



Μοριακή Μικροβιολογία Ιός θηλωμάτων (HPV)

Χρήστος Κρούπης

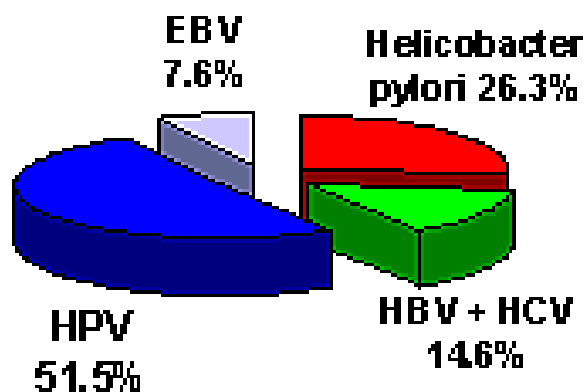
Βιοχημικός-Μοριακός Βιολόγος, MSc, PhD

*Επίκουρος Καθηγητής Κλινικής Βιοχημείας-Μοριακής Διαγνωστικής
Αττικών Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο
Ιατρική Σχολή Αθηνών*

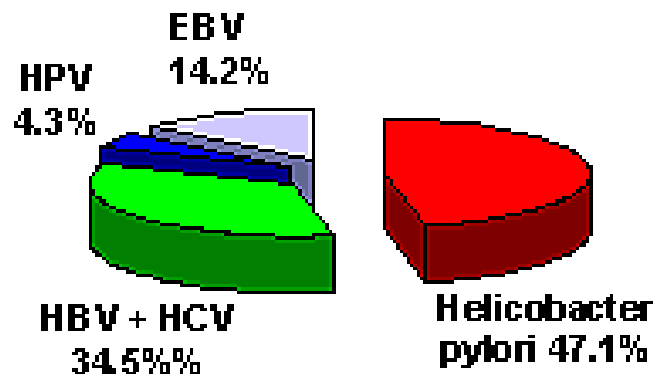
Καρκινογόνοι λοιμώδεις παράγοντες

Αιτία καρκίνου στο ~20% των περιπτώσεων

1 006 544 = 19.9% of total cancer
incidence in females



1 025 524 = 17.7% of total cancer
incidence in males



HPV → # 2 περιβαλλοντικός κίνδυνος για καρκίνο μετά τον καπνό του τσιγάρου!
Υπεύθυνος για το 5% του καρκίνου συνολικά - 10% του καρκίνου στις γυναίκες
Ελπίδα τα προφυλακτικά εμβόλια (και ιδιαίτερα για τον Τρίτο Κόσμο!)

Ανακάλυψη της συσχέτισης με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας → μετά από 30 έτη
βραβείο **Nobel Ιατρικής και Φυσιολογίας** το 2008 στον καθηγητή **Harald zur Hausen!**

Infectious disease and cancer

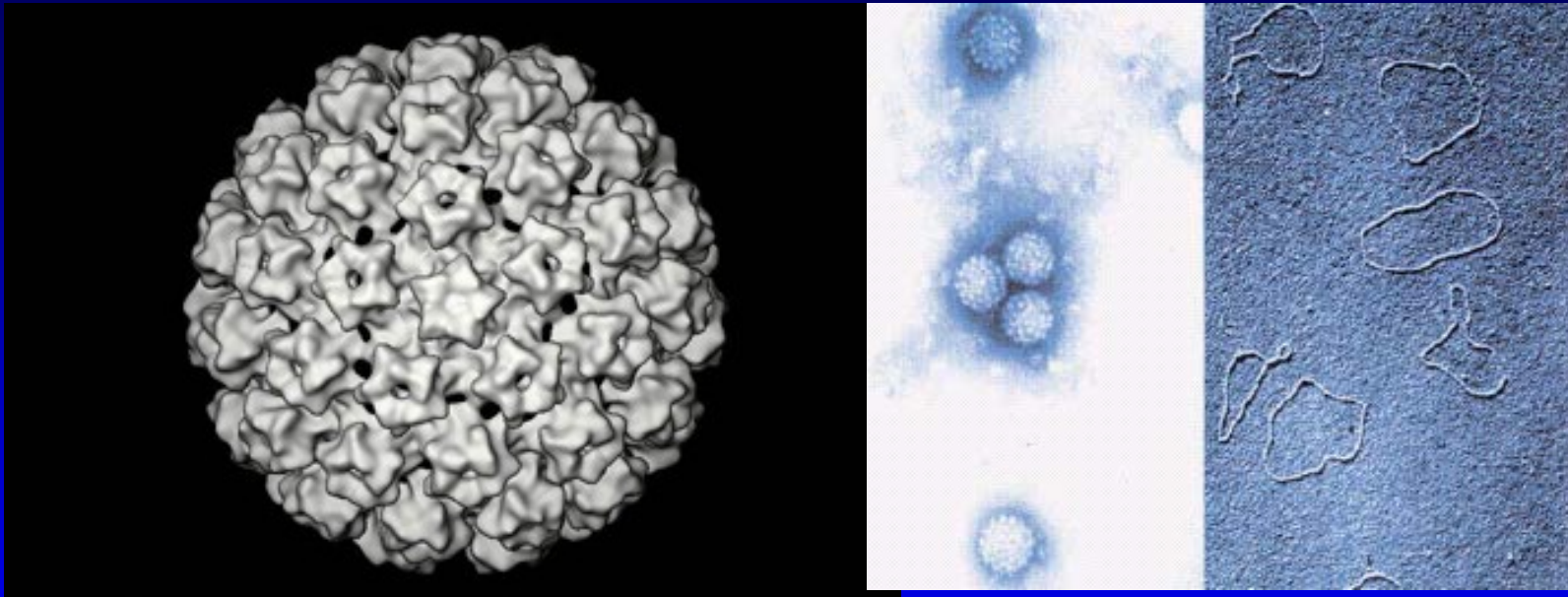
Virus	Tumor	Non-tumor	Genes
HPV	Cervical cancer	Warts	E6, E7
EBV	Burkitt's lymphoma (+ malaria?), PTLD Nasopharyngeal Ca, Hodgkin's lymphoma	Mono- nucleosis	EBNA1, EBERs, c-myc
HHV-8	Kaposi's sarcoma	Castleman's	LANA
HTLV-1	Adult T-cell Leukaemia		Tax
HBV, HCV	Liver Ca (HCC)	Hepatitis, Cirrhosis	
HPylori	Gastric Ca		

Infectious agent in childhood leukaemia? HMTV?

HPV (Human Papilloma Virus)

Ιός ανθρώπινων Θηλωμάτων

55 nm
Golf ball



20εδρικό καψίδιο (72 καψομερίδια) + ~8 Kb δίκλωνο κυκλικό DNA

L1 κύρια πρωτεΐνη καψιδίου ($> 72 \times 5 = 360$ μόρια/καψίδιο)

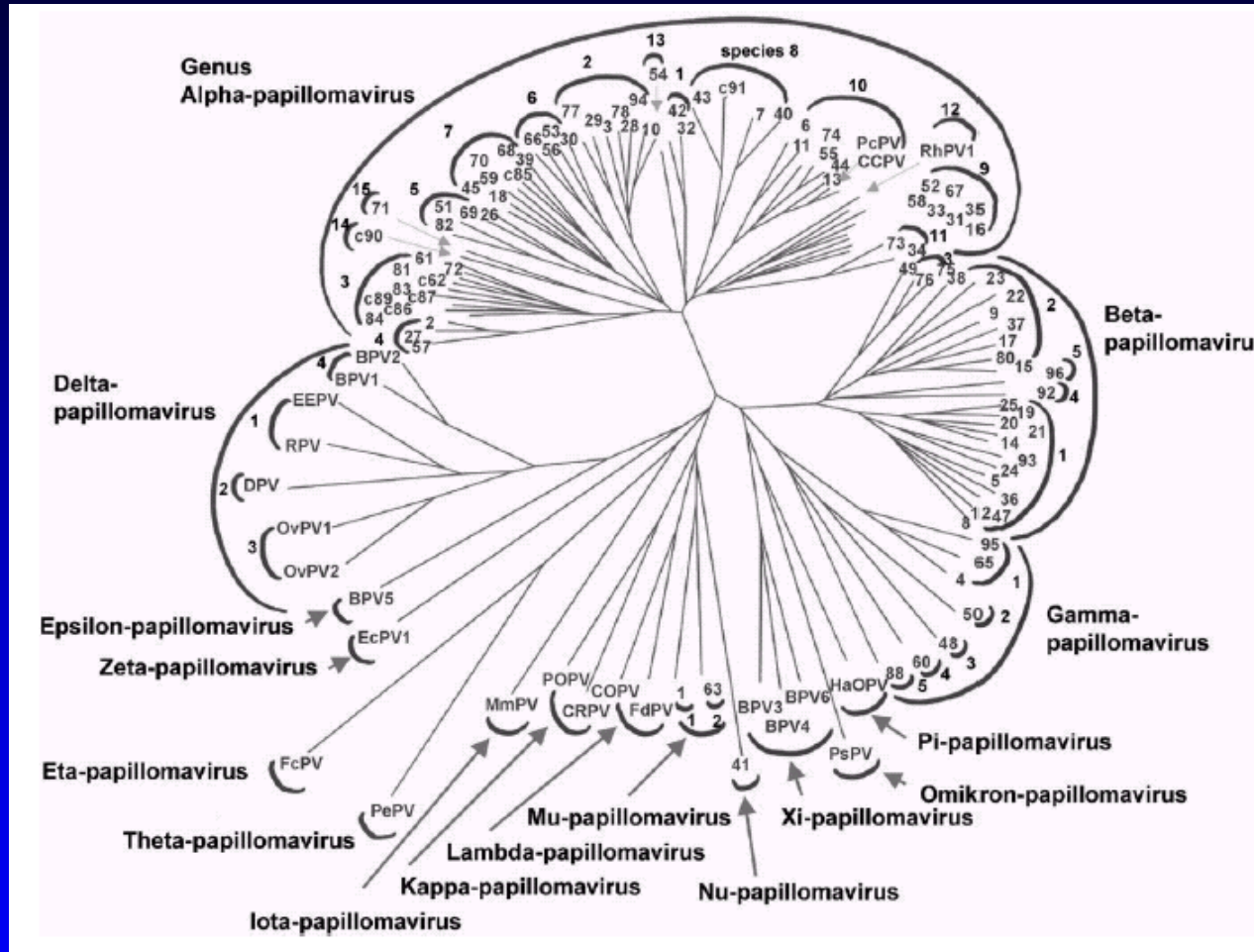
L2 δευτερεύουσα πρωτεΐνη καψιδίου (12 μόρια/καψίδιο)

Δεν καλλιεργείται!

Ταξινόμηση HPV

Οικογένεια: Papovaviridae, 16 γένη (α-π), πολλά είδη (species) και τύποι/υπότυποι/παραλλαγές

L1,
LCR,
E6-
based



HPV εξέλιξη
παράλληλη του
ανθρώπου

Χαμηλό
ποσοστό
μετάλλαξης

Δεν προήρθε
από τα ζώα

Species
specificity –
“tissue tropism”

De Villiers EM et al., Virology 2004;324:17-24

128 τύποι (106 human + 22 animal PVs)

αναγνωρισμένοι επίσημα ως τύποι (διαφέρουν >10%)

[μαζί με υπότυπους (2-10%) + παραλλαγές (<2%): σύνολο ~200]

Είδη HPV

Επιθηλιοτρόπος ιός

➤ α) δερματικοί (cutaneous)

- μυρμηγκιές
- Epidermodysplasia verruciformis (HPV5, 8) → tree man
- πλακώδες καρκίνωμα του δέρματος

➤ β) βλεννογονικοί (mucosal)

κυρίως ζώνες μετάπλασης (*transformation zone*) μεταξύ πλακώδους (*squamous*) και αδενικού ή κυλινδρικού (*columnar*) επιθηλίου

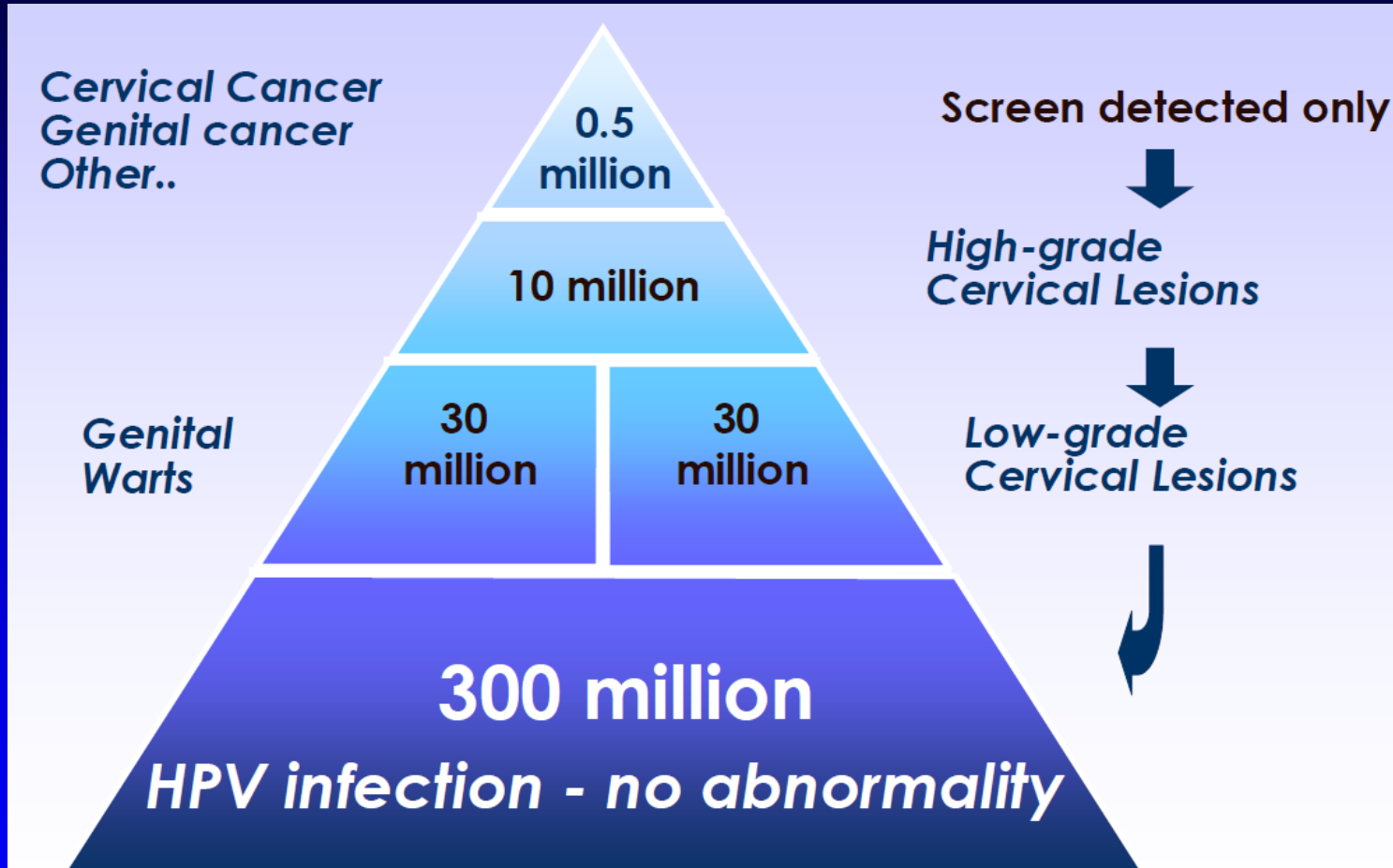
- θηλώματα, επίπεδα ή οξυτενή κονδυλώματα
- προκαρκινικές αλλοιώσεις στη γεννητική περιοχή και των δύο φύλων



καρκίνος τραχήλου μήτρας!! κλπ

HPV μολύνσεις στη γυναίκα

Βλεννογονικοί (Mucosal) τύποι



[X. Bosch, 25th International Papillomavirus conference 2009, Malmo, Sweden]

HPV-associated cancer (2002)

>95% του καρκίνου τραχήλου τις μήτρας
(πλακώδες /αδενοκαρκίνωμα = 85/15%) 493.000

90% του καρκίνου του κόλπου
30-35% του καρκίνου του αιδοίου 16.000

50% των καρκίνων του πέους στους άνδρες 10.000

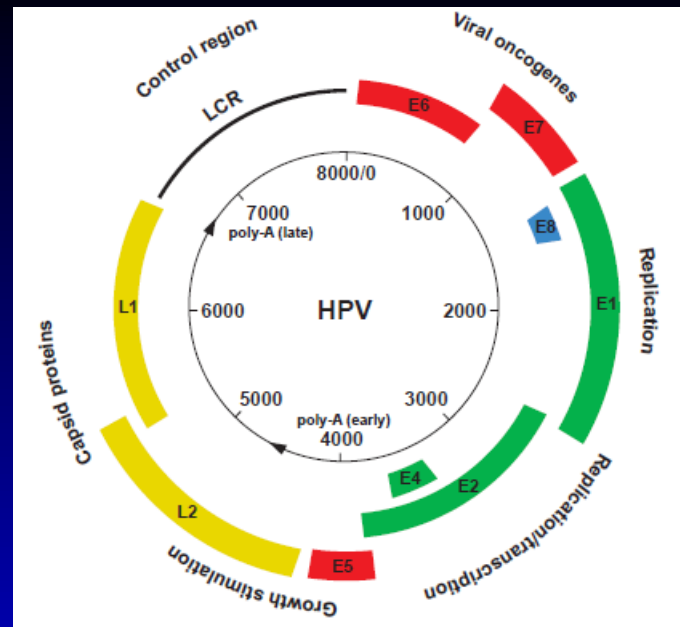
80% του καρκίνου του πρωκτού (και στα δύο φύλα) 27.000

~25-35% καρκίνου φάρυγγα/λάρυγγα/οισοφάγου 14.000

Σύνολο: 560.000

Παρουσία του ιού και σε άλλα καρκινώματα?

