

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

Dra. María Alejandra Picconi

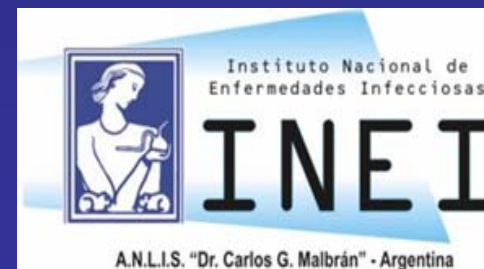
Jefe Servicio Virus Oncogénicos

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

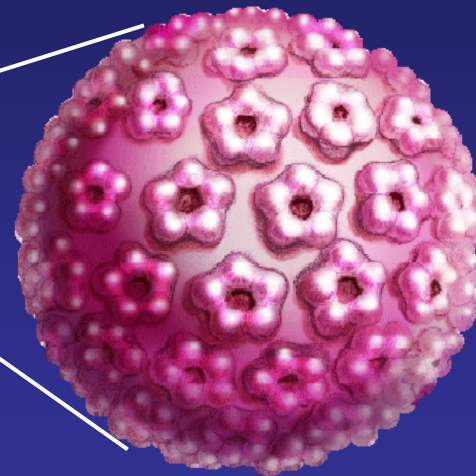
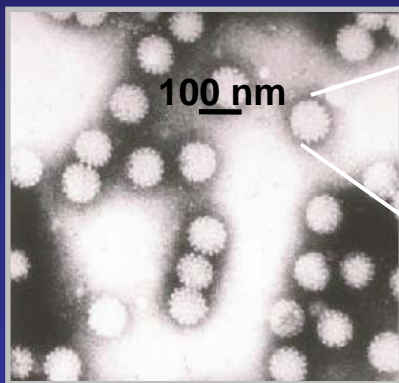


Temario

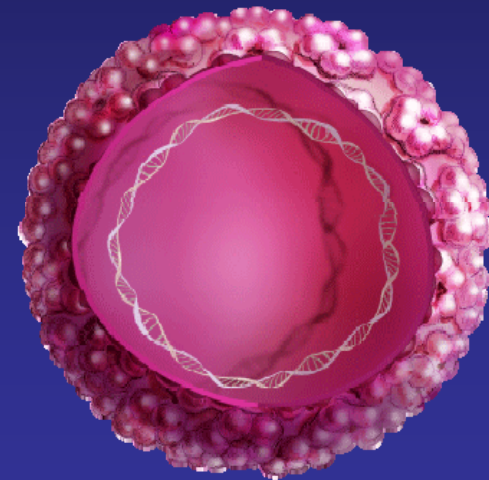
- **Virus Papiloma Humano (HPV): un virus especial**
- ¿Por qué vigilar la infección por HPV?
- Introducción a los métodos de laboratorio para el estudio de la infección por HPV. Criterio de selección de métodos según el objetivo
- Red Argentina de Laboratorios de HPV: un primer paso que sirvió de experiencia
- 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

