)

→ principal herramienta para el rediseño del tamizaje

- **Beneficio adicional:** registro de prevalencia de HPV y enfermedades asociadas. Tipificación viral selectiva sobre muestras HPV +.
- Ayudaría a determinar la duración de la protección
- Deben desarrollarse algoritmos adaptados a las situaciones locales

*(Franco y col; Vaccine 2006; Pagliusi y col, Dis Markers, 2007; Meeting Report, OMS, 2007)*

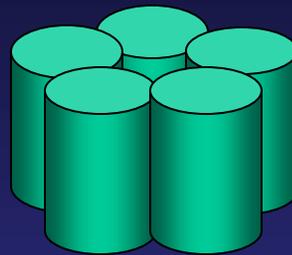
# Serología para HPV

Depende de la conformación del antígeno usado



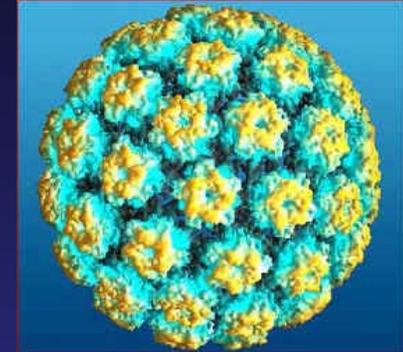
Monómero

5X



Capsómero  
pentamérico

72X



Cápside  
(VLP)

## Antígenos:

- VLP- L1 (ELISA, RIA)
- Pseudo- virus (Neutralización, SEAP assay)
- Capsómero

Dificultades para definir los puntos de corte para el resultado positivo.

Búsqueda de antígenos alternativos

*(Pagliusi y col, Dis Markers, 2007; Meeting Report, OMS, 2007)*

# Serología para HPV

- **Respuesta humoral: pobre, demorada o nula**  
(25-50% HSIL y cáncer: seronegativos)
- **Ac anti cápside (L1, L2) (+) , DNA (-)**  
⇒ “cicatriz inmunológica”. NO requiere manejo clínico
- **Ac anti L1/L2 (+)** ⇒ exposición al virus (infección pasada o presente)
- **Ac anti E6/E7:** - hasta 50% (+) en mujeres con cáncer de cérvix  
- raro detectarlos en mujeres sanas  
NO validado como marcador de cáncer oculto

¿ Es útil la serología en la práctica clínica? **NO, por ahora**

*(Ferguson y col, Int J Cancer, 2006; Pagliusi y col; Dis Markers, 2007)*

# Serología para HPV

## Ha demostrado ser útil para:

- Estudios epidemiológicos basados en la seropositividad para HPV
- Comprensión de la historia natural de la infección por HPV y cáncer

*(Ferguson y col, Int J Cancer, 2006; Pagliusi y col, Dis Markers, 2007)*

# Rol de la serología en la vigilancia post-vacunal

- Evaluar la exposición previa y la seroconversión post - vacunal
- Monitorear los niveles de Ac y vigilar la correlación con protección y su duración
- Evaluar posible requerimiento de refuerzos

# Temario

- Virus Papiloma Humano (HPV): un virus especial
- ¿Por qué vigilar la infección por HPV?
- Introducción a los métodos de laboratorio para el estudio de la infección por HPV. Criterio de selección de métodos según el objetivo
- **Red Argentina de Laboratorios de HPV: un primer paso que sirvió de experiencia**
- Rol del Laboratorio Regional de Referencia para OPS dentro de la HPV LabNet (OMS): iniciativas para organizar una Red de Lab Regional para la vigilancia de HPV

# RED ARGENTINA DE LABORATORIOS DE HPV

**Objetivo general: Diagnóstico y prevención de la infección por HPV y sus lesiones asociadas.**

**Objetivos particulares:**

● ***Diagnóstico de laboratorio:***

Establecer **centros regionales capacitados** para la detección de HPV *con control de calidad.*