Γονιδιακή Δομή HPV



Up to
10 ORFs

α) **LCR (Long Control Region)** ή URR με poly-A (late), ori, P_E, four E2 binding sites, ~20 host epithelial specific transcription protein binding sites

β) **πρώιμη (early) περιοχή (E1, E2, E4, E5, E6, E7)**

- **E1**: Ελικάση, δέσμευση στην ori, hexamer, αντιγραφή του ιικού DNA

- **E2**: E2/E1, Μεταγραφικός παράγων, αναστολέας υποκινητή E6/E7

- **E4 (E1^E4)**: Αλληλεπιδρά με CK πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, virion release

- **E5** ?: Αλληλεπίδραση με EGFR, MHC I/II ↓, minor oncogene?

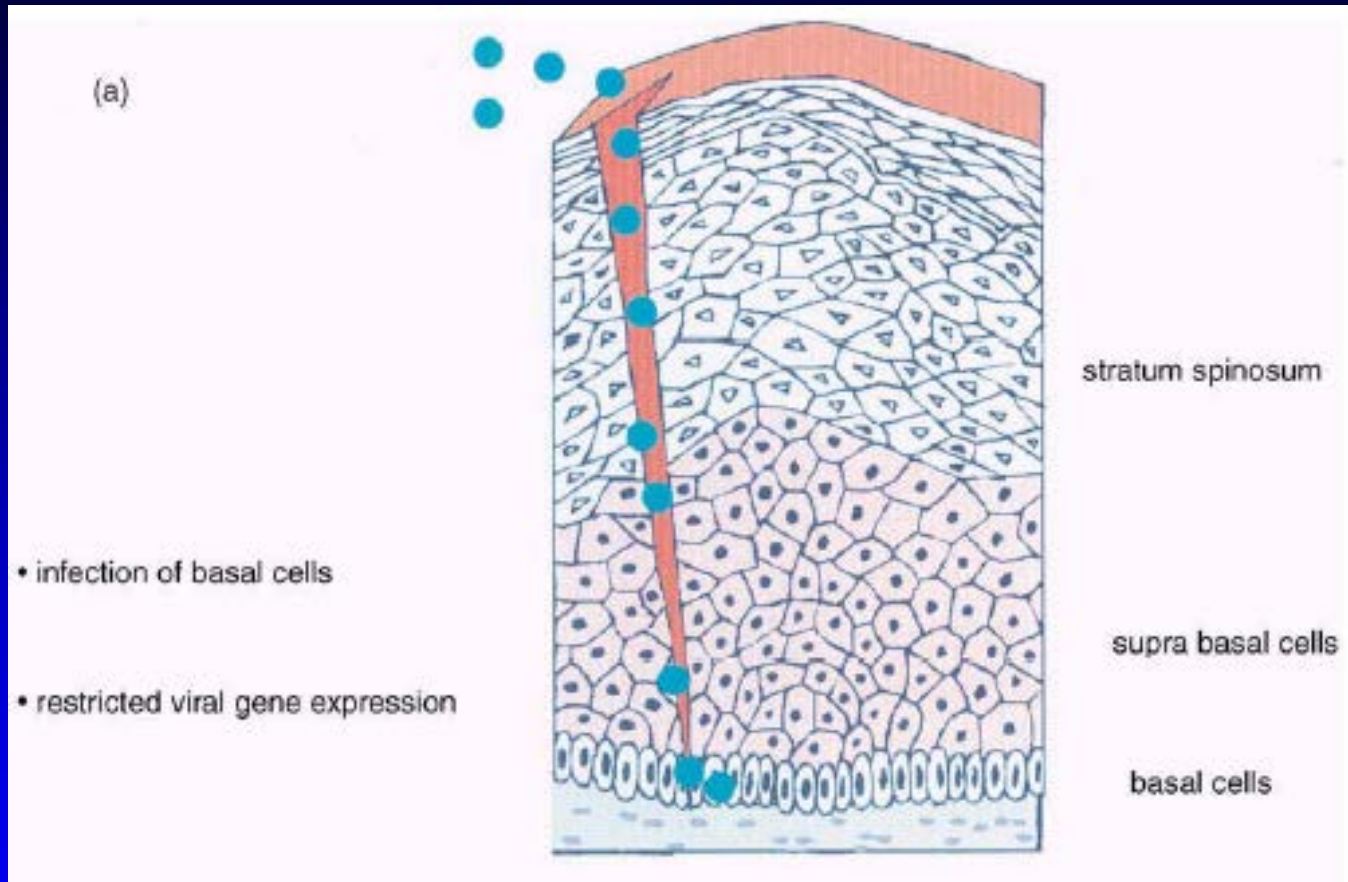
- Fusion **E8^E2, E3** σε μερικούς τύπους

γ) **όψιμη (late) περιοχή (L1, L2)**

- **L1** κύρια πρωτεΐνη καψιδίου

- **L2** δευτερεύουσα πρωτεΐνη καψιδίου, υποβοήθηση στην μόλυνση, δεσμεύει ιικό DNA

Απαρχή HPV μόλυνσης



Επιπολής στιβάδα
κερατινοκυττάρων
(corneal superficial)

[Ενδιάμεση
(granular)]

Ακανθώδη
(spinous)

Παραβασική

Βασική
(+βλαστικά κύτταρα)

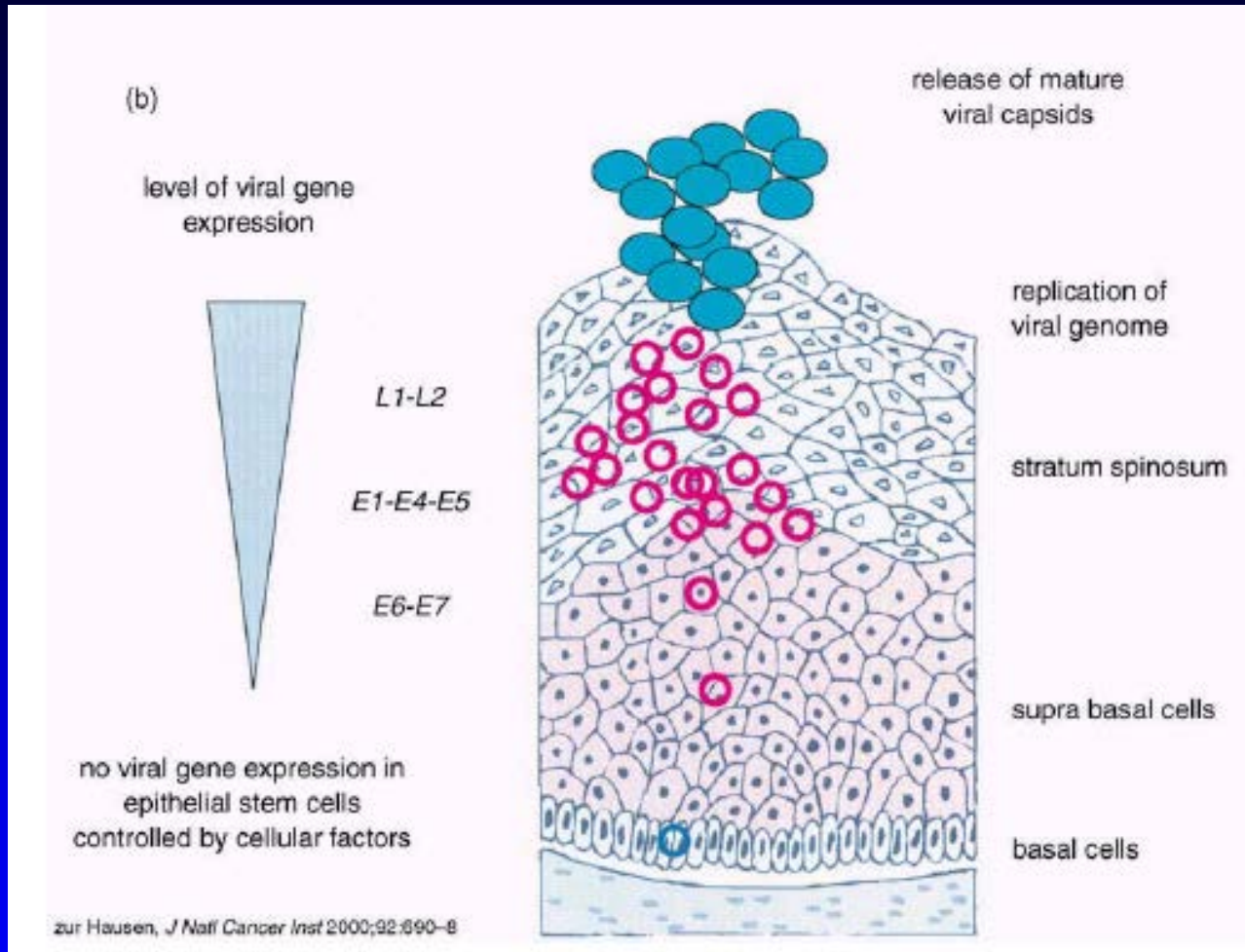
Ζώνη μεταπλάσεως (transformation zone) μεταξύ πλακώδους και κυλινδρικού επιθηλίου: πιο εκτιθέμενη σε νεαρή ηλικία

Κυτταρικός υποδοχέας: $\alpha_6\beta_4$ -Ιντεγκρίνη (?) + πρωτεογλυκάνες ηπαρίνης (?)

Viral uncoating στα ενδοσώματα

Σε επισωματική κατάσταση: 50/κύτταρο

HPV μόλυνση (καλό σενάριο)

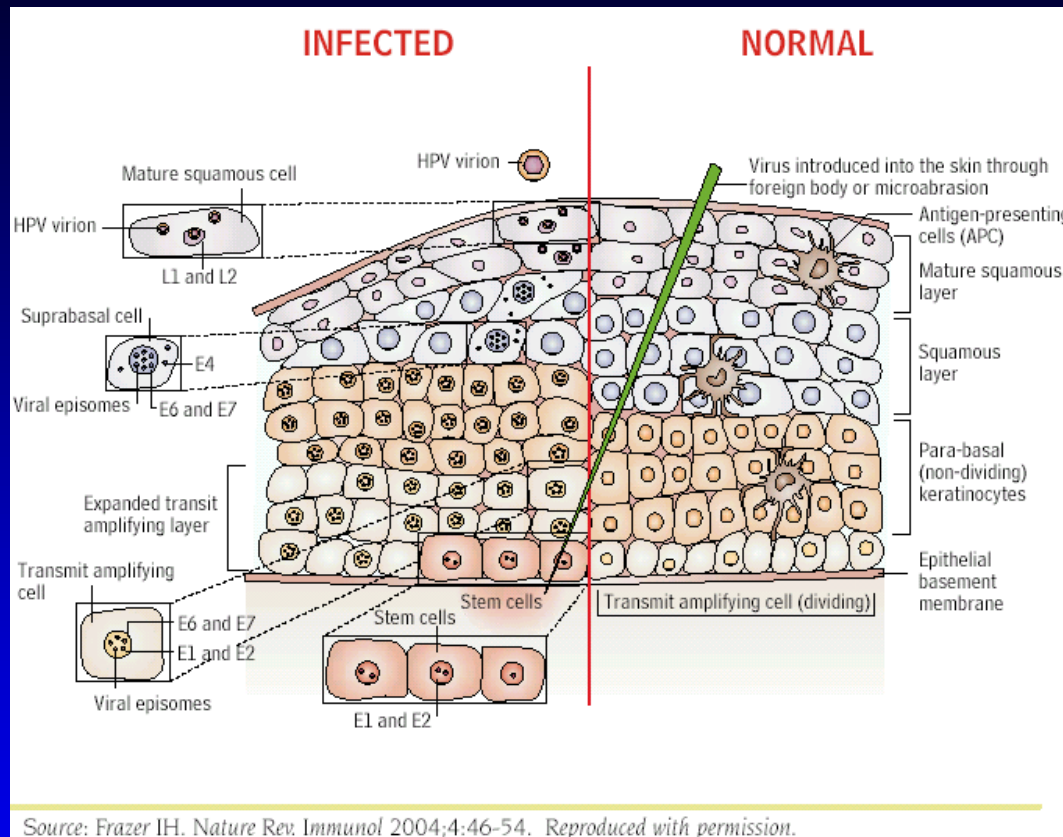


Σε επισωματική κατάσταση: 1000/κύτταρο

«Παραγωγική» μόλυνση – όχι ιδιαίτερη «φλεγμονή»

HPV μη-λυτικός ιός: μετάδοση μέσω αποπίπτουσας κερατινοστιβάδας

STD disease



Ανθεκτικός στη
θερμότητα και
τη ξηρασία

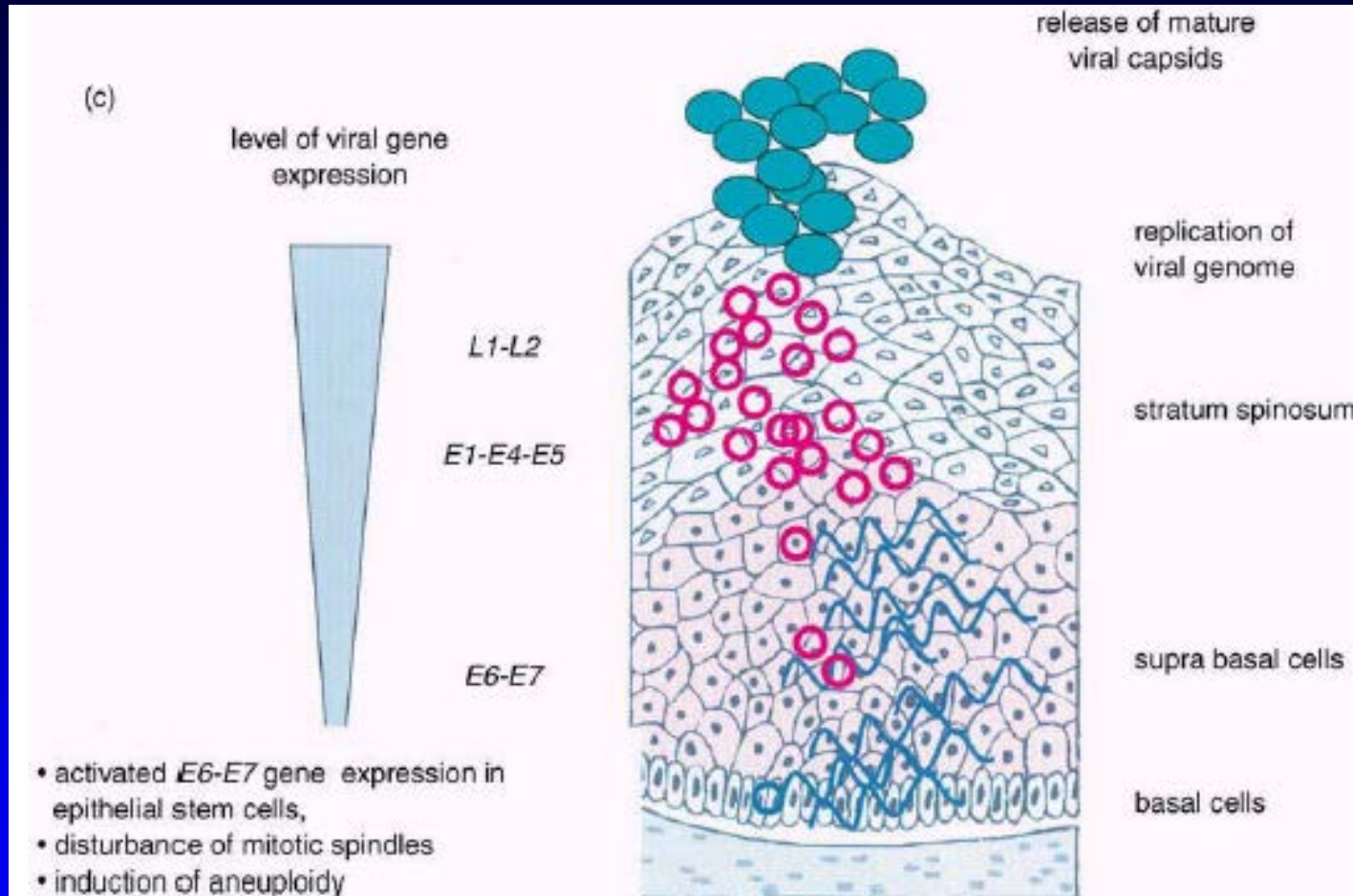
Ζώνη μεταπλάσεως (transformation zone) μεταξύ πλακώδους και κυλινδρικού επιθηλίου

α) δραματική ενίσχυση του πολλαπλασιασμού του ιού

β) κυτταρική υπερπλασία (κοιλοκυτταρική ατυπία, δυσκεράτωση)

θηλώματα ή υποκλινικά επίπεδα (flat) κονδυλώματα ή
εξωφυτικά οξυτενή κονδυλώματα (condylomata acuminata)