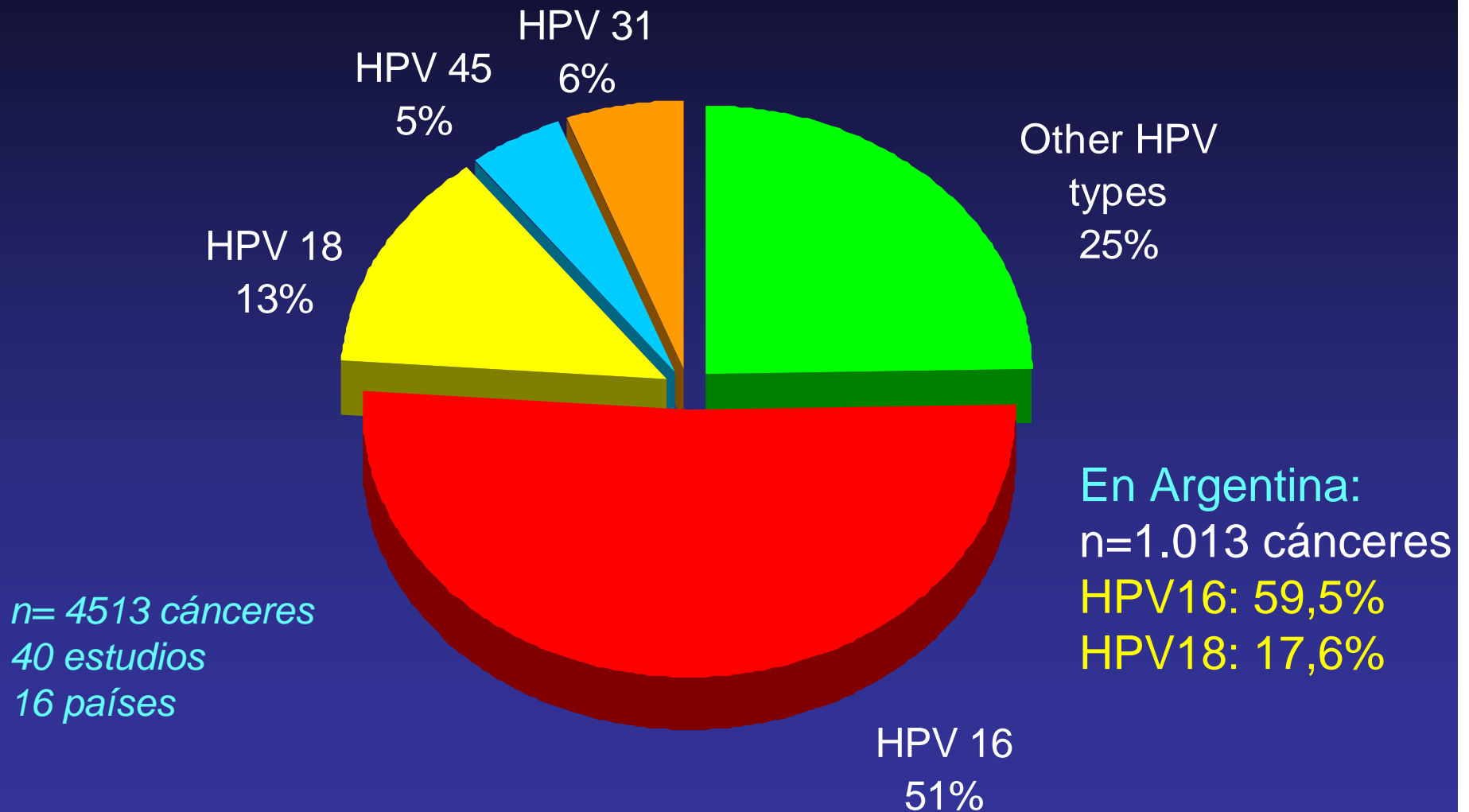
Tracto anogenital: **40 tipos de HPV**

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%

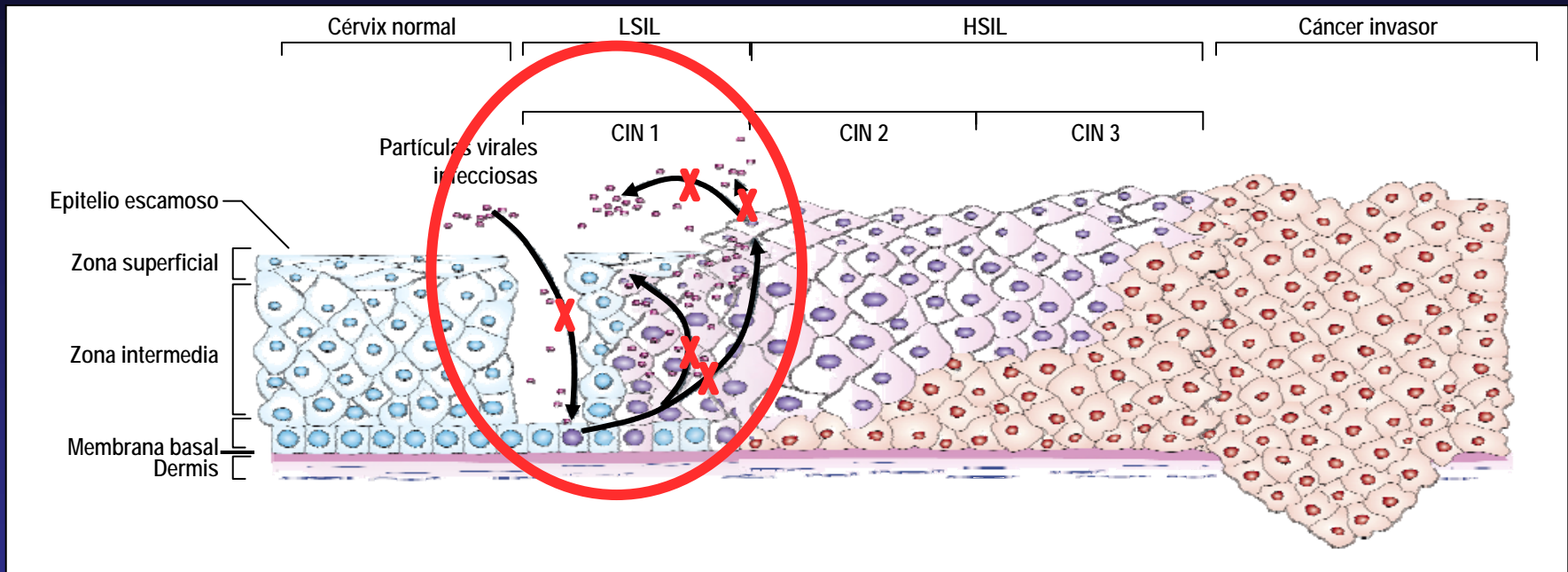
(Ciapponi y col, 24th Int Papillomavirus Conference, Beijing 2007)

