



Termociclador Dedicado de Bajo Costo y Alta Sensibilidad para el Diagnóstico Molecular del Virus del Papiloma Humano

 8 min.



El virus del papiloma humano constituye un grupo de virus asociado con lesiones benignas y malignas de la mucosa epitelial. Hasta el presente más de 100 diferentes genotipos de HPV fueron identificados. Algunos de ellos están

presentes en lesiones precursoras de carcinoma cervical, por ejemplo el tipo HPV 16 y el tipo HPV18, considerados de alto riesgo y otros, como los genotipos 6 y 11 se asocian a bajo riesgo. El cultivo de HPV es complicado, por lo que el diagnóstico final recae en técnicas de biología molecular, algunas de ellas de alta complejidad y costo elevado, lo que dificulta este estudio en lugares de limitados recursos técnicos y económicos.



Luis Scigliano, Federico Garberi, Juan E. Garberi, Veronica Pascuccelli, Lidia Santolini, Miguel Garberi y Juan Garberi Hospital P. Piñero, Orange Solutions S:R.L., Lab. Biol. y Patol. Mol.



E-mail:
luisscigliano@yahoo.com.ar

DIAGAM

INMUNOTURBIDIMETRIA

 **DIAGAM**

Empresa de origen belga, líder en el desarrollo de reactivos para inmunturbidimetría, tecnología basada en el uso de oro coloidal. Apto para uso manual o automatizable.

KIT DE REACTIVOS, CALIBRADORES Y CONTROLES:

Albúmina	Complemento C3	Immunoglobulina A	Microalbuminuria
Alpha1-glicoproteína ácida	Complemento C4	Immunoglobulina G	Lipoproteína [a]
Alpha1-antitripsina	CRP (Proteína C Reactiva)	Immunoglobulina M	Fibrinogeno
Alpha2-macroglobulin	CRP XL Amplio rango	Lipoproteína [a] [Lpa]	Ferritina
Antitrombina III	CRP XS Cardio NanoGold	Microalbuminuria	Proteína C reactiva
Apolipoproteína A1	Ferritina	Prealbumina	Apolipoproteína A1 y B
Apolipoproteína B	Fibrinogeno	Factor reumatoideo	Factor reumatoideo
Ceruloplasmina	Haptoglobina	Transferrina	Calibrador multiparamétrico


BG Analizadores

BG ANALIZADORES S.A.
Aráoz 86 | C1414DPB | C. A. B. A. | Argentina
Tel: 54-11 4856-2024/5734/2876
Fax: 54-11 4856-5652
www.bganalizadores.com.ar
bga@bganalizadores.com.ar



Introducción

El virus del papiloma humano constituye un grupo de virus asociado con lesiones benignas y malignas de la mucosa epitelial. Hasta el presente más de 100 diferentes genotipos de HPV fueron identificados. Algunos de ellos están presentes en lesiones precursoras de carcinoma cervical, por ejemplo el tipo HPV 16 y el tipo HPV18, considerados de alto riesgo y otros, como los genotipos 6 y 11 se asocian a bajo riesgo. El cultivo de HPV es complicado, por lo que el diagnóstico final recae en técnicas de biología molecular, algunas de ellas de alta complejidad y costo elevado, lo que dificulta este estudio en lugares de limitados recursos técnicos y económicos.

Materiales y Metodos

El sistema que proponemos y desarrollamos aplica las bondades de sensibilidad, rapidez y especificidad de la reacción en cadena de

la polimerasa y lo adapta para su aplicación en regiones de bajos recursos, donde generalmente se presentan las mayores incidencias de la enfermedad. Éste se basa en el desarrollo de un termociclador dedicado al diagnóstico del virus del papiloma humano, de bajo costo y fácil de producir, combinado con un sistema de procesamiento de la muestra y detección del producto amplificado, de escaso número de etapas y fácil de realizar, aún con relativamente baja capacitación del operador. Realiza una inactivación de la muestra como primer paso que preserva la seguridad del operador y todo el sistema se presenta en forma de un equipo cerrado y listo para su utilización que involucra tres etapas de fácil y rápida ejecución, a saber (Fig. 1):

a) inactivación, decontaminación y exposición de los ácidos nucleicos (sistema de procesamiento de muestra y extracción ácidos nucleicos Orange G3HPV).

b) amplificación de la región L1 del genoma del virus del papiloma humano (HPV) (Fig. 2) a partir del material obtenido mediante la

utilización del termociclador dedicado G3HPV con metodología USE (una sola etapa) Fig 3 y reactivos integrados listos para su utilización Orange G3 HPV amplificación.



Fig. 1: Esquema del proceso utilizado para la detección general del HPV

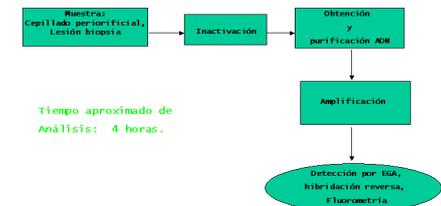
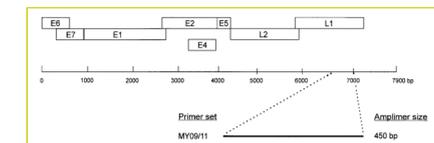


Fig. 2: Esquema del genoma del virus del Papiloma Humano y región que se somete al proceso de termoamplificación.