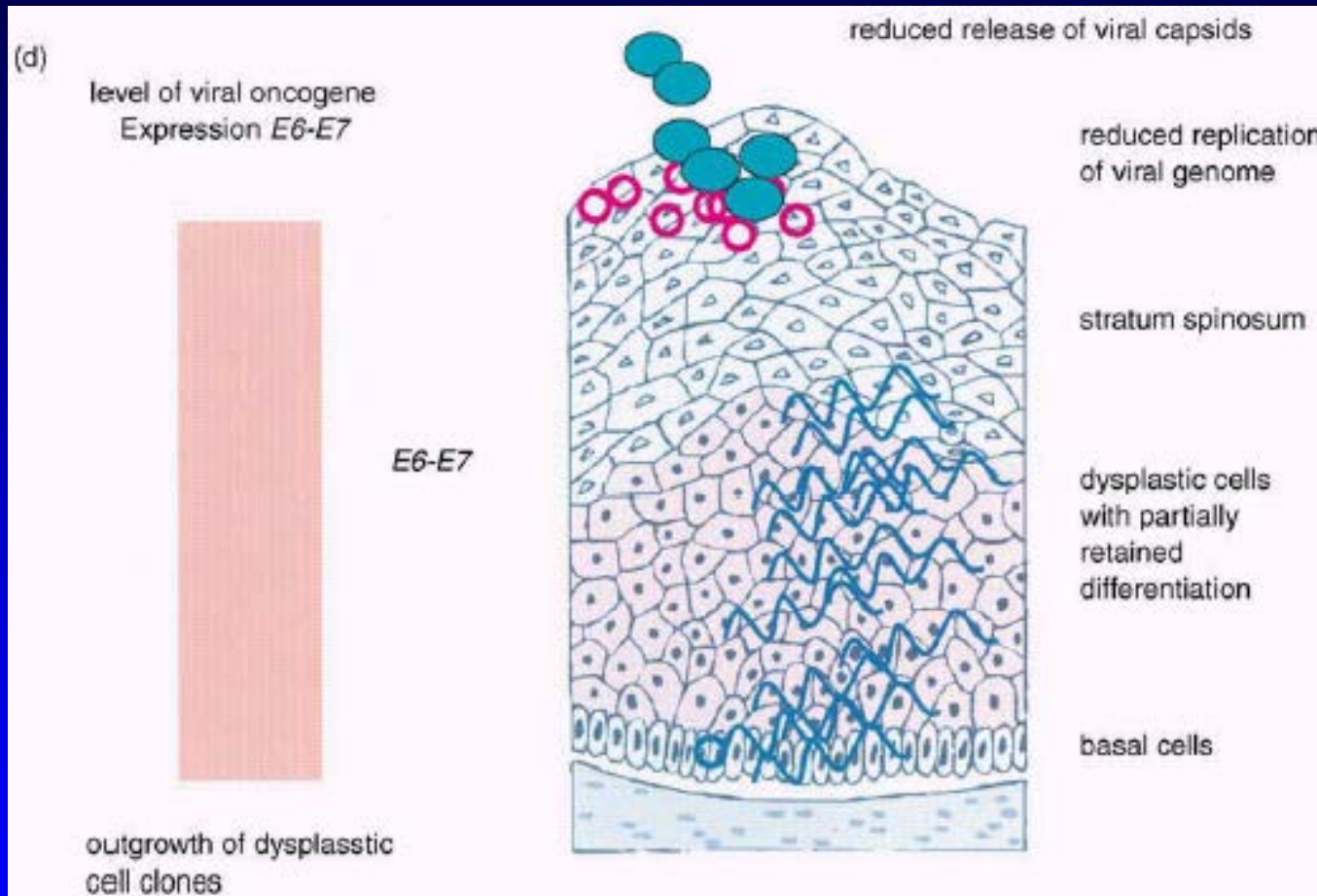
HPV μόλυνση (προκαρκινικές αλλοιώσεις)



Doeberitz M. Eur J Cancer 2002;38:2229-2242

Επίμονη λοίμωξη: αναλόγως του τύπου του HPV, ηλικία, ανοσολογική κατάσταση, stress, διατροφή, τσιγάρο, ορμόνες

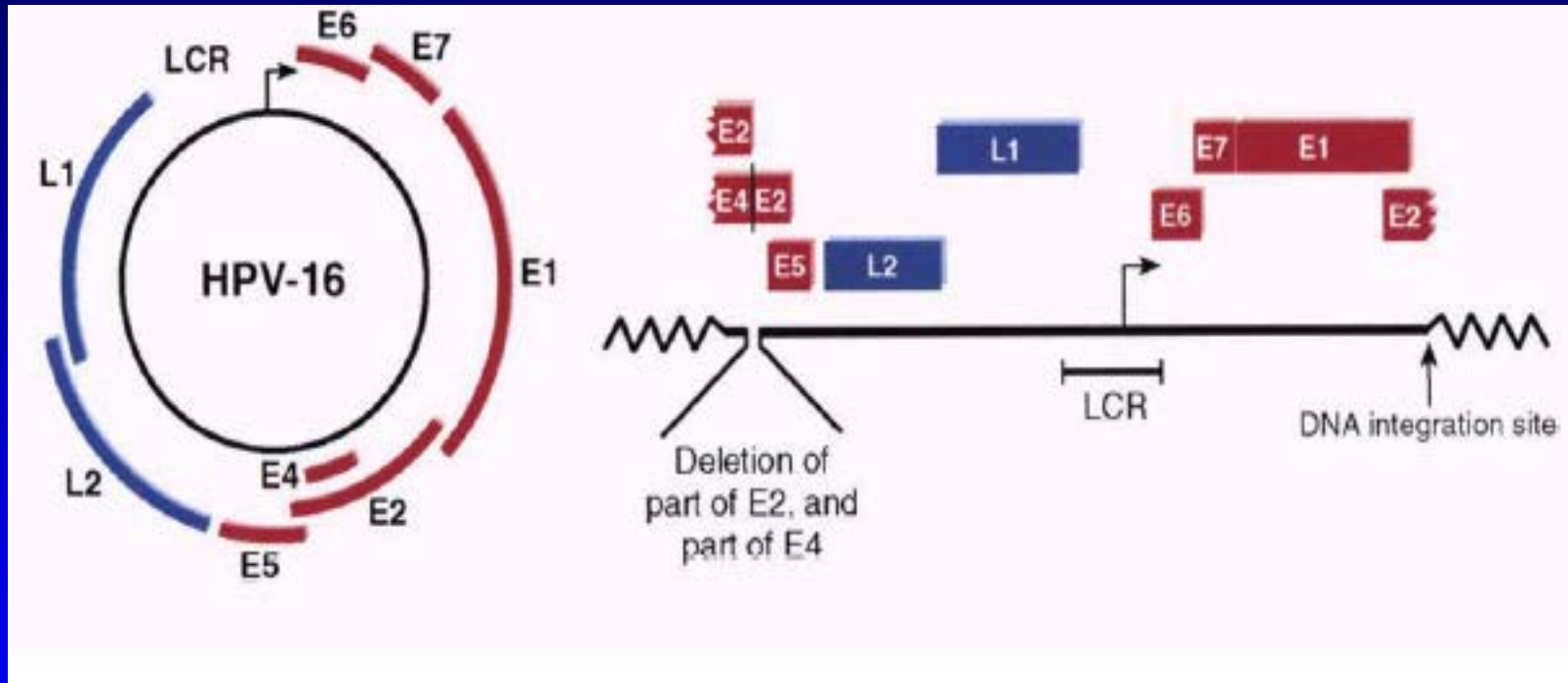
HPV μόλυνση (κακό σενάριο)



Doeberitz M. Eur J Cancer 2002;38:2229-2242

Αυξάνει η πιθανότητα για ενσωμάτωση του ιού!

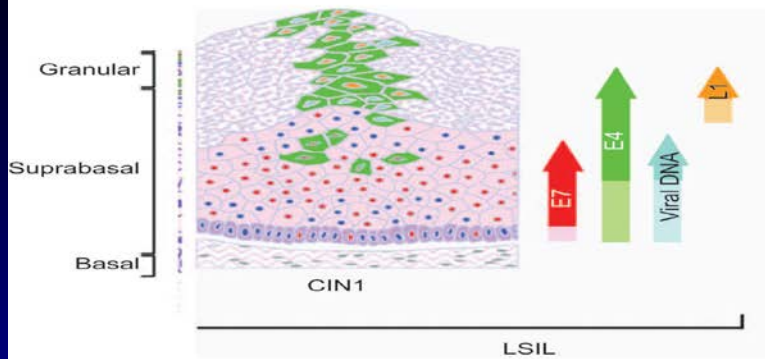
Ενσωματωμένος (integrated) HPV ιός



Alani RM, Munger K. J Clin Oncol 1998;16:330-337

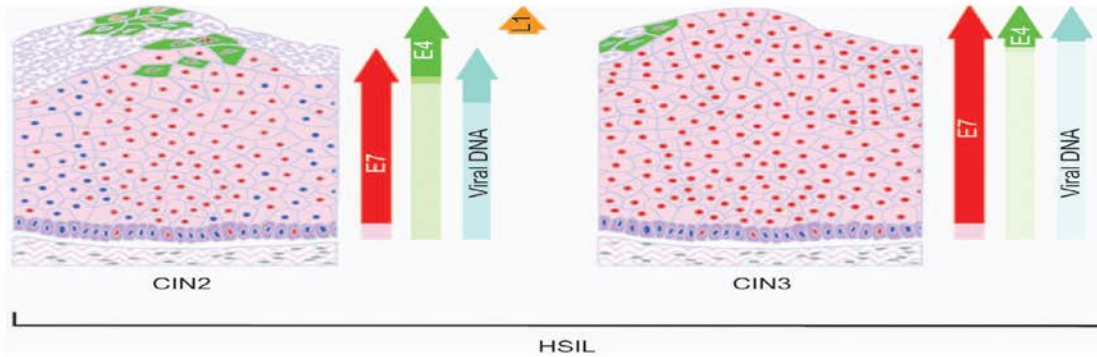
Ενσωμάτωση στη πλειοψηφία των καρκινωμάτων τραχήλου!
Υπερπαραγωγή E6/E7 mRNA λόγω απαλοιφής E2

HPV infection in the cervix

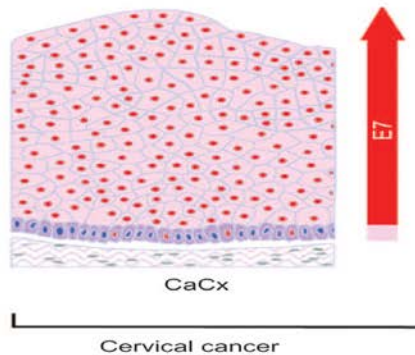


- Virus release
- Virus assembly/
Virus release
- Genome amplification
- Genome maintenance/
cell proliferation
- Genome maintenance

Productive HPV infection (good scenario)



Intermediate scenario: cellular gene deregulation

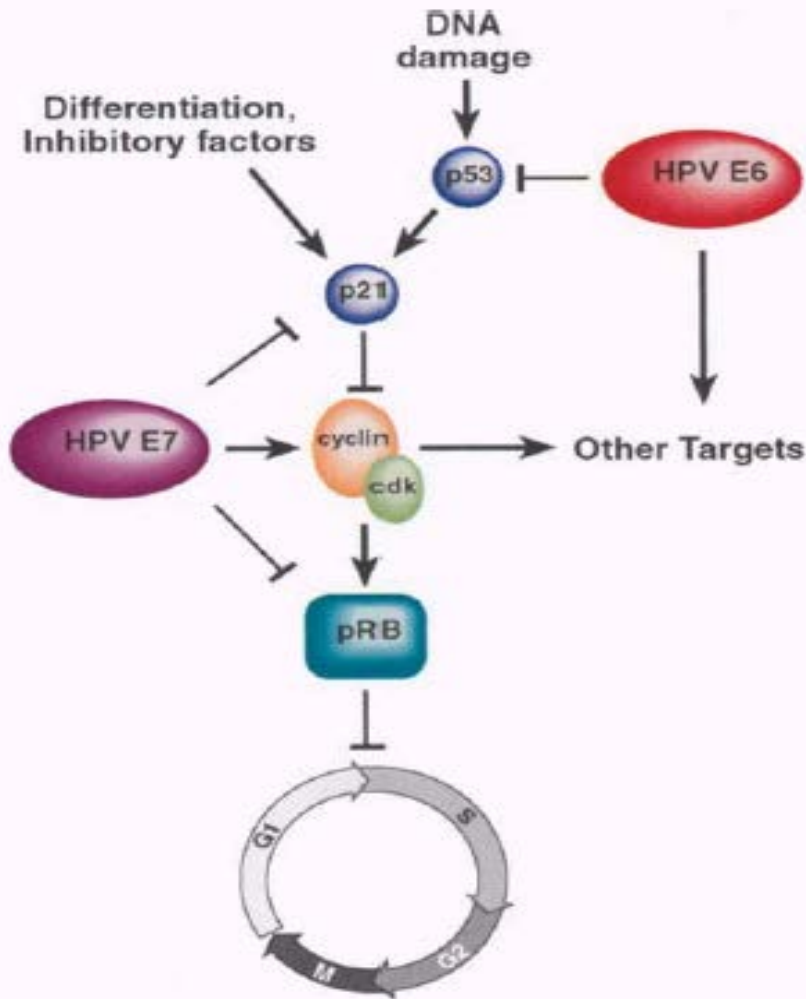


Bad scenario: Integration and break in the basal membrane

Διαφορετικά σενάρια HPV λοίμωξης

*Kroupis C. and N. Vourlidis,
Clin Chem Lab Med
2011;49:1783-1799*

Κακοήθης εξαλλαγή λόγω HPV



Δράσεις E6 (150 AA):

- 1) E6-AP (ubiquitinates p53)
- 2) Αλληλεπίδραση με PDZ
- 3) Επαγωγή τελομεράσης

Δράσεις E7 (100 AA):

- 1) Εξουδετέρωση Rb, p107, p130
- 2) Εξουδετέρωση αναστολέων κυκλινών και κινασών p21 & p27

Αποτέλεσμα:

- 1) Ενεργοποίηση E2F
- 2) Ενεργοποίηση Cyclin D/E/cdk2
- 3) Ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός
- 4) Αυξημένη χρωμοσωμική αστάθεια
- 5) Ανευπλοειδία, «αθανατοποίηση»
- 6) Αποφυγή απόπτωσης

Επαγωγή *p16INK4A* (CDKN2A)

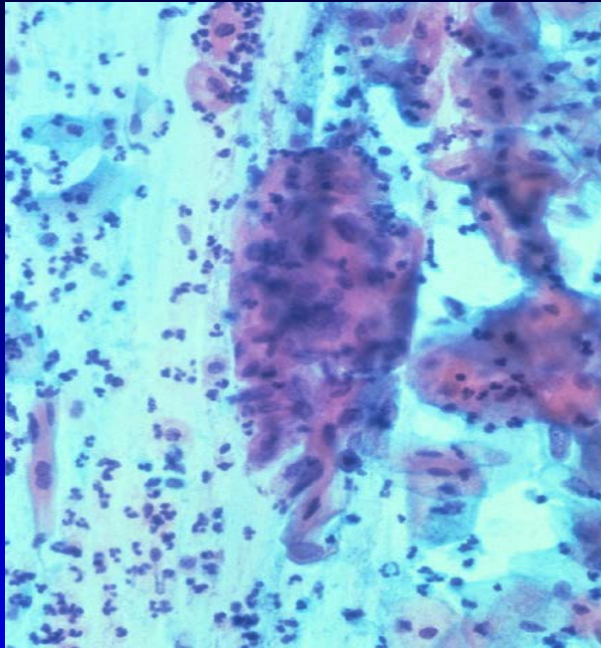
Alani RM, Munger K. *J Clin Oncol* 1998;16:330-337

E6 και E7 των πιο επικίνδυνων HPV τύπων → ογκογονίδια

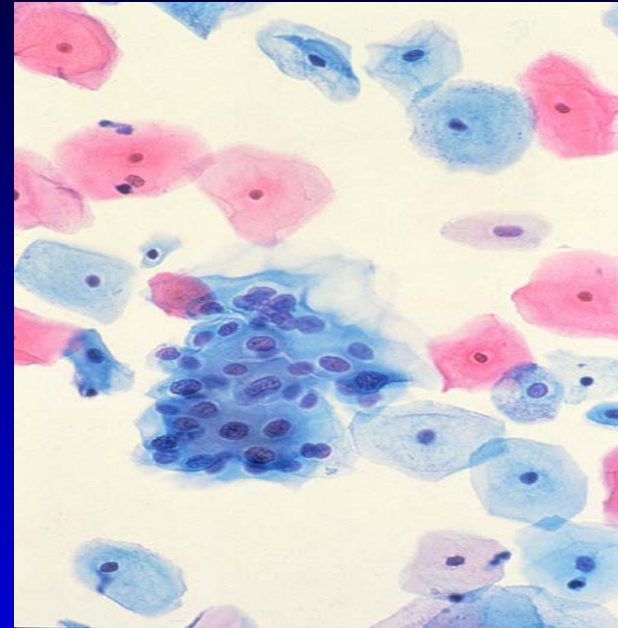
Έλεγχος από τον ξενιστή/περιβάλλον

- Ενδοκυττάριος έλεγχος (π.χ. *p16INK4A*)
- Ανοσολογικό σύστημα
 - T-helper κύτταρα, HLA σύστημα
- Παρακρινές σύστημα
 - Έκκριση TNF- α από παρακείμενα μακροφάγα
 - Επαγωγή ιντερφερόνης
- Γενετική προδιάθεση (HLA, TNF- α promoter SNPs κλπ)
- Περιβαλλοντικοί παράγοντες (δίαιτα, χημικά και φυσικά καρκινογόνα π.χ. τσιγάρο, UV, ορμόνες, αντισυλληπτικά κλπ)
- Άλλες STD λοιμώξεις (π.χ. HIV, γλαμύδια, HSV κλπ)