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**



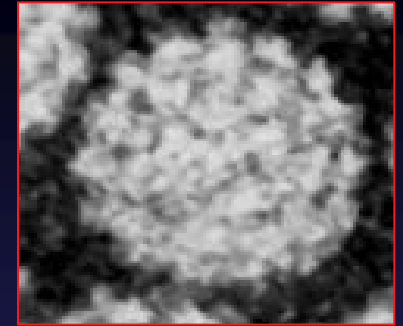
VIGILANCIA

(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

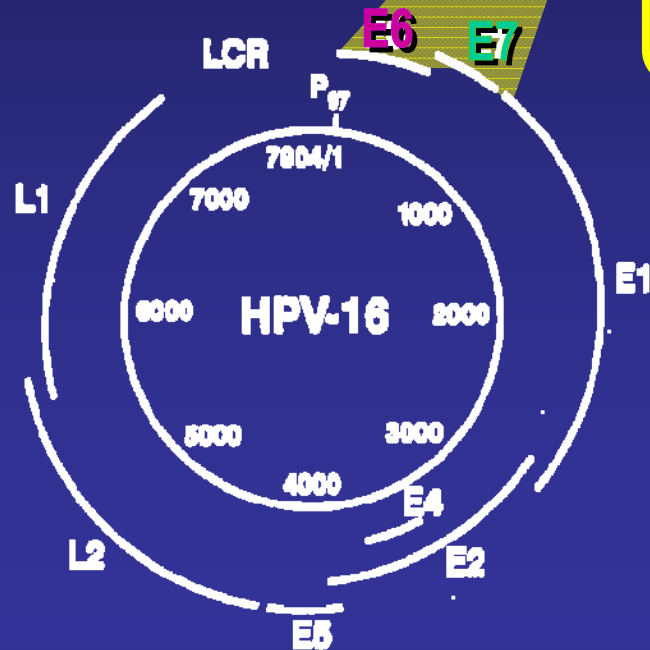


(Bernard y col, 1994; Jacobs y col., 1997; Gravitt y col, 1998; Kleter y col, 1999)

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

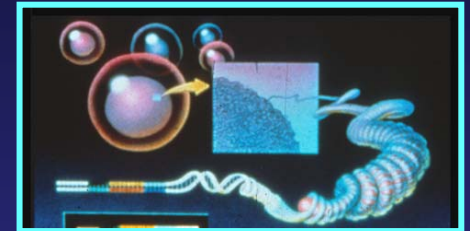
- *Mezcla A* (5 HPV BR): HPV 6, 11, 42, 43 y 44
Mezcla B (13 HPV AR): HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68
- **Se mide luz emitida:** proporcional a la cantidad de DNA viral
- Base para la reciente prueba *Care HPV*: *más rápida y accesible* (Proyecto piloto PATH en Perú, Uganda, India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