FORMAMOS UNA LIGA CON PODERES SOBRENATURALES PARA MEJORAR EL MUNDO Y COMBATIR EL CAOS



LA EMPERATRIZ DE LA LIGA, "SUPER BIO-ARS", ANUNCIA QUE TODOS LOS SUPERHÉROES ESTÁN A SUS ÓRDENES, SOLICÍTELOS EN WWW.BIOARS.COM.AR

No se pierda el próximo capítulo... 
Liga del Diagnóstico





Fig. 3: Termociclador dedicado de bajo costo nacional Orange G3HPV para la amplificación de genoma del virus del papiloma Humano, región L1.

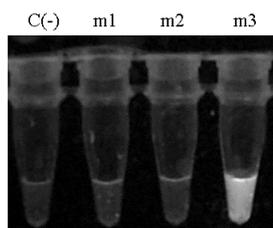


c) detección del producto amplificado por :

i) sistema fluorométrico (los valores se registran en una bitácora electrónica para su posterior análisis epidemiológico), Fig. 4.



Fig. 4: Evaluación de fluorescencia generada en el proceso de amplificación. No requiere apertura del tubo y puede ser monitoreada con instrumento específico (fluorómetro).

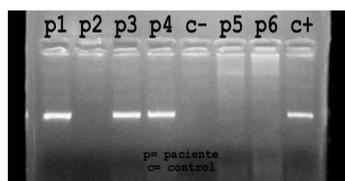


C(-), control negativo; m1, m2 y m3 muestras de los mismos pacientes analizados por EGA en la Fig. 8.

ii) electroforesis en gel de agarosa (EGA), Fig. 5.



Fig5: Electroforesis de los productos en gel de agarosa al 1,5 % y tinción con Sybr Green 1. Líneas 4 y 8 controles negativo y positivos respectivamente, líneas 1, 2, 3, 5, 6 y 7 muestras analizadas de pacientes provenientes de cepillados periorificiales.



iii) sistema de hibridación reversa para

establecer su genotipo de acuerdo a la secuencia de los primeros 65 nucleótidos del fragmento amplificado, Fig. 6.

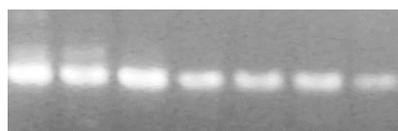


Fig. 6: Hibridación reversa e inmunoensayo. Muestras m1, m2 y m3 productos de amplificación hibridados con sondas específicas para consenso de HPV provenientes de muestras de pacientes con diferentes cargas virales. C(+), control positivo; C(-), control negativo.



Fig. 7: Curva de fragmento clonado del virus de Papiloma Humano, utilizado como control. Límite de sensibilidad establecido en nuestro sistema = 50 copias de genoma por ml de muestra.

Resultados



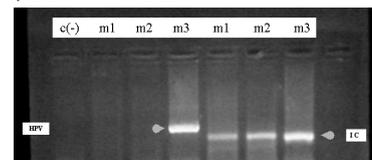
El sistema de procesamiento de muestra Orange G3 HPV Extracción asociado al sistema integrado Orange G3 HPV Amplificación nos permite evaluar la presencia del genoma viral del Virus del Papiloma Humano (HPV) con una sensibilidad de 50 copias por ml de medio de transporte. El fragmento amplificado permite obtener el genotipo del virus del HPV, ya sea mediante secuenciación cíclica o utilizando sondas específicas para las variantes de nucleótidos presentes en la secuencia.

El termoamplificador dedicado Orange G3 HPV contiene el firmware de programa introducido y para su operación solo se requiere seguir las simples instrucciones que se detallan en el display. En el mismo ensayo se pueden realizar el análisis de la presencia del genoma de HPV en la muestra utilizada y la validación de la extracción y amplificación mediante el estudio de un gen constitutivo (IC) como se

observa en la Fig. 8.



Fig. 8: Análisis de muestras en la misma corrida que su validación de extracción y amplificación.



Conclusiones

El sistema ha sido diseñado con capacidad de utilizarse en Laboratorios de Baja Complejidad, evitando requerir de infraestructura edilicia y tecnológica de Alta Complejidad. Es en si mismo un instrumento portable para utilización en campo con capacidad de instalación en cualquier punto del país. La inactivación inicial de la muestra biológica preserva la bioseguridad del operador.

El ensayo presenta una alta sensibilidad para la detección del microorganismo (menos de 50 copias de genoma por PCR) con un tiempo de procesamiento de cuatro horas reales de trabajo.

El sistema de procesamiento es cerrado, sencillo y de pocas etapas que permite la rápida capacitación del operador (de 1 a 2 días).

Todo el sistema esta integrado con controles de extracción y amplificación que monitorean la eficiencia del proceso diagnóstico.

La comunicación serial via telefónica o red Internet que permite monitorear y coordinar, en tiempo real, los relevamientos a distancia con fines de control epidemiológico o evaluación de los equipos instalados.

Referencias:

- 1-A Comparison of Two PCR-Based Human Papillomavirus Genotyping Methods. Philip E. Castle, Carolina Porras, Wim G. Quint, et al. J. Clin. Microbiol. doi:10.1128/JCM.00620-08 - (2008)
- 2- A Novel Strategy for Human Papillomavirus Detection and Genotyping with SybrGreen and Molecular Beacon Polymerase Chain Reaction. Karoly Szuhai, Emily Sandhaus, Sandra M. Kolkman-Uljee, Marc Lemaitre, Jean-Christophe Truffert, Roeland W. Dirks, Hans J. Tanke, Gert Jan Fleuren, Ed Schuurung, and Anton K. Raap. American Journal of Pathology, Vol. 159, No. 5, (2001)