Πρόληψη για καρκίνο τραχήλου μήτρας: Pap test (G. Papanicolaou, 1941, Lasker award 1950)



Συμβατικό Pap test



Liquid-based Cytology (LBC)

Ανίχνευση αλλοιώσεων συμβατών με παρουσία HPV ιού:

ευαισθησία 65-80% www.LabtestsOnline.gr

Υποπτο pap test ή προκαρκινική αλλοίωση:

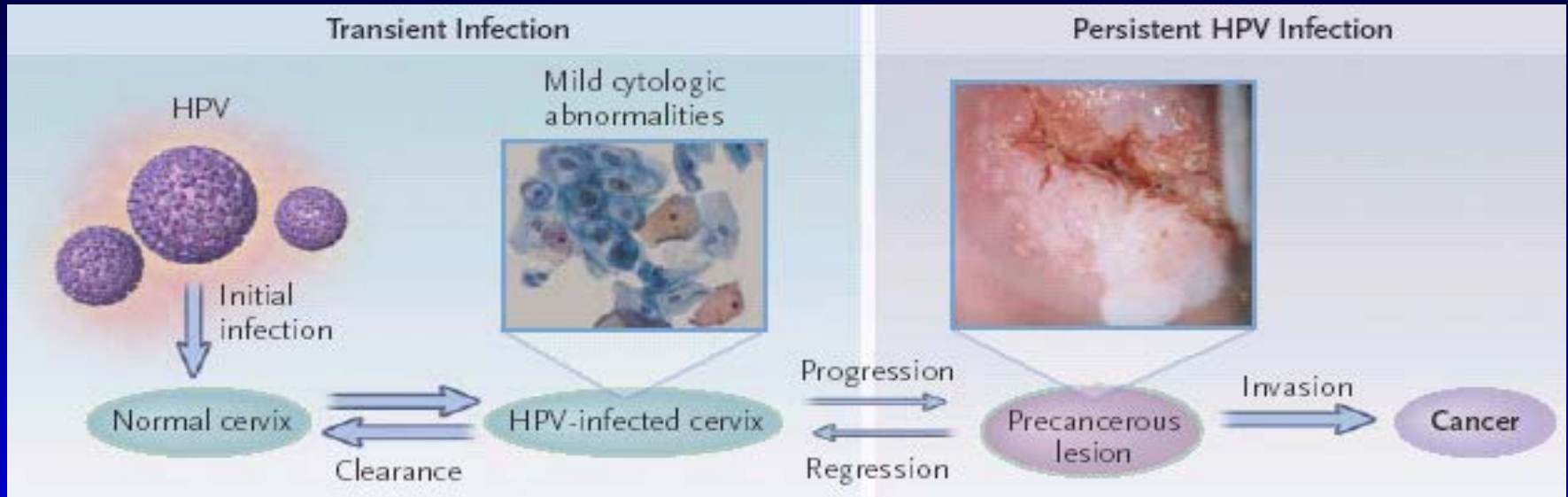
ASC-US (Atypical Squamous Cells of Unknown Significance)

LG-SIL (Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion ή

CIN I (Cervical Intraepithelial Neoplasia, στάδιο I)

Κλινική πορεία HPV λοίμωξης

Επιβάλλεται μοριακή ανίχνευση του HPV ιού (οδηγίες ASCCP)!!

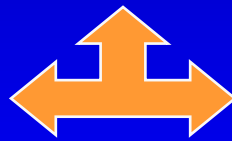


Κολποσκόπηση

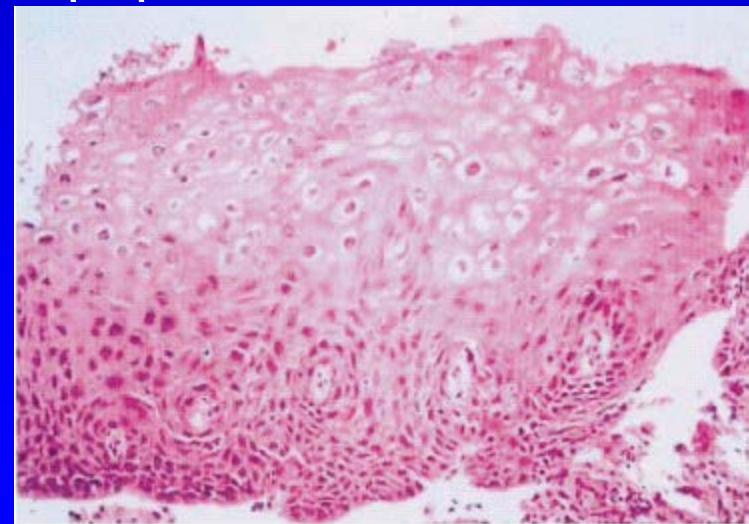
Επίμονη λοίμωξη



LG-SIL
(CIN I)



Βιοψία
Τραχήλου



Θεραπευτική αγωγή

Επί εμμένοντος LG-SIL ή επί HG-SIL (CIN II ή CIN III):

Επιβάλλεται **θεραπεία** για αποφυγή in situ καρκινώματος και διηθητικού καρκίνου τραχήλου της μήτρας:

- **φαρμακευτική** (ποδοφυλλίνη ή 5-φθοριουρακίλη ή ιμικουϊμόδη)
- **επεμβατική** (είτε καταστροφική ηλεκτροκαυτηρίαση/κρυοπηξία/εξάχνωση με laser είτε αφαιρετική κωνοειδή εκτομή με νυστέρι, με laser ή μέσω αγκύλης LEEP/LLETZ)

HPV λοίμωξη παροδική (transient) ή επίμονη (persistent)?

- Αποτέλεσμα **HPV τυποποίησης**
- Ηλικία γυναίκας (< ή > 30 ετών)
- Ανοσολογική απάντηση (γενετικοί πολυμορφισμοί?)
- Τρόπος ζωής
- Διατροφή
- Κάπνισμα
- Αντισυλληπτικά
- Άλλες STD λοιμώξεις (π.χ. HIV, χλαμύδια, HSV κλπ)

Τύποι HPV:

(Σπανιότερα απαντώμενοι τύποι διεθνώς)

Χαμηλού κινδύνου (low risk): 6, 11, (40, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 72, 81, 89)

Πιθανώς μετρίου κινδύνου: 26*, 53*, 66*, 70, 73, 82, 83, 84

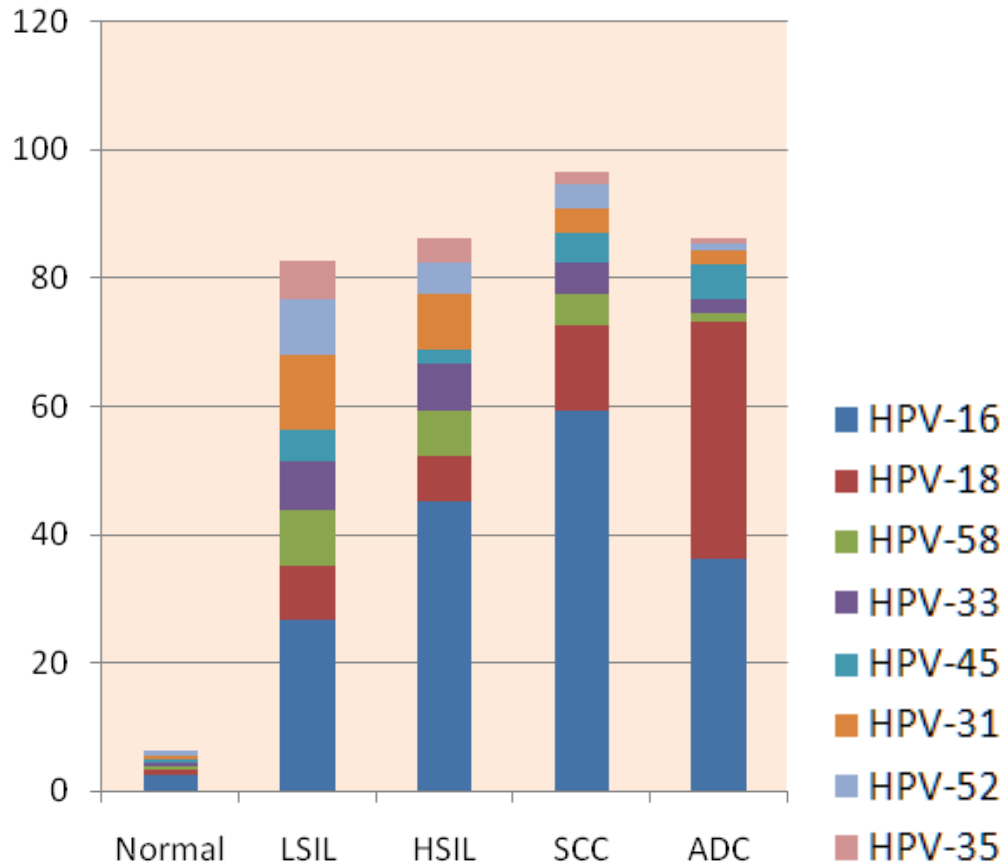
Μετρίου/υψηλού κινδύνου: 31, 33, 35, 45, 52, 58, (39, 51, 56, 59, 68)

Υψηλού κινδύνου (high risk): 16, 18

*αμφιλεγόμενου κινδύνου στη διεθνή βιβλιογραφία

Κατανομή HPV τύπων

*Kroupis C. and N. Vourlidis,
Clin Chem Lab Med
2011;49:1783-1799*

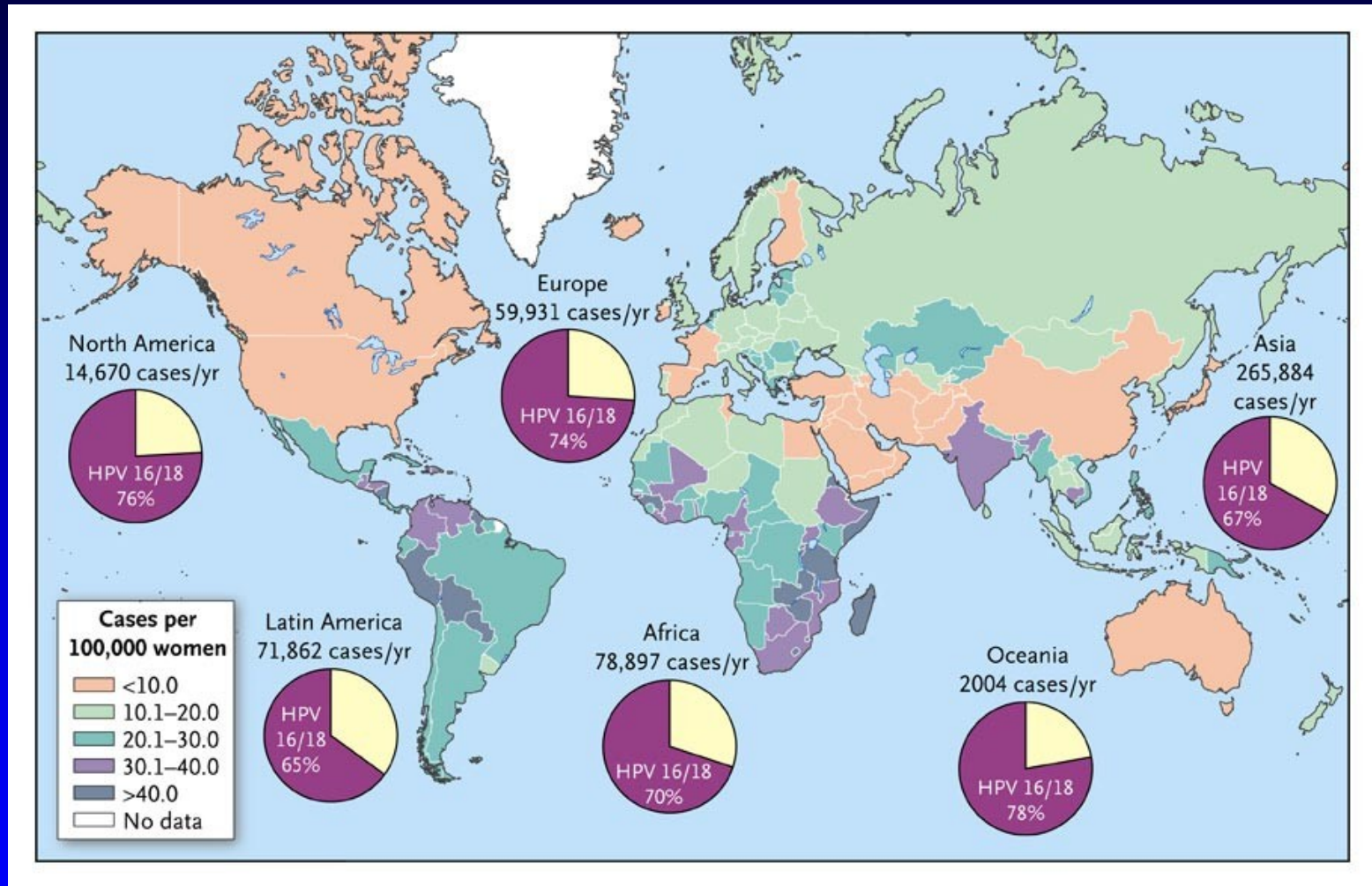


Normal	LSIL	HSIL	SCC	ADC
2.5	26.6	45.3	59.3	36.3
0.9	8.6	6.9	13.2	36.8
0.6	8.5	7.0	5.1	1.5
0.5	7.6	7.3	4.9	2.2
0.4	4.9	2.3	4.4	5.2
0.7	11.7	8.6	4.0	2.3
0.6	8.8	5.1	3.6	1.2
	5.9	3.8	1.9	0.6

Στο 92% του καρκίνου τραχήλου μήτρας, οκτώ HPV τύποι!
Πρακτικά, δεν υπάρχει καρκίνος τραχήλου της μήτρας
 χωρίς να συνυπάρχει και ιός HPV!!

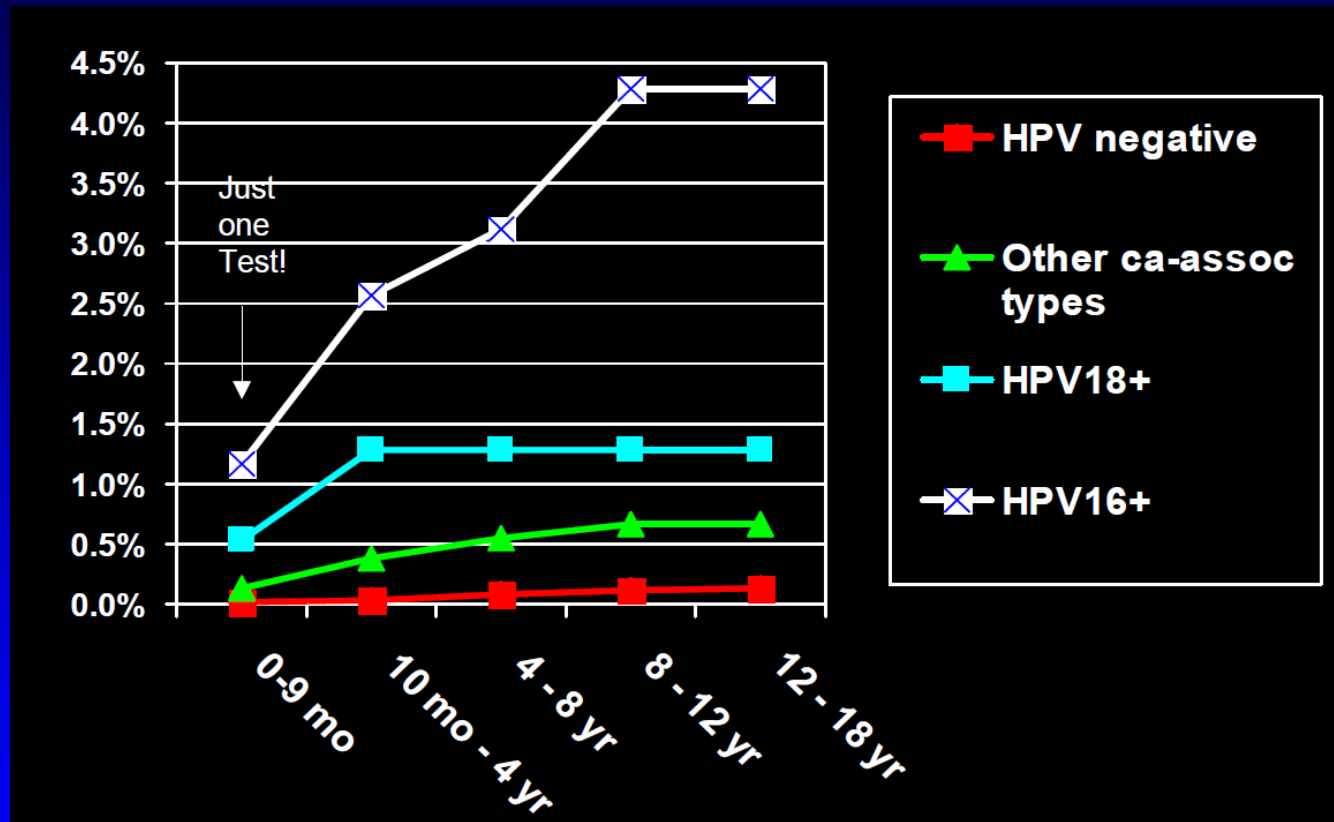
Καρκίνος τραχήλου και HPV16/18/rest διεθνώς

