

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN NUEVO TIPO DE PAPILOMAVIRUS

Diego Arroyo, Diana Corella, Marga Edo, Rosa Bermejo y Nuria Villena
Progenie Molecular S.L. Artes y Oficios 37, 46021, Valencia

Introducción

Los papilomavirus constituyen un grupo de virus con una destacable heterogeneidad. Hasta el momento se han caracterizado totalmente más de 120 genotipos distintos, y se han detectado cientos de aislados diferentes, que son considerados subtipos o variantes de los tipos de referencia.

El criterio para la definición de tipo, subtipo y variante de papilomavirus se ha establecido arbitrariamente en base a la similitud de sus secuencias de nucleótidos. Un genoma de papilomavirus se define como un nuevo tipo si presenta diferencias superiores al 10 % en el conjunto de la secuencia de nucleótidos del ORF L1 respecto a cualquier tipo conocido.

Método

Caso clínico: Mujer de 46 (año 2003)

- Estudio histológico: en sucesivas citologías exfoliativas genitales se detectó una lesión intraepitelial de alto grado o HSIL (*High Squamous Intraepithelial Lesion*). El estudio de una biopsia del epitelio cervical mostró una displasia severa (carcinoma *in situ*) clasificada como una neoplasia intraepitelial cervical de alto grado o CIN3 (*Cervical Intraepithelial Neoplasia*).

- Detección del ADN de VPH: positivo (genotipo indeterminado) en dos pruebas consecutivas (kit *Papitype*[®], Progenie Molecular, S.L.).

- Tratamiento y seguimiento: se practicó una biopsia cónica terapéutica (conización) para eliminar el epitelio cervical dañado. Los estudios citológicos practicados durante los tres años siguientes mostraron la ausencia de lesiones intraepiteliales y un resultado negativo en las pruebas de detección de VPH.

Muestra clínica: células exfoliadas del epitelio cervical mediante escobillón seco de algodón. La muestra fue registrada con la referencia A0383.

Detección e identificación de VPHs (kit *Papitype*, Progenie molecular SL)

1) Extracción del ADN vírico: lisis de las proteínas víricas y celulares utilizando proteinasa K en un tampón adecuado.

2) Amplificación mediante PCR: se amplificó un fragmento de 450 pb del ORF L1 utilizando los conocidos oligonucleótidos genéricos MY11 y MY09.

3) Tipado mediante fragmentos de restricción (RFLPs): se utilizaron dos mezclas de enzimas de restricción para la obtención de dos patrones de restricción a partir del producto de amplificación obtenido en la muestra clínica. Por comparación con los patrones de restricción correspondientes a 58 genotipos de VPHs se comprobó que la muestra era portadora de un tipo no identificado.

Caracterización del aislado A0383

Obtención de la secuencia del genoma completo de A0383: se amplificaron y secuenciaron 16 fragmentos solapados del genoma vírico. A partir de estos secuencias parciales se compuso la secuencia del genoma completo.

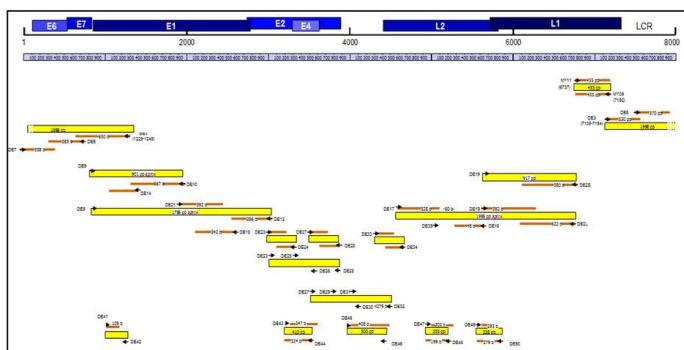


Figura 1. Esquema de la secuenciación del genoma completo del nuevo aislado. El esquema muestra la posición aproximada de los 46 oligonucleótidos utilizados para las reacciones de amplificación o secuenciación (flechas), los fragmentos amplificados (barras amarillas) y las secuencias parciales obtenidas a partir de éstos (líneas rojas). La secuencia completa del genoma vírico pudo construirse mediante la composición de las secuencias parciales.