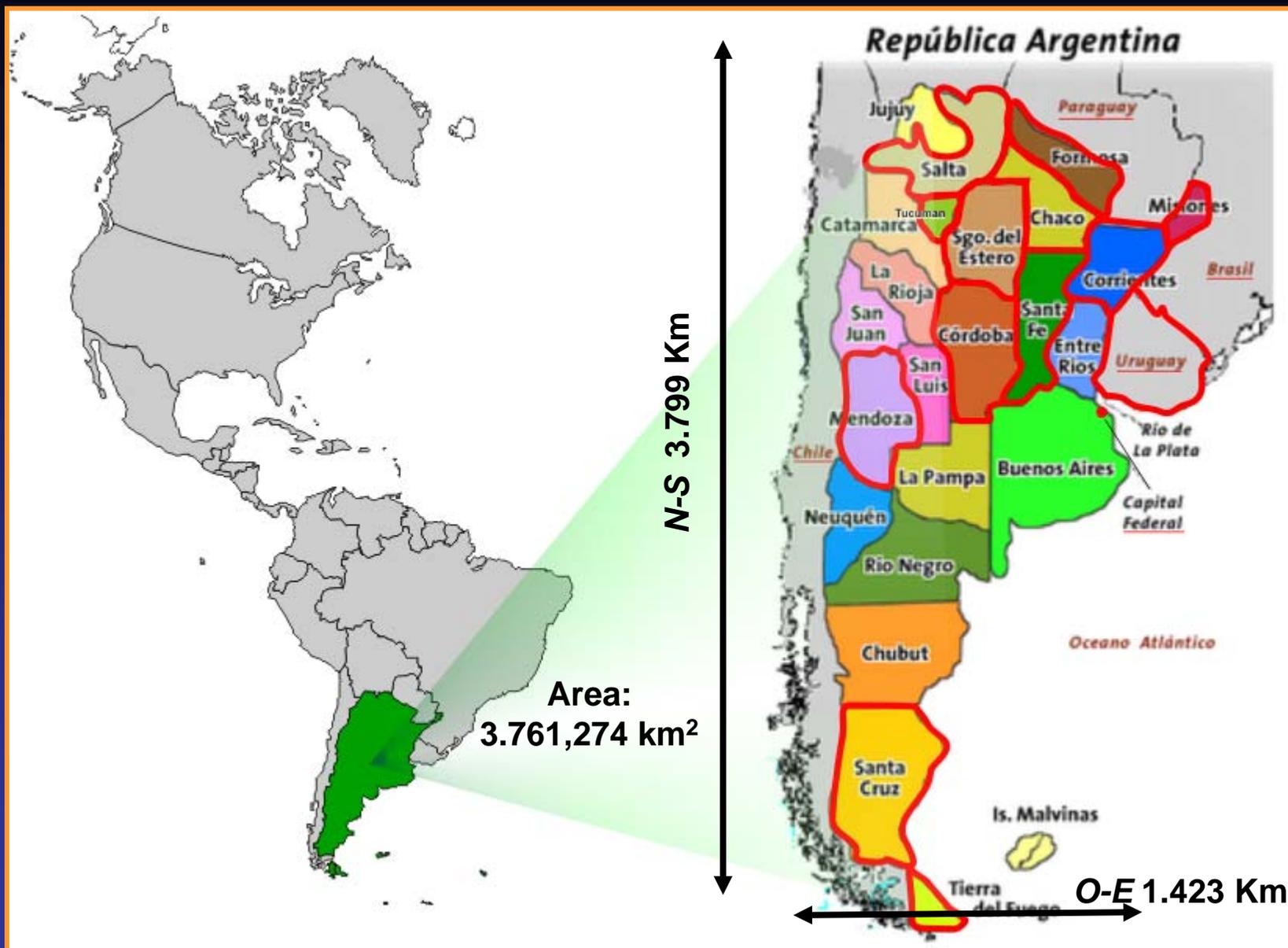
**Normatizar las técnicas de diagnóstico molecular** y unificar los criterios de información e interpretación de resultados.