Δεύτερος πιο συχνός καρκίνος στις γυναίκες παγκοσμίως (10%)



HPV 18 αυξημένο ποσοστό στα αδενοκαρκινώματα (πιο εύκολα διαφεύγουν στη διάγνωση)
Χρόνος επώασης ποικίλλει αναλόγως του τύπου του ιού και μπορεί είναι και 10-20 χρόνια

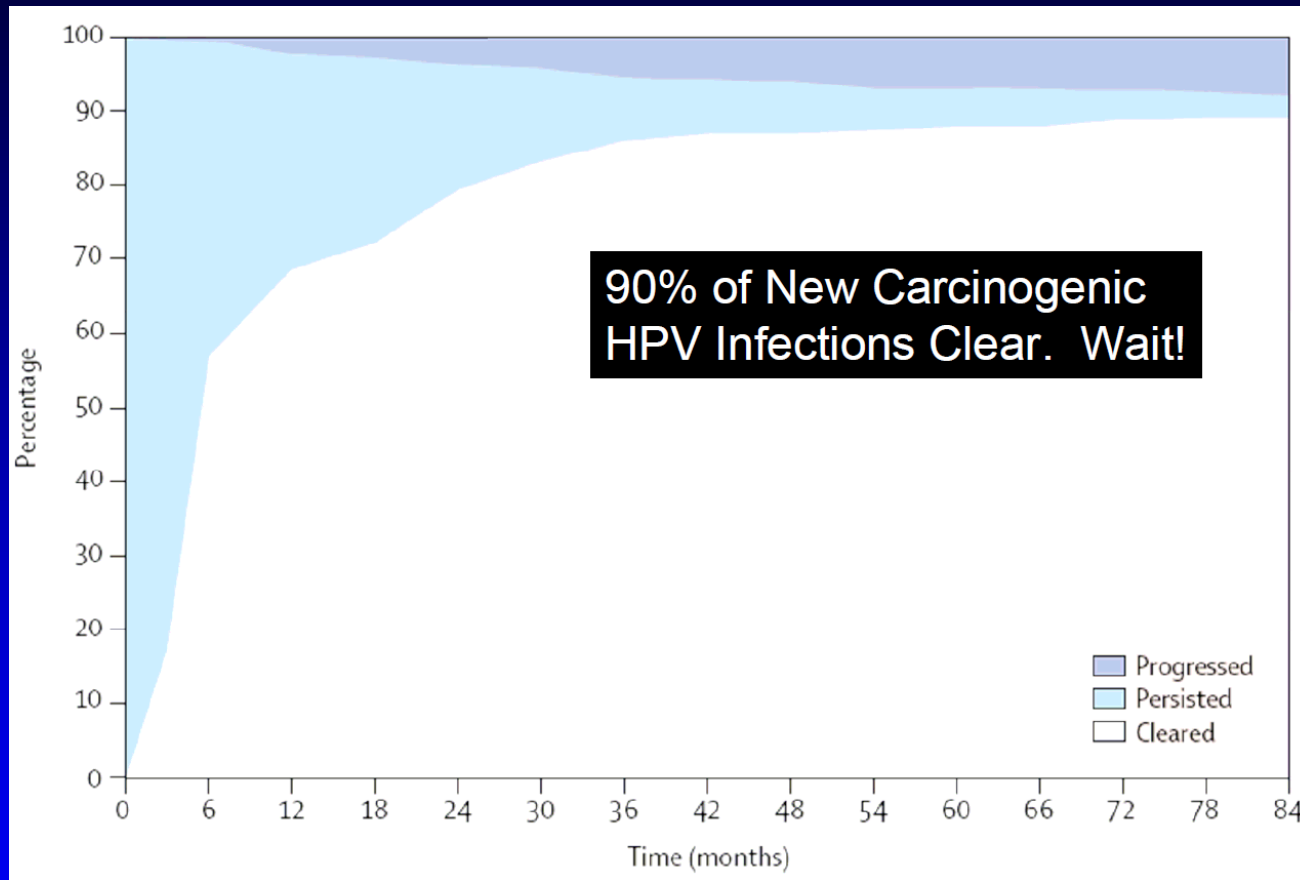
Κίνδυνος για Ca από θετικό HPV test



n=20.000

[M. Schiffman, 25th International Papillomavirus conference 2009, Malmo, Sweden]

HPV Persistence

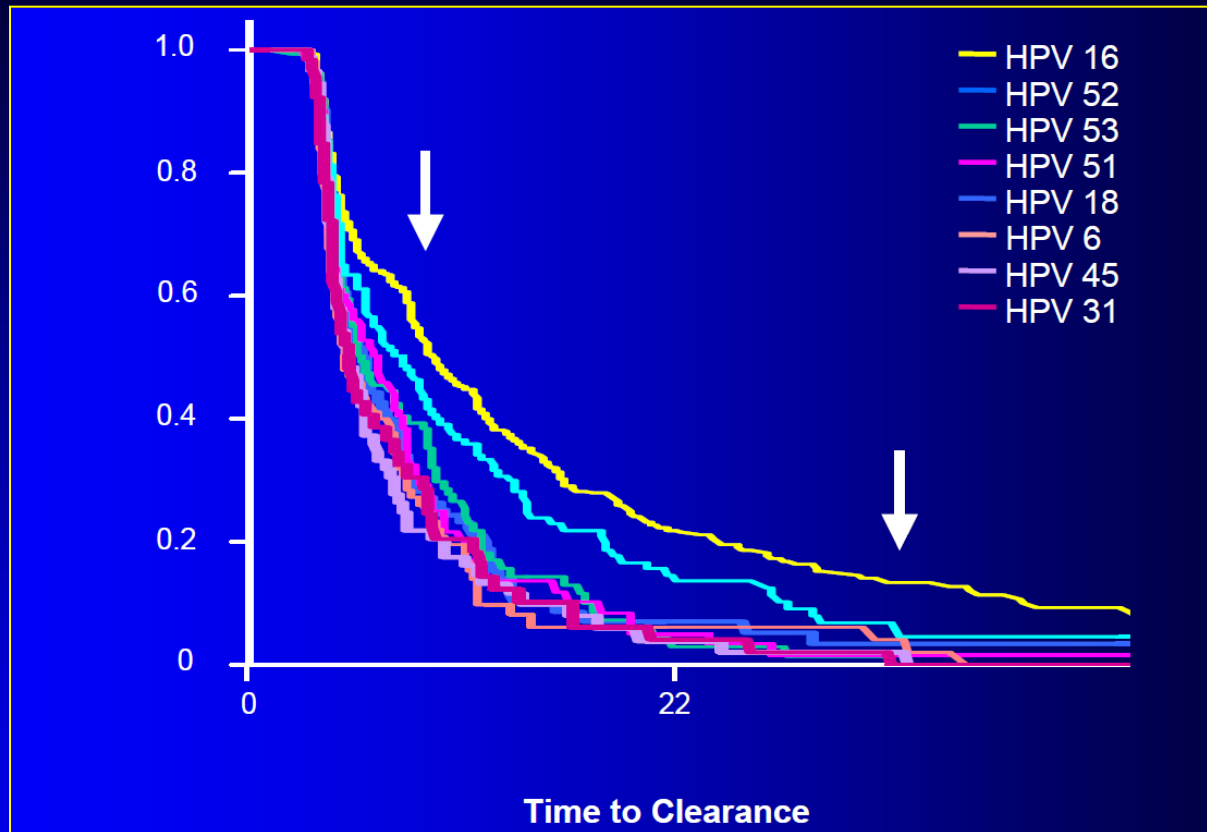


n=10.000

[M. Schiffman, 25th International Papillomavirus conference 2009, Malmo, Sweden]

«Clearance» κατά 70% εντός 2 ετών και κατά 90% εντός 7 ετών!

«Κάθαρση» HPV μόλυνσης ανά τύπο



[A.B. Moscicki, 25th International Papillomavirus conference 2009, Malmo, Sweden]

80% των μολύνσεων με τον πιο επικίνδυνο καρκινογόνο τύπο -τον HPV 16- εξαφανίζονται εντός 2ετίας χωρίς συνέπειες!

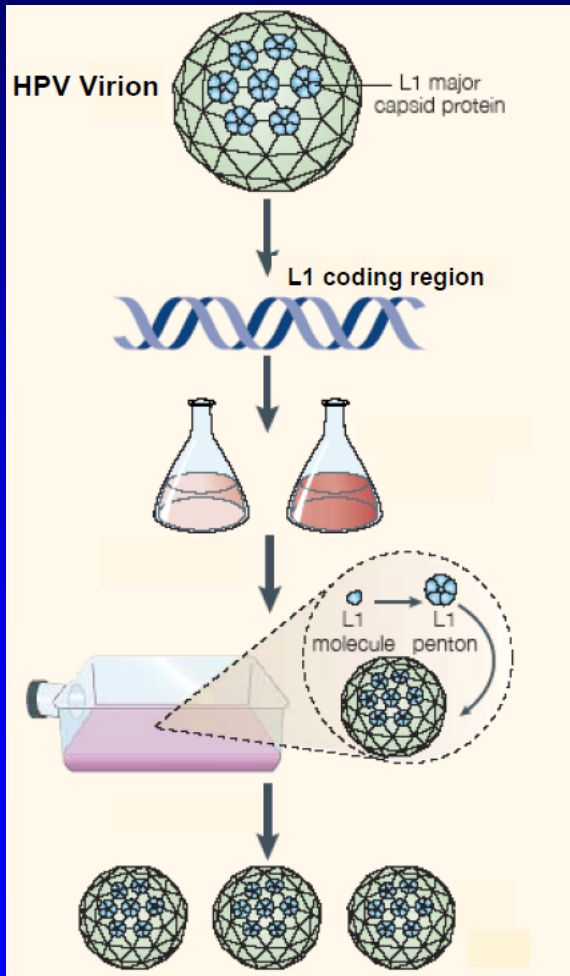
E5 γονίδιο? HPV16/18 variants? Προηγούμενη ανοσολογική έκθεση?

Προφυλακτικά εμβόλια

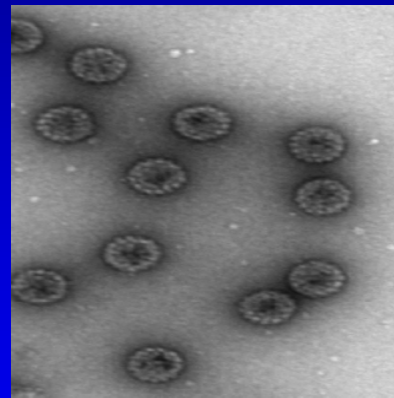
(τετραδύναμο 16/18/6/11 ή διδύναμο 16/18)

Σύσταση για παιδιά ηλικίας 9-15 ετών και γυναίκες ηλικίας 16-26 ετών [HPV DNA (-)]

Αποτελούνται από L1 **Virus Like Particles (VLPs)**



- Κλωνοποίηση L1 σε ευκαρυωτικούς vectors
- Παραγωγή σε insect cells or yeast
- Αυτόματο πακετάρισμα σε VLPs



HPV 16VLPs

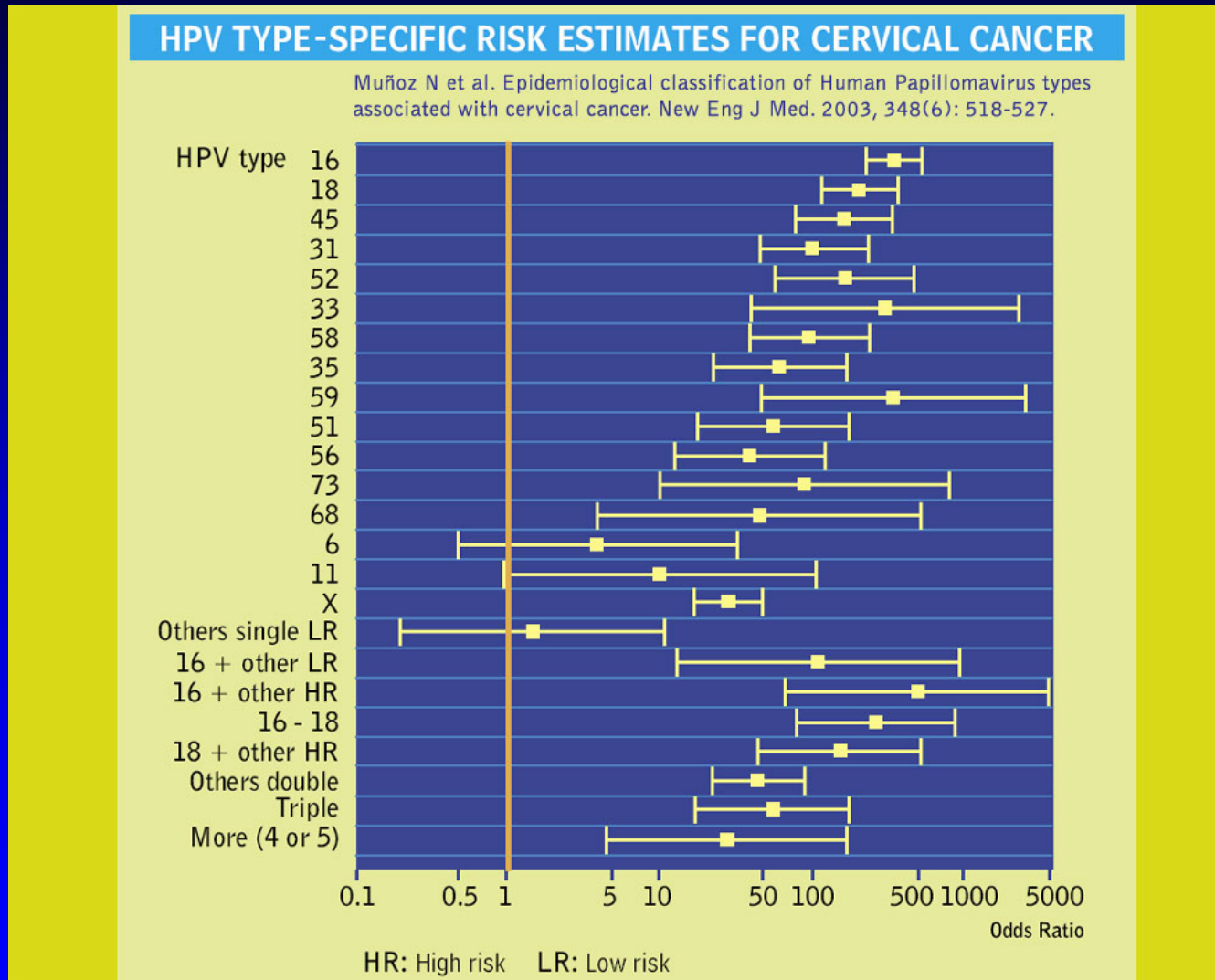
- Non-infectious
- Non-oncogenic!
- Εξουδερωτικά αντι-L1 αντισώματα
- Υψηλοί IgG τίτλοι
- Προστασία για τουλάχιστον επταετία
- Διασταυρούμενη προστασία έναντι 31/45/52?

Στο μέλλον

θεραπευτικά εμβόλια (έναντι E6/7)

- anti-sense RNA
- siRNA
- εισπνεόμενα εμβόλια?

Επικινδυνότητα άλλων HPV τύπων



Και άλλοι τύποι στο L1 εμβόλιο? Πολυδύναμο L2 εμβόλιο?

Αξία Μοριακής ανίχνευσης HPV

ASCUS/LG-SIL Triage

- **Θετικό αποτέλεσμα**
 - Αποδεικτικό (το μόνο!)
 - Προγνωστική αξία
- **Αρνητικό αποτέλεσμα**
 - Υψηλή αρνητική προβλεπτική αξία (NPV)
 - Έλεγχος θεραπείας (Test of cure)

Screening test? Then triage with pap?

Από το 4/2014, FDA έγκριση HPV test για screening!