Resultados

Análisis de la secuencia del ORF L1 del nuevo aislado A0383: se secuenció el ORF L1 completo (región utilizada como criterio taxonómico de los VPHs). La comparación mediante el algoritmo BLAST mostró una similitud del 89 % respecto al tipo filogenéticamente más próximo (VPH 72) por lo que el aislado A0383 debe ser considerado un nuevo tipo de VPH.

Estudio filogenético del aislado A0383: se ha realizado un estudio filogenético basado en el ORF L1 (ver figura 2).

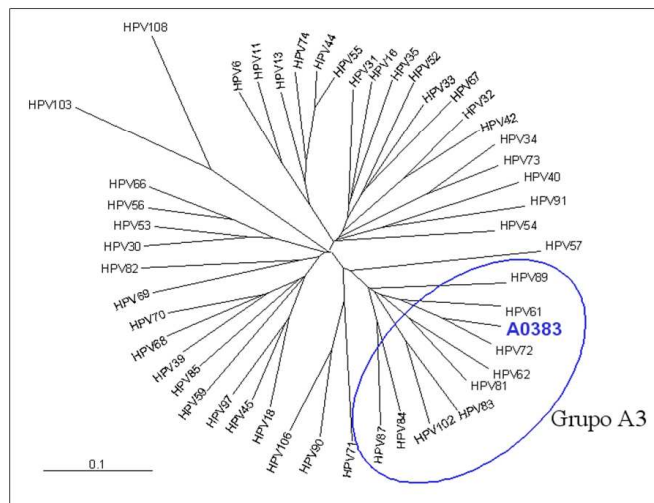


Figura 2. Estudio filogenético del nuevo aislado A0383. El aislado A0383 presenta máxima proximidad filogenética con el tipo 72. Queda incluido en el grupo A3, formado por los tipos 61, 62, 72, 81, 83, 84, 86, 87, 89 y 102, considerados VPHs de bajo riesgo.

Secuenciación del genoma completo del nuevo aislado: se ha completado la secuenciación de los 8.017 nucleótidos del genoma del aislado descrito. El genoma consiste en una doble cadena de ADN circular con un contenido en GC del 45,8 %. La organización genética del aislado descrito es similar a la de otros VPHs filogenéticamente próximos. Se han identificado los ORFs E6, E7, E1, E2, E4, L2 y L1, además de las regiones reguladoras y de otras regiones no codificantes.

Análisis de la secuencia completa del nuevo aislado A0383: la comparación mediante el algoritmo BLAST mostró una similitud del 88 % respecto al tipo filogenéticamente más próximo (VPH 72) corroborando que se trata de un nuevo tipo vírico.

Denominación del aislado A0383

De acuerdo con los criterios de clasificación actuales el VPH descrito es un nuevo tipo de papilomavirus. No obstante, el denominado *Reference Center for Human Papillomaviruses* (*German Cancer Research Center – Heidelberg*) sólo otorga una numeración y la consideración de tipo a los aislados cuyo genoma completo ha podido ser clonado. En caso contrario, los aislados sólo son reconocidos por la denominación propia del laboratorio que lo ha descubierto, en este caso A0383.

Conclusiones

- 1) El aislado A0383 es un tipo de papilomavirus de acuerdo con los criterios de clasificación actuales.
- 2) El aislado A0383 presenta una similitud de secuencia con respecto al VPH 72 (el tipo filogenéticamente más próximo) del 89 % en el ORF L1 y de 88 % en la secuencia del genoma completo.
- 3) La clasificación y denominación como nuevo tipo dependerá de la posibilidad de clonar el genoma completo y de su aceptación por el *Reference