*Fortalecer/construir la capacidad para la vigilancia*

● ***Investigación***

● ***Apoyo los Programas Nacionales de Vigilancia Epidemiológica, de Cáncer y de Inmunizaciones del Ministerio de Salud***

# Red Argentina de Laboratorios de HPV



Las 12 provincias argentinas que actualmente son parte de esta Red aparecen con bordes rojos.

Punto rojo: Lab. Nac. de Referencia en Buenos Aires (Instituto Malbran)

# Red Argentina de Laboratorios de HPV

## Actividades realizadas



- **Entrenamiento y actualización, a través de una activa transferencia tecnológica:** cursos y pasantías
- **Asesoramiento:** a distancia e in situ .
- **Taller de la Red de Lab. de HPV** (2004, 2005, 2006; 2008)

*Actividades apoyadas por OPS Washington (Dra. Ana Bispo) y el Ministerio de Salud de Argentina*

La clave del éxito: una activa interacción "de ida y vuelta"

# Entrenamiento y actualización . . .

## II Taller de la Red Argentina de Laboratorios de HPV



INEI-ANLIS Malbrán  
Buenos Aires, 2005

# Formando recursos humanos . . .

Curso teórico y práctico:  
**HPV y CANCER: UN ENFOQUE  
MULTIDISCIPLINARIO**

*Instituto Malbrán*

*Buenos Aires, Noviembre 2007*



Apoyado por el Programa de Cooperación Científica entre Países Sudamericanos y el Instituto Pasteur de Paris  
**(Programa AMSUD-Pasteur)**

Participaron estudiantes de países latinoamericanos, apoyados por OPS, Washington.



## Diseminando información actualizada . . .

### *International HPV Symposium*

*Buenos Aires, 30 Sept-1 Oct, 2008*

*1,000 participantes*



#### Organizado por:

- International Papillomavirus Society
- Argentine Association of Microbiology (AAM)
- Argentine Society of the Lower Genital Tract & Colposcopy



# Temario

- Virus Papiloma Humano (HPV): un virus especial
- ¿Por qué vigilar la infección por HPV?
- Introducción a los métodos de laboratorio para el estudio de la infección por HPV. Criterio de selección de métodos según el objetivo
- Red Argentina de Laboratorios de HPV: un primer paso que sirvió de experiencia
- **Rol del Laboratorio Regional de Referencia para OPS dentro de la HPV LabNet (OMS): iniciativas para organizar una Red de Lab Regional para la vigilancia de HPV**