Απαιτήσεις HPV test

❖ Από το εργαστήριο:

- ❖ επικύρωση ή επαλήθευση των μεθόδων (*επαναληψιμότητα, αναπαραγωγιμότητα, ορθότητα, όριο ευαισθησίας, σύγκριση μεθόδων, αναλυτική ειδικότητα*)
- ❖ χρήση κατάλληλων πιστοποιημένων υλικών αναφοράς που πλέον υπάρχουν (HPV 16/18 NIBSC) ή πλασμιδίων με κλώνους HPV από εργαστήρια αναφοράς (WHO HPV Labnet)
- ❖ επιτυχής διενέργεια εσωτερικού/εξωτερικού ελέγχου ποιότητας
- ❖ Διαπίστευση εργαστηρίου (συμμόρφωση με ISO15189 πρότυπο)

EHEQAS

European HPV DNA Test

External Quality Assurance Scheme

<http://www.mendelcenter.org/eheqas>

❖ Από τον κλινικό ιατρό:

- ❖ κατανόηση του τι ανιχνεύει το κάθε μοριακό τεστ
- ❖ ποια είναι τα limitations

Προβλήματα στην κλινική αξιολόγηση HPV test (χαμηλή PPV και ειδικότητα)

- Διαφορετικά τελικά σημεία (end points) στις κλινικές μελέτες [CIN2 είτε \geq CIN2 είτε CIN3 είτε Ca με Gold standard την βιοψία από κολποσκόπηση]
- Δύσκολη η διάγνωση CIN2
- Υποστροφή HPV μολύνσεων: π.χ. πιο εύκολα οι CIN2 /HPV16 με αρνητικό φαινότυπο!
- Διαφορετικό panel HPV ιών στα διαφορετικά μοριακά τεστ:
 - άλλες 2 επικίνδυνους τύπους HPV16/18
 - άλλες 5 ή 14 τύπους υψηλού κινδύνου (HR)
 - ή πολύ περισσότερους και ανάμεσά τους και χαμηλού κινδύνου (LR)

Όσο περιορίζεται ο αριθμός των συμπεριληφθέντων τύπων τόσο μειώνεται η κλινική ευαισθησία αλλά αυξάνεται η κλινική ειδικότητα και η PPV!

Επίσης ανίχνευση HPV mRNA και πρωτεϊνών → πιο προχωρημένο στάδιο μόλυνσης με παρουσία κυτταρικής απορρύθμισης → πιο μεγάλη PPV και κλινική ειδικότητα!

Μέθοδοι μοριακής ανίχνευσης και τυποποίησης HPV:

Υλικό για απομόνωση DNA:

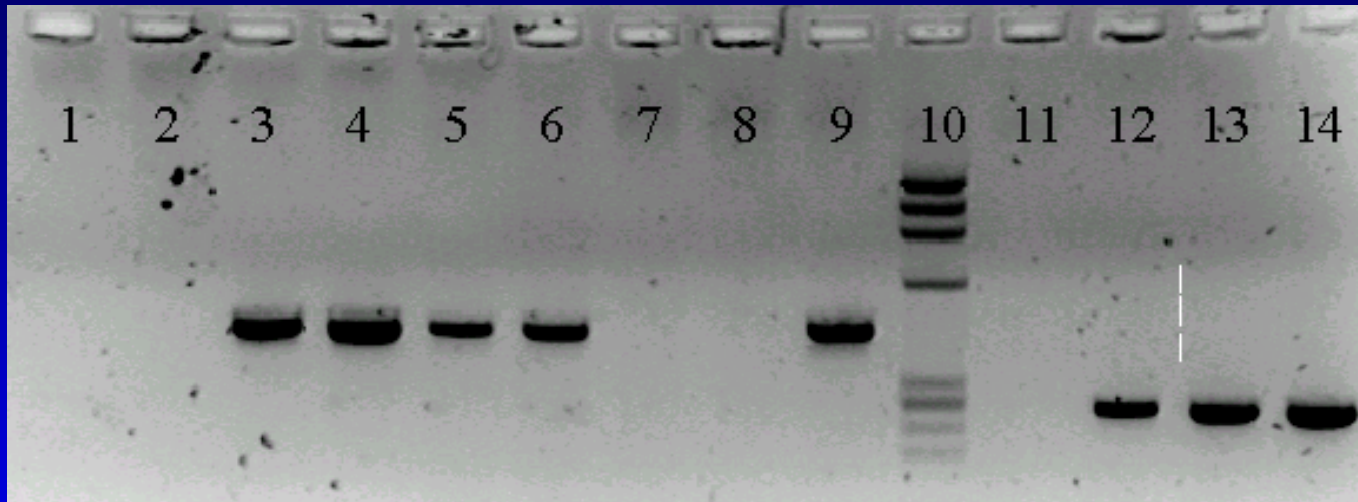
- κυτταρολογικό επίχρισμα σε ειδικό βαζάκι
- βιοψία
- τομές ή μπλοκ ιστού εγκλωβισμένου σε παραφίνη



Southern blot, ISH (αρχικά)

- A. DNA
 - B. RNA
 - C. Protein
- } PCR/non-PCR

A1. Ανίχνευση DNA HPV: In house Consensus PCR

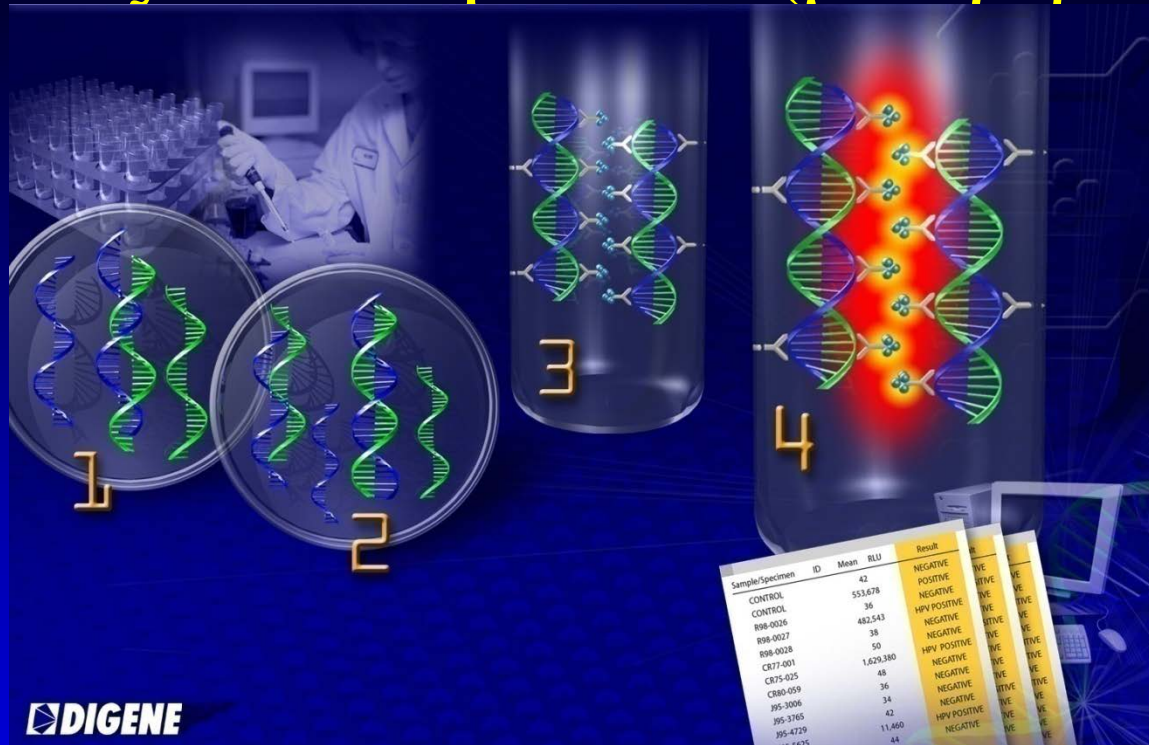


MY consensus primers

b-globin

MY, GP+, SPF10 etc (L1 gene)
Ανιχνεύουν >35 HPV τύπους!

Hybrid Capture II (με έγκριση FDA)



Ημιποσοτική
ανίχνευση
(No IC!)

QIAGEN

1. Αποδιάταξη DNA
2. Επώαση με μίγμα RNA ανιχνευτών
Χαμηλού κινδύνου 6/11/42/43/44 ή/και
Υψηλού κινδύνου 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68 (13 HR)
3. Επισημασμένο αντίσωμα έναντι RNA/DNA υβριδίων
4. Χημειοφωταυγή ανίχνευση σε λουμινόμετρο (σε πλακίδιο ELISA)

Hologic



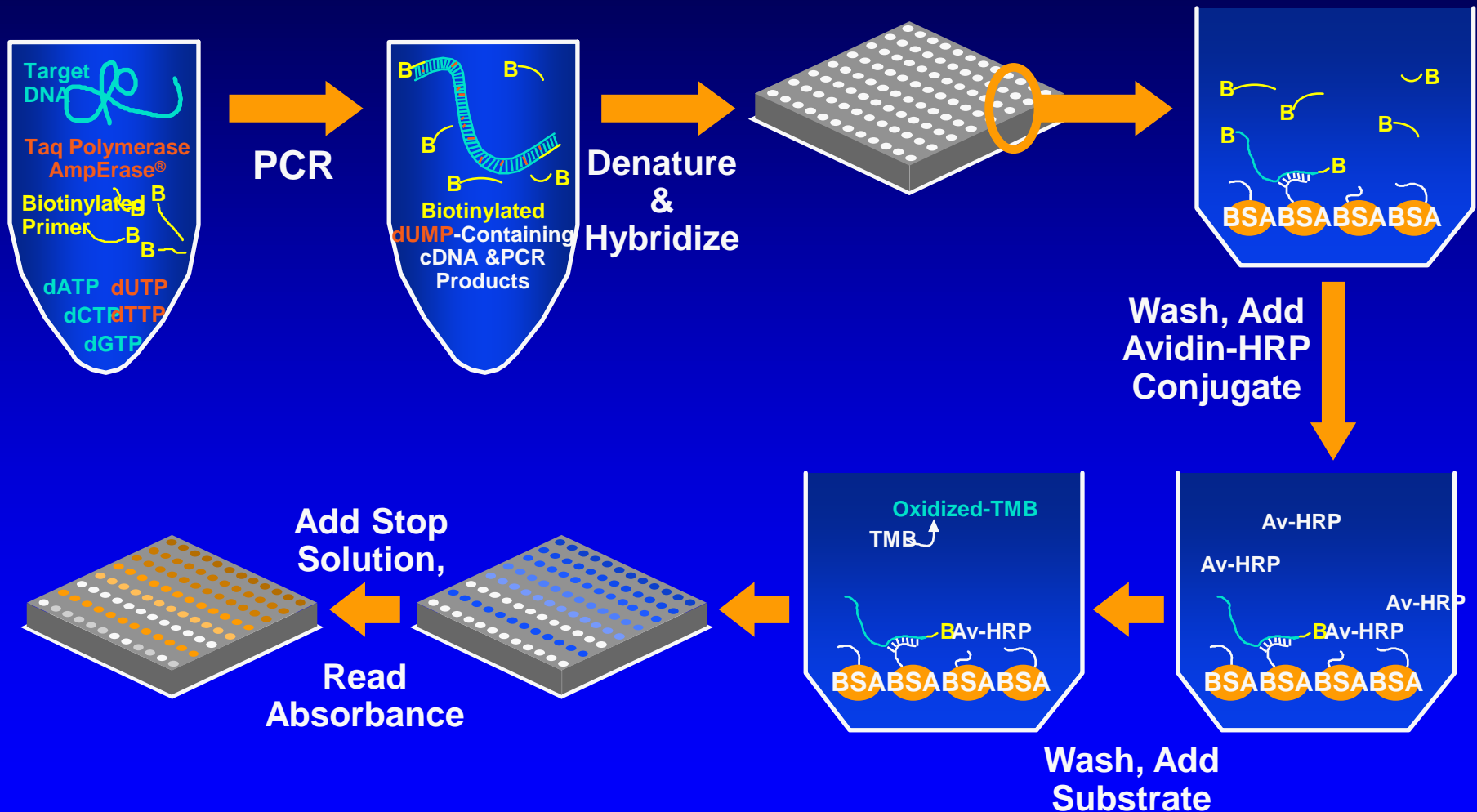
FDA approved

Fluorimetric Invader Technology (Third wave)

- 14 HR types (in 3 separate tubes)
- Histone 2 control
- Less cross reactions
- Less prone to contamination?
- Less time

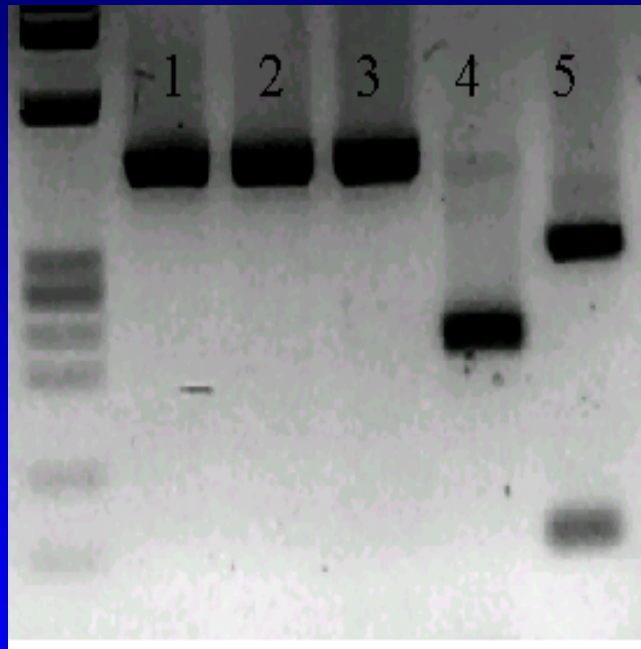
AMPLICOR[®] PCR-ELISA (Roche)

Ανίχνευση 13 HPV τύπων υψηλού κινδύνου (PCR)