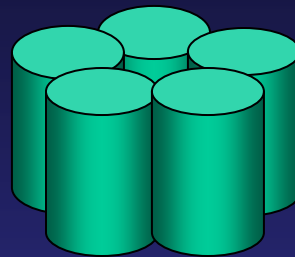
Serología para HPV

Depende de la conformación del antígeno usado



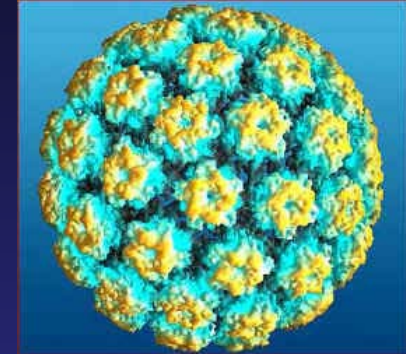
Monómero

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.*

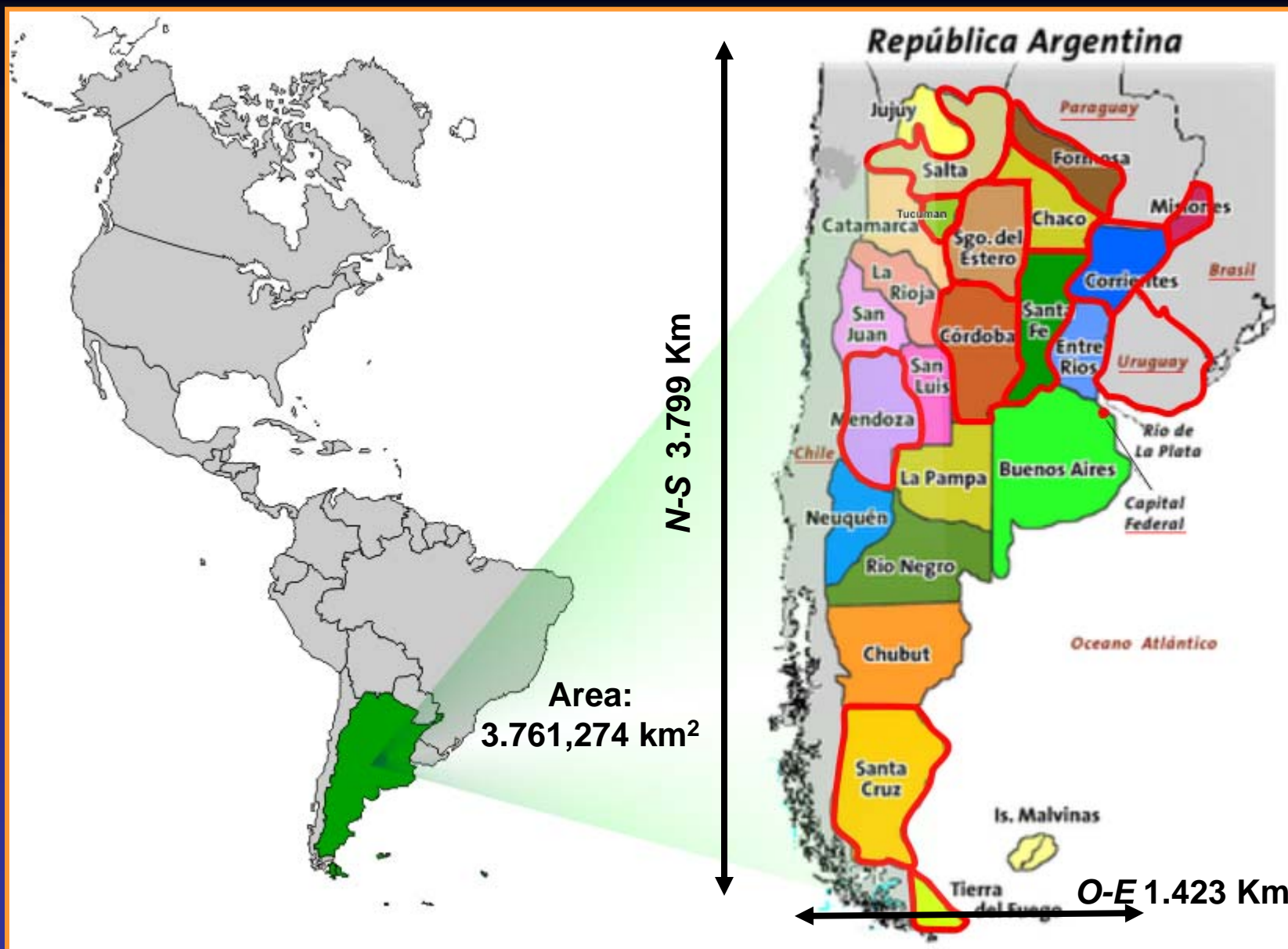
Normatizar las técnicas de diagnóstico molecular y unificar los criterios de información e interpretación de resultados.

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