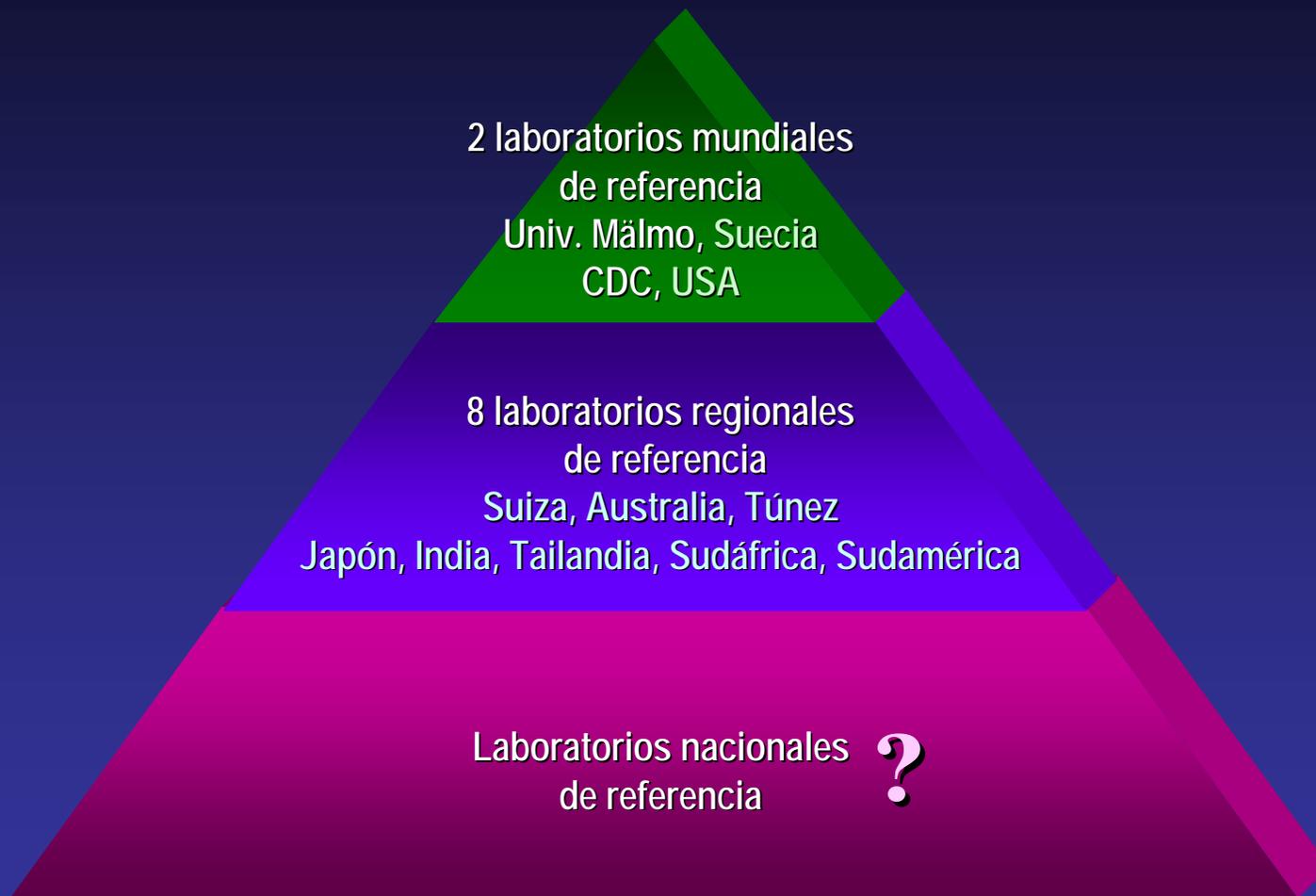


# Red Global de Laboratorios de HPV: *Misión*



“Generar una Red de Laboratorios que puedan realizar una **efectiva vigilancia y monitoreo del impacto de la vacunación contra HPV**, a través de la actualización, capacitación y el establecimiento de un programa de control de calidad ”

# Red Global de Laboratorios de HPV: *Estructura*



**Centro colaborador: Inst. Nac. de Estándares Biológicos y Control, UK**

**Visita evaluadora para ser Laboratorio Regional de Referencia de HPV  
– HPV LabNet OPS/OMS-  
Instituto Malbrán - Buenos Aires, octubre 2008**



**Evaluadoras: E.Unger (CDC, USA); A.Bispo (OPS, Washington);  
T.Zhou (OMS, Ginebra); E. de Villiers (DKFZ, Alemania)**



# HPV LabNet Laboratories



## GLOBAL WHO HPV REFERENCE LABORATORIES

**Prof. Joakim Dillner**  
University of Lund  
SE-20502 Malmö, SWEDEN

**Dr. Elizabeth Unger**  
Centers for Disease Control  
Atlanta, GA 30333, USA

## REGIONAL WHO HPV REFERENCE LABORATORIES

**Prof. Anna-Lise Williamson**  
Institute of Infectious Disease and Molecular Medicine  
Faculty of Health Sciences  
University of Cape Town  
Cape Town, SOUTH AFRICA  
**Region: Africa**

**Dr. Maria Alejandra Picconi**  
Oncogenic Viruses Service  
National Reference Laboratory for Papillomavirus  
National Institute of Infectious Diseases - ANLIS "Dr. Malbran"  
Buenos Aires, ARGENTINA  
**Region: America Region (PAHO)**