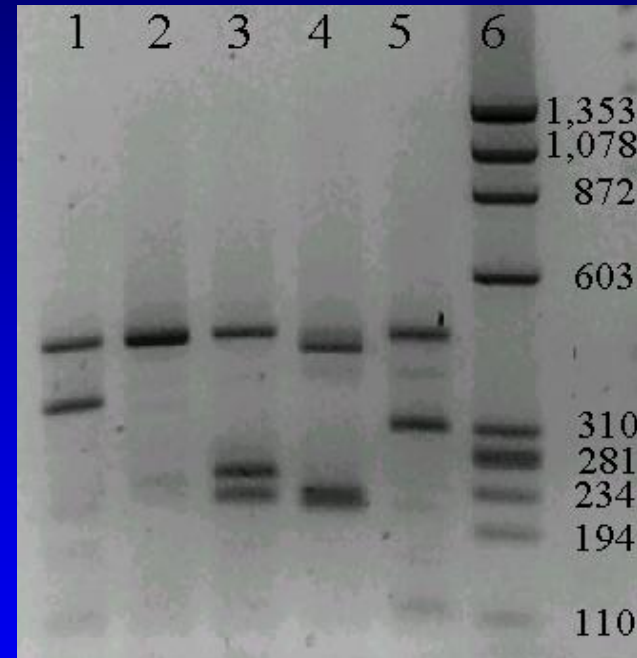


A2a. HPV DNA Full Genotyping RFLP

Κατεργασία MY-PCR προϊόντος με περιοριστικές ενδονουκλεάσες



HPV 16

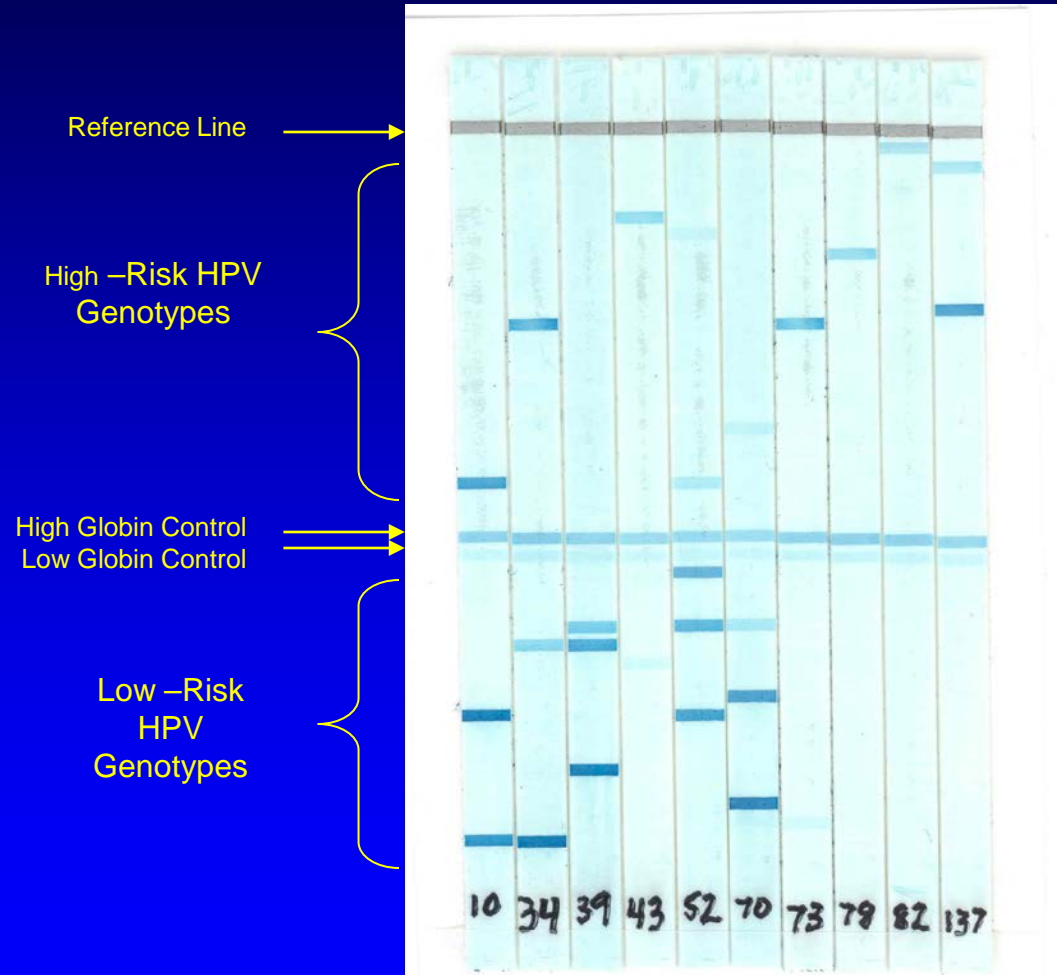
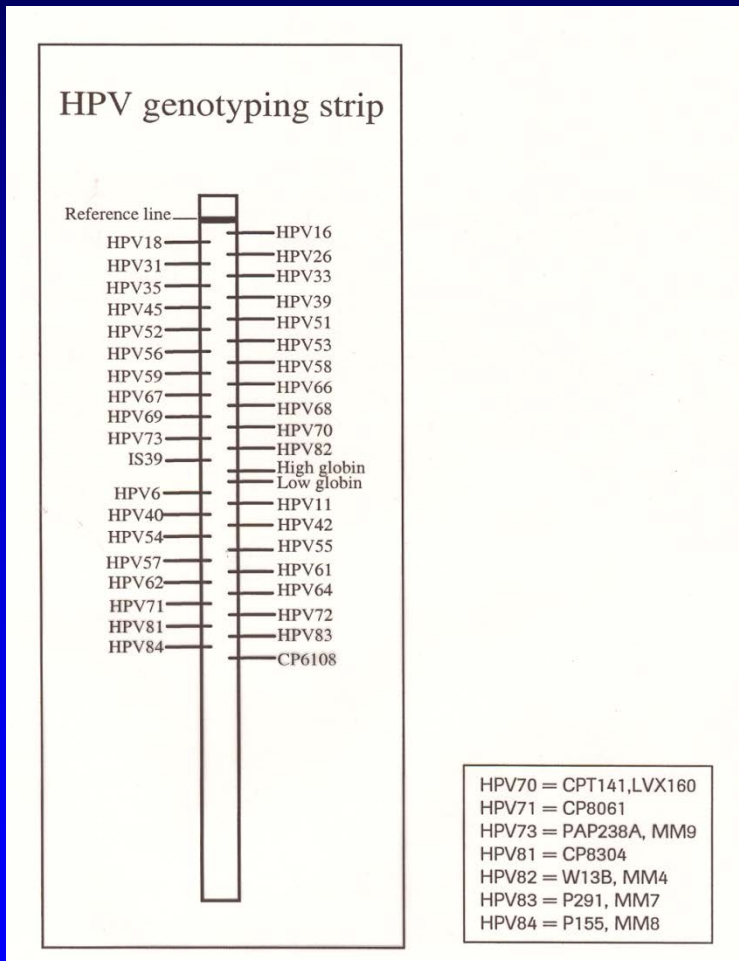


HPV 58 και HPV 59

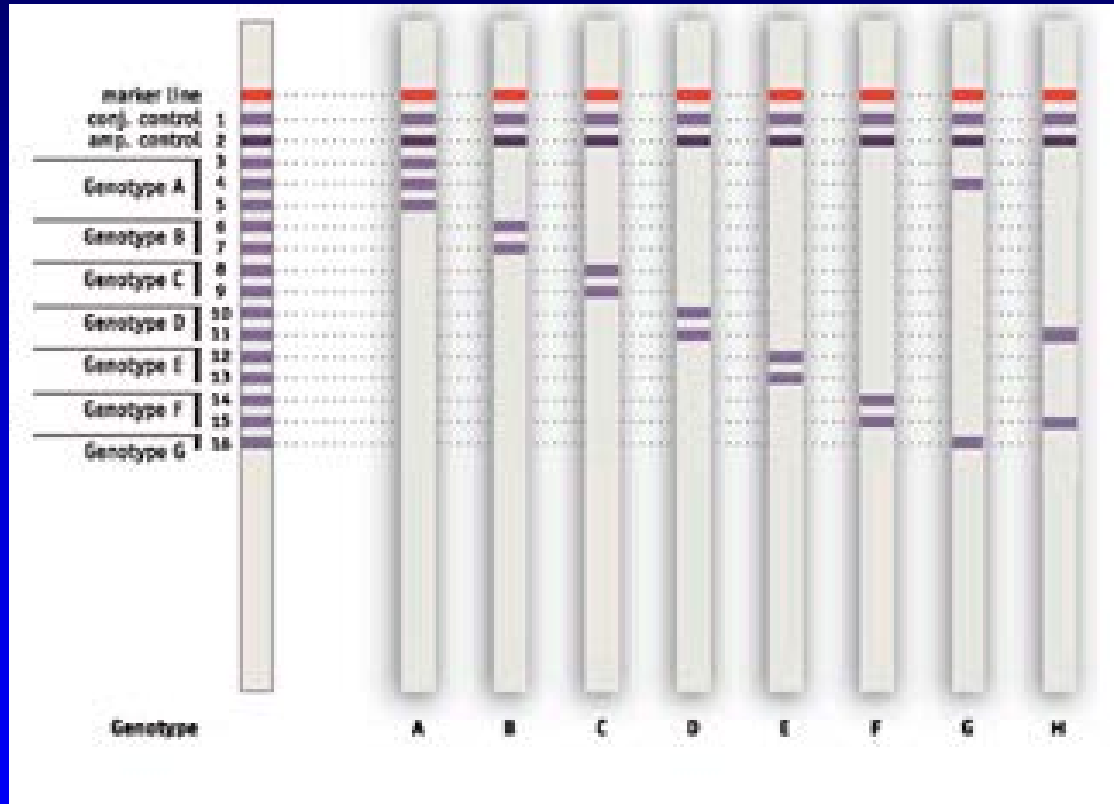
Ξεχωρίζει διπλές ή τριπλές μολύνσεις!

LINEAR ARRAY Genotyping test (Roche)

Τυποποίηση 37 HR+LR τύπων (PGMY-PCR + reverse line blot)



INNO-LiPA HPV Genotyping extra (DDL-Innogenetics)



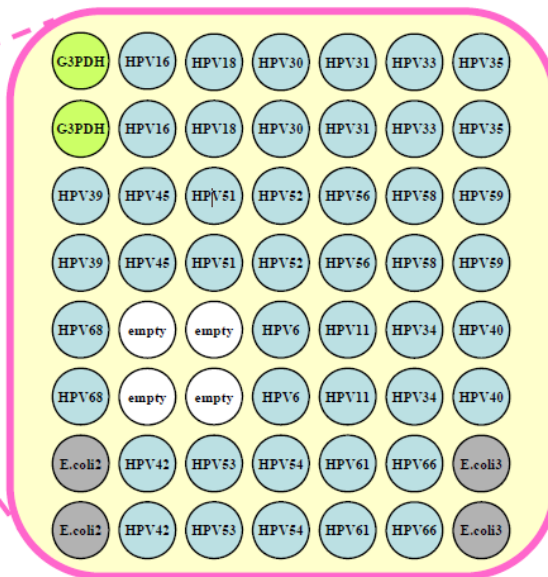
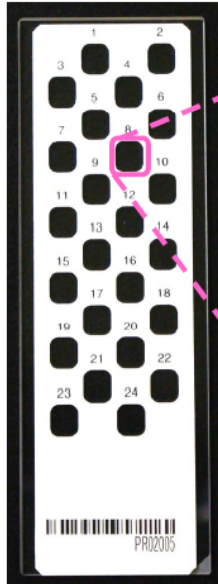
28 HR+LR types
SPF10 PCR +reverse line blot

HPV microarrays

KURABO

GeneSQUARE

Spot layout



Clart2 HPV2
Clinical Array
(Genomica)



MY-PCR

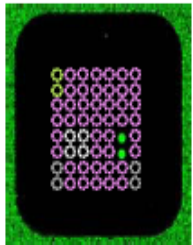
35 HR+LR types

Papillocheck HPV
(Greiner Bio-One)

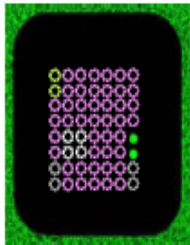
PCR (E1 gene)

24 HR+LR types

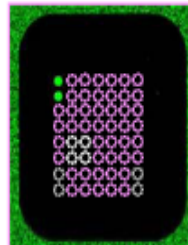
+ADAT1 ctrl



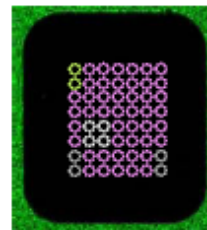
HPV34



HPV40



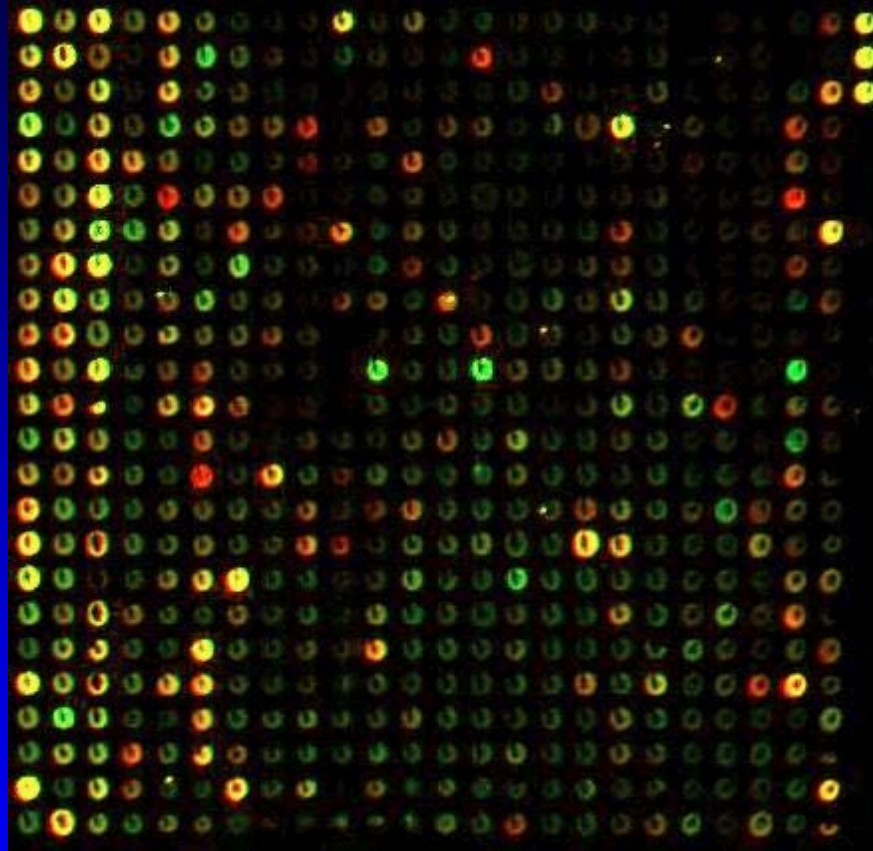
G3PDH



Negative Control

Multiplex SSP-PCR, 23 HR+LR types

HPV microarray

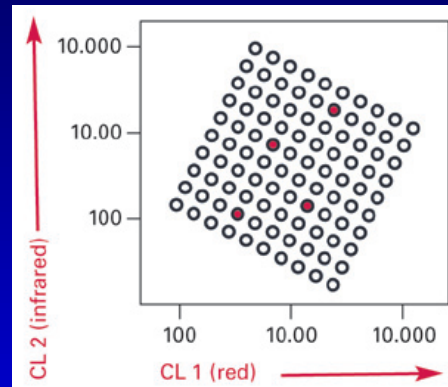
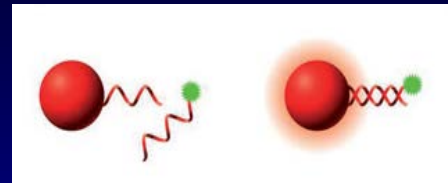
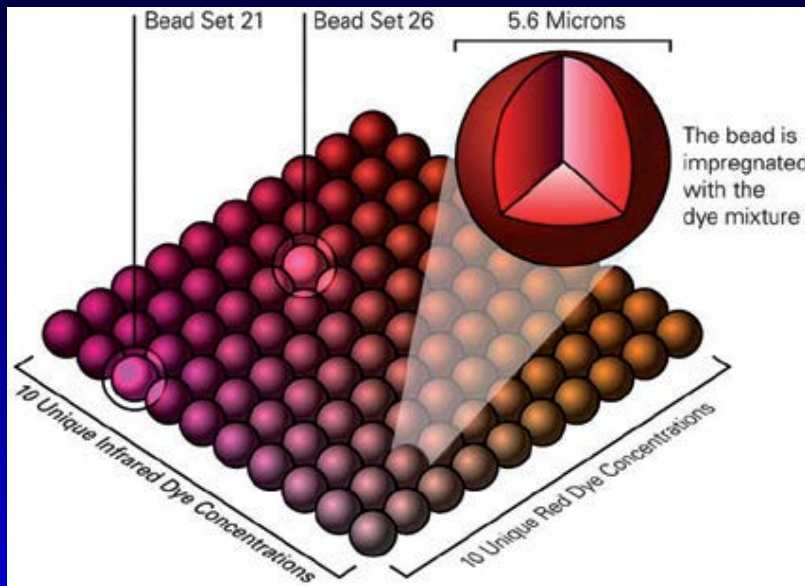


Εάν προστεθούν και ανιχνευτές για άλλους μικροοργανισμούς



υποκατάσταση pap test?

Liquid arrays (Luminex)



GP+ PCR and hybridization in Luminex

24 HR+LR types + b-globin ctrl

(Multimetrix)

Multiplex F-PCR - Fragment analysis



Capillary Electrophoresis

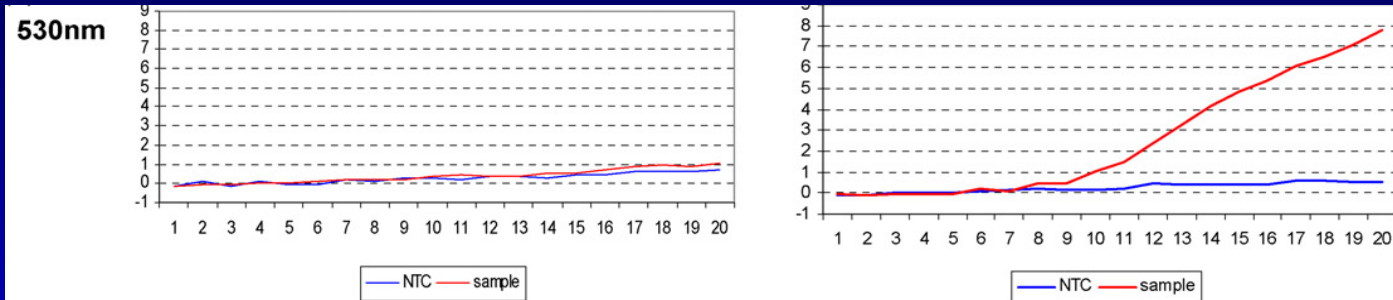
fHPV typing **(Molgentix)** 15 HR+LR/STR + 18plex **(Seegene)**

A2b. Partial HPV genotyping

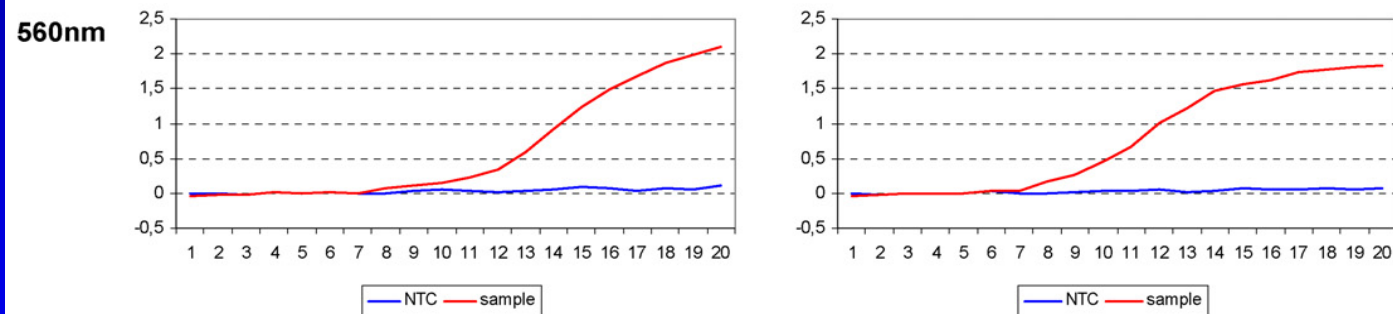
Real-time HPV detection

Roche Cobas 4800 – Abbott m2000 – Genoid (4 channels)
(+b-glb channel)

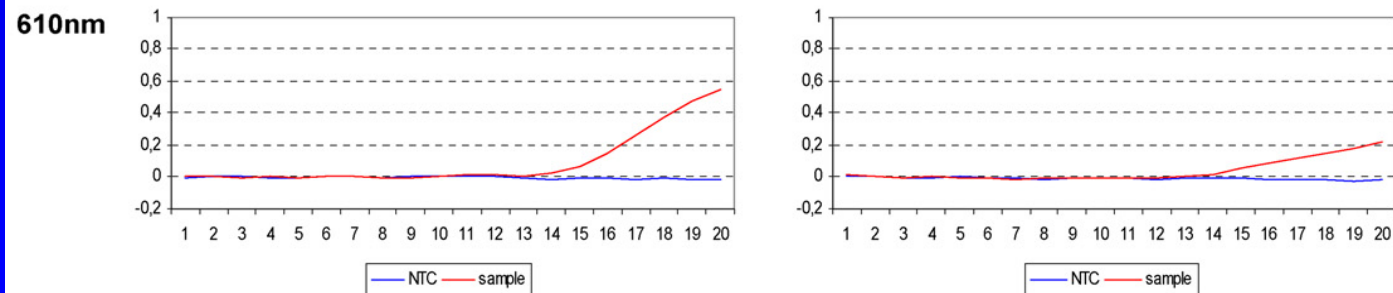
HPV 16



All HR



HPV 18



HPV 18 sample

HPV 16+HPV 18

Αυτοματοποίηση

ABBOTT



cobas[®] 4800 System **Roche**



Panther system

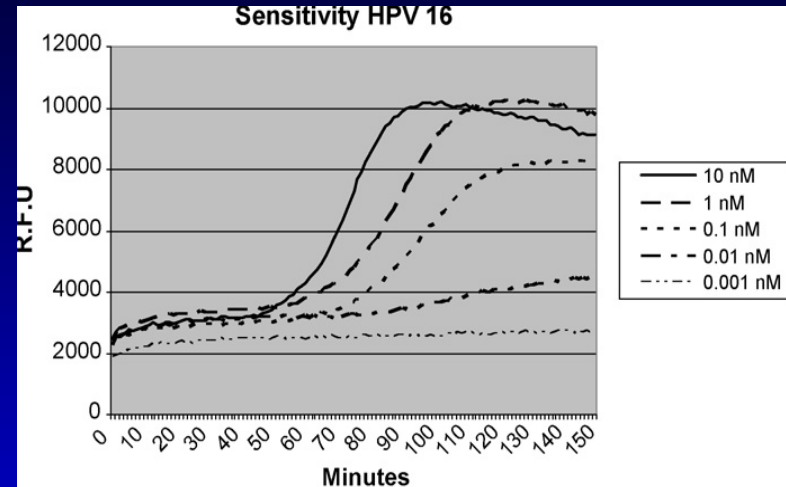
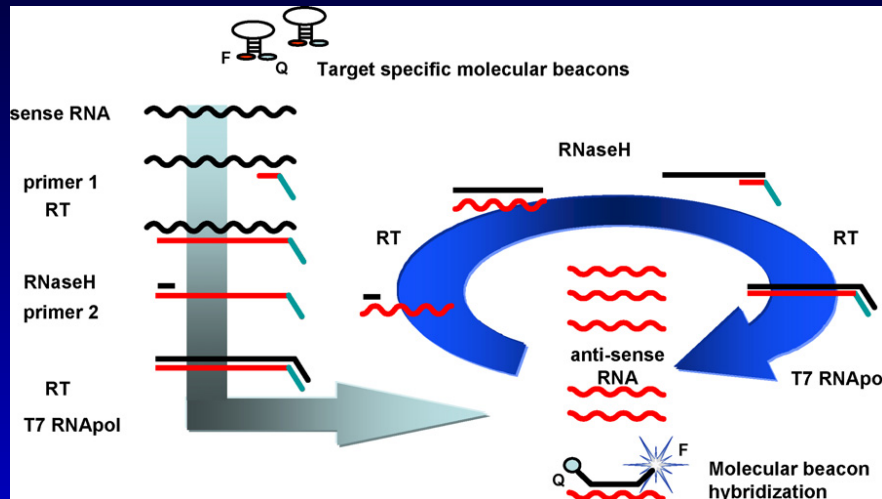
Hologic



Tigris DTS system

B. mRNA detection HPV E6/7

NASBA



1) NucliSens HPV (Biomerieux) -ex Pre-Tect Proofer (Norchip)

Full transcript, 5 types in 3 tubes:

i) HPV 16/U1 ctrl ii) HPV 33/45 iii) HPV18/31

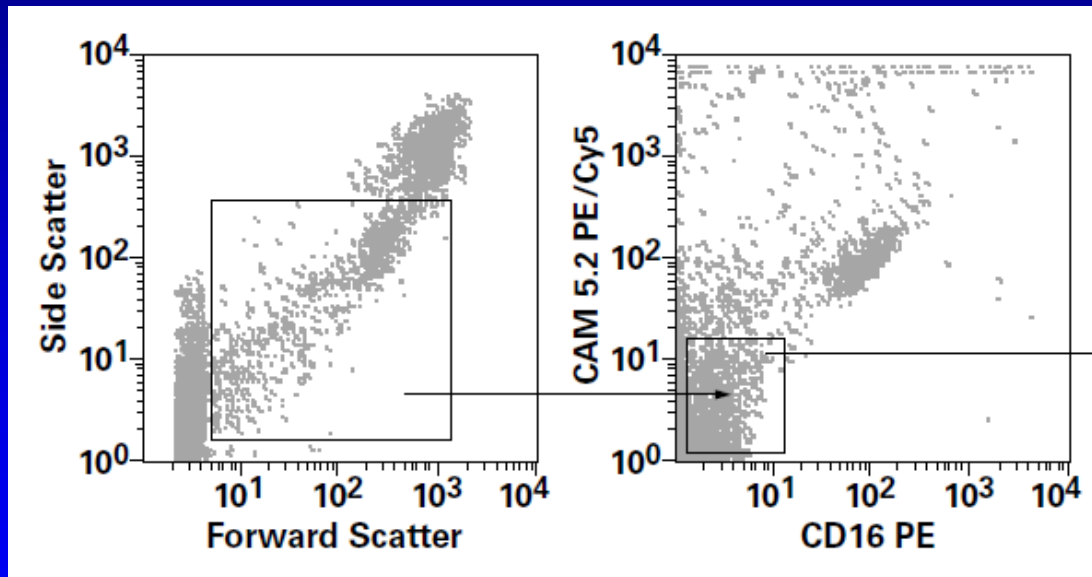
2) APTIMA (GenProbe) TMA method 14 HR types (aggregate)

3) In house Nested PCR, full and spliced transcript, type specific

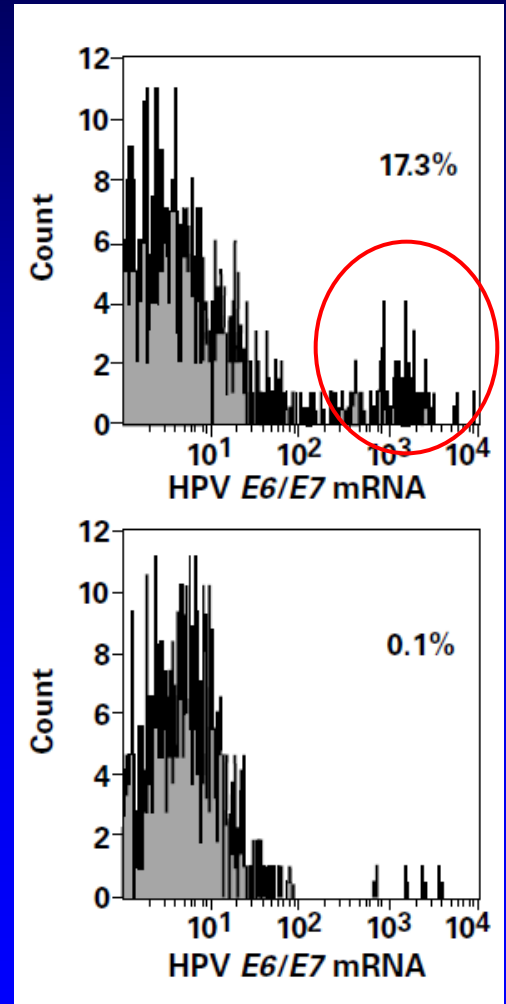
Flow-FISH

HPV OncoTect (inCellDx)

CK(-)/CD16(-)/mRNA(+) ectocervical cells



HPV pos (+)



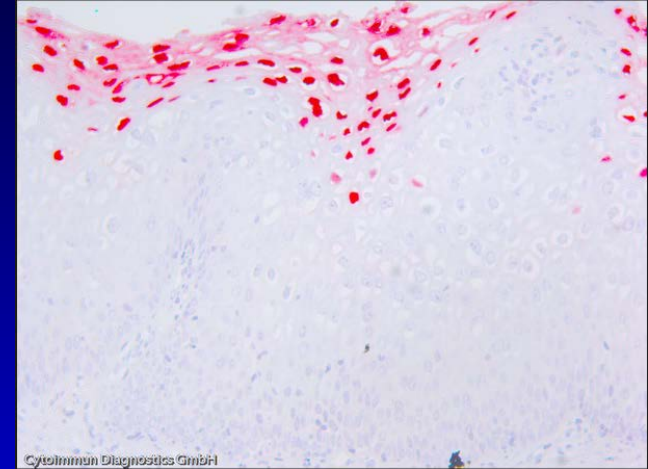
HPV neg (-)

C. Protein detection of HPV infection

Viral HPV proteins

a) **Cytoactiv** L1 protein IHC
(Cytoimmun)

b) In house E4 protein IHC



L1 HPV IHC

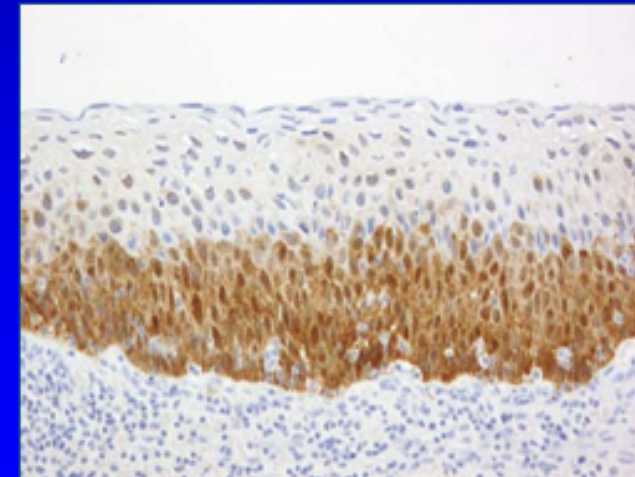
Host Human proteins

a) **CINtec** p16INK4A

i) IHC ii) ICC iii) ELISA

(Mtm Laboratories)

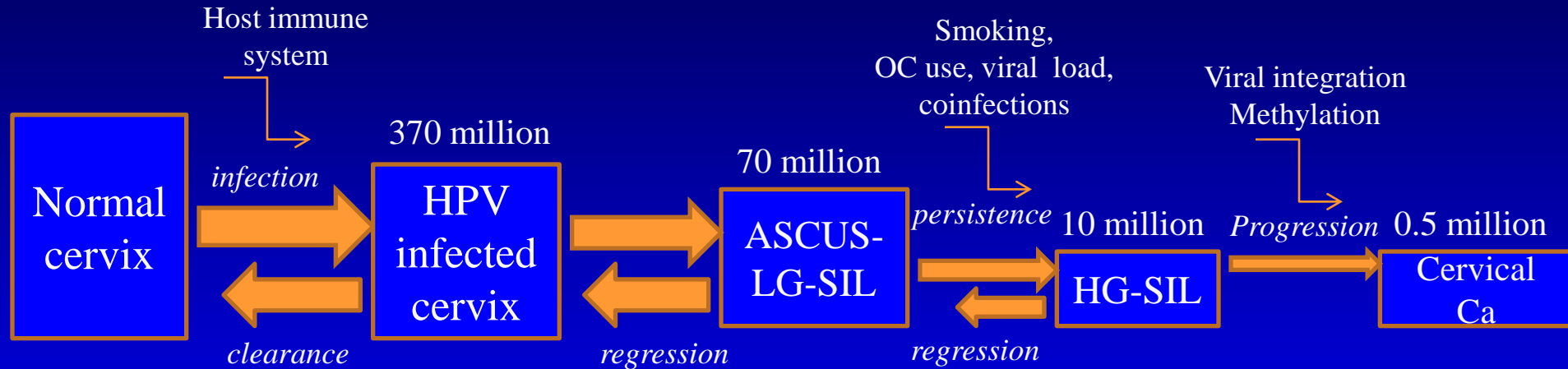
b) **ProEx C** (BD) TopoII2a/MCM2 IHC



p16 IHC

Τυπική πορεία HPV λοίμωξης

Εύρεση ιδανικού βιοδείκτη



Pap test :	-	+	+	+
HPV DNA:	+	+	+	+/-
E6/E7 mRNA:	-	+	++	++
L1 protein:	+	+	-	-
p16INK4A protein:	-	+	++	+
Ideal biomarker:	-	-	-/+*	+

Μελλοντικές κατευθύνσεις στην HPV διαγνωστική

- Viral integration (PCR, MLPA)
- Viral load (Real time QPCR)
- HPV 16/18 variants (DNA Sequencing)
- Επιγενετικοί δείκτες (MSP, Bisulfite sequencing etc)

Μελέτη στον Ελληνικό χώρο:

- α) η **μοριακή ανίχνευση και τυποποίηση του ιού HPV** σε μεγάλο αριθμό γυναικών με διαγνωσμένες προκαρκινικές αλλοιώσεις στη περιοχή των Αθηνών
- β) η **επιδημιολογική μελέτη** ώστε να εξαχθούν χρήσιμα συμπεράσματα ως προς την αποτελεσματικότητα του προτεινόμενου εμβολίου

Υλικό για απομόνωση DNA:

Κολποτραχηλικά δείγματα γυναικών

(n=1187, μέση ηλικία: 32 έτη, εύρος 16-72 ετών)

(Δ/ντής Κυτταρολογικού εργαστηρίου Μητέρα: Ν. Βουρλίδης)

Ένδειξη παρουσίας HPV (προκαρκινικές αλλοιώσεις):
κυτταρολογική ή ιστολογική ή κολποσκοπική εξέταση

Αποτελέσματα HPV ανίχνευσης

(n=1187)

Εφαρμογή 4 διαφορετικών PCR μεθόδων σε διαφορετικά γονίδια του HPV ιού για την όσο πιο δυνατόν αξιόπιστη ανίχνευσή του

Θετική (+) μοριακή ανίχνευση του HPV ιού σε 737 γυναίκες (62% των περιπτώσεων)

[124 περιπτώσεις με ασθενώς θετικό σήμα - χωρίς τυποποίηση]

Αρνητικό (-) για HPV το υπόλοιπο 38% των δειγμάτων (n=450) με όλες τις ανωτέρω PCR μεθοδολογίες!

Έλεγχος αξιοπιστίας με Thin-prep Pap test

Σε n=1004 από τα ανωτέρω δείγματα, παράλληλα εφαρμόσθηκε και η μέθοδος υγρής κυτταρολογίας Thin Prep (η πλέον αξιόπιστη κυτταρολογική μέθοδος)

	Pap (-)	Pap (+)
HPV DNA (-)	319 (31,8%)	57 (5,7%)
HPV DNA (+) [+ασθ. Θετ +]	105 (10,5%)	580 (52,1%)

Συμφωνία μεταξύ των δύο μεθόδων: 83,9%

HPV στην Ελλάδα

Σε 613 δυσπλασίες (ASC-US, LG-SIL, HG-SIL) με θετικό MY-PCR, έγινε τυποποίηση 1-3 ιών ανά δείγμα: σε 142 δείγματα υπήρχε διπλή λοίμωξη ενώ σε 17 δείγματα τριπλή λοίμωξη (συνολικά 897 HPV τύποι)

Κατανομή HPV τύπων

HPV 16 (16%)

HPV 53 (10 %)

HPV 6 (8%)

HPV 66/40 (7,4%)

HPV 31 (7,7%)

HPV 51 (5,6%)

HPV 58 (3,9%)

HPV 18 (3,5%)

HPV 11 (1,5%)

Άλλοι τύποι (36,4%)

Μερικό Άθροισμα: 29%
(έναντι τύπων εμβολίου)

Ο HPV 18 ο πιο επικίνδυνος τύπος λόγω μικρού χρόνου επώασης

Kroupis C. et al., Epidemiology and Infection 2007;135:943-950

Συμπεράσματα

- ❖ Μεγάλο ποσοστό (38%) με ψευδώς θετική ένδειξη για προκαρκινικές αλλοιώσεις (υπερδιάγνωση) – Αδυναμία λήψης προληπτικού εμβολίου στις γυναίκες 16-26 ετών – Ανάγκη για έλεγχο ποιότητας στη κυτταρολογική, ιστολογική, κολποσκοπική και μοριακή ανίχνευση!!!
- ❖ Αλλαγή κατανομής των HPV τύπων σε σχέση με παλαιότερες μελέτες (*Labropoulou et al., STD 1997;24,469-474*)
- ❖ Υπολογιζόμενη αποτελεσματικότητα εμπορικού εμβολίου έναντι των τύπων HPV 16, 18, 6 και 11: στο 29% του συνολικού αριθμού των HPV τύπων που ανευρέθησαν στον Ελληνικό γυναικείο πληθυσμό της περιοχής των Αθηνών με προκαρκινικές αλλοιώσεις

Άλλες λοιμώξεις ανιχνευόμενες μοριακά κατά τον γυναικολογικό έλεγχο

Με το ίδιο DNA που απομονώθηκε από το κολποτραχηλικό επίχρισμα

- **Ιός του έρπητα (HSV, Herpes Simplex Virus)**
- **Βακτήριο των γλαμυδίων του τραχώματος (Chlamydia trachomatis)**
- **Μυκοπλάσματα/Ουρεαπλάσματα**