**Dr. Emna Ennaifer-Jerbi**  
Tunis Pasteur's Institute  
Belvédère, TUNISIA  
**Region: Eastern Mediterranean**

**Assistant Prof. Denise Nardelli-Haeffliger**  
Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)  
Lausanne, SWITZERLAND  
**Region: Europe**

**Dr. Alok Chandra Bharti**  
Division of Molecular Oncology  
Institute of Cytology and Preventive Oncology  
Noida - 201 301, INDIA  
**Region: South-East Asia**

**Dr. Sukhon Sukvirach**  
National Cancer Institute  
Rajthewe, Bangkok 1040, THAILAND  
**Region: South-East Asia**

**Prof. Suzanne Garland**  
Department of Microbiology and Infectious Diseases  
The Royal Women's Hospital  
Parkville, VIC 3052, AUSTRALIA  
**Region: Western Pacific**

**Dr. Iwao Kukimoto**  
Center for Pathogen Genomics  
National Institute of Infectious Diseases (NIID)  
Tokyo 208-0011, JAPAN  
**Region: Western Pacific**

# Establishment of a South American HPV Regional Reference Laboratory in Buenos Aires (Argentina)

- **General objective:**
  - To ensure the availability of **competent laboratory** services in the region through the establishment of National Reference Laboratories (NRL).
  - To support the **introduction of HPV vaccines and surveillance of infection and disease.**
- **Particular objectives:**
  - To provide **specialized training** and trouble-shooting assistance to NRL candidates.
  - To **disseminate knowledge on**, and the use of HPV **international standard reagents** to **improve accuracy** of genotyping and serological measurements.
  - To develop **quality assurance/proficiency programs** within the region
  - To support the development of **multinational collaborative projects** as needed, making the most advantage of the capacities of the different NRL
  - To promote and participate in the **exchange of information** about HPV infection and disease burden, among national, regional and global reference laboratories, and WHO Regional Offices.
  - To encourage the interaction of NRL with their **public health authorities** through collaboration in national immunization programs, epidemiologic surveillance, and cancer prevention.

# HPV LabNet OMS: requerimientos para la vigilancia de HPV en la era vacunal

- **Personal entrenado**
- **Infraestructura adecuada**
  - ✓ Laboratorios y equipamiento
- **Protocolos estandarizados y reactivos accesibles**
  - ✓ Genotipificación
  - ✓ Serología
- **Estándares internacionales de OMS**
  - ✓ **1º estándar para serología:** suero *anti-HPV 16*, medido en Unidades Internacionales (UI) (*Aprobado en 2007*). Suero *anti-HPV 18* (*aprobado en 2008*)
  - ✓ **Estándar para genotipificación:** *plásmidos recombinantes con el genoma completo de HPV 16 y HPV18* (*Aprobado en 2009*)
- **Distribución de paneles de control de calidad**

# What we can offer today

- **Specialized training**

- *A five day-theoretical and practical course* “HPV: pathogenesis and diagnosis”. Practical work: HPV detection and typing. **April 2010**
- *A two day-HPV Laboratory Network Workshop*: to update and discuss topics of common interest related to the organization and reinforcement of the infection surveillance in the region.
- *Internships* of professionals and technicians from candidate countries of the Regional HPV Network.
- *On -site visits* in the different countries for evaluation and advice.

- **Quality control**: HPV typing quality will be assessed through the distribution of a control panel whose contents will be defined in agreement with the HPV Global Network..

# Conclusiones (1)

★ Infección por HPV → **inmunoprevenible**



**VIGILANCIA**

★ Diversidad de ensayos para detectar y tipificar  
DNA HPV: selección de métodos según el objetivo.

**Diferenciar:**

**Objetivo analítico** → **Sensibilidad *analítica***

*Detectar el menor número de genomas en una muestra*

**Objetivo clínico** → **Sensibilidad *clínica***

*Mayor proporción de mujeres con enfermedad,  
identificadas por un ensayo positivo*

## Conclusiones (2)

### ★ Vigilancia laboratorial de la infección por HPV en la era vacunal

Métodos de *alta sensibilidad analítica* permitirán evaluar con seguridad que las vacunas prevengan infecciones por tipos virales específicos y sus enfermedades asociadas

### ★ Tamizaje poblacional en la era vacunal

Métodos de *alta sensibilidad clínica* para detectar enfermedad

Algoritmos adaptados a las situaciones locales

## Conclusiones (3)

### ★ La Serología para HPV en la vigilancia post-vacunal

- Evaluar la **exposición previa** y la **seroconversión** post – vacunal
- Monitorear los **niveles de Ac** y vigilar la **correlación con protección**
- Evaluar posible requerimiento de **refuerzos**

## Conclusiones (4)

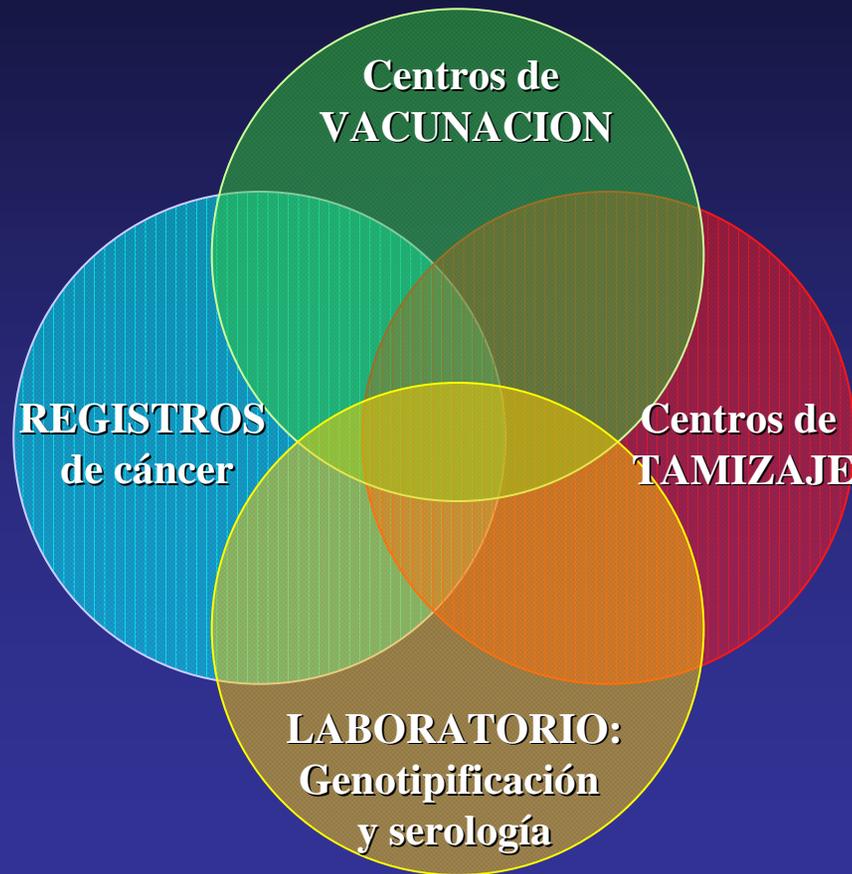
### ★ La vigilancia de HPV desde una perspectiva mundial: Red Global de Laboratorios de HPV – OMS

Apoya la implementación de las vacunas en el mundo a través de laboratorios con técnicas para estudio de HPV



# Vigilancia en la era de la vacuna contra HPV

Suma de esfuerzos y trabajo interconectado



Sistema de salud  
y ciencia  
OMS-OPS  
ONGs  
Industria

**La vigilancia es información analizada para la acción**

# Laboratorio de Virus Oncogénicos Instituto Malbran, Buenos Aires (Argentina)



Visita del Prof. Harald zur Hausen, premio Nobel en Medicina 2008

*Nov. 2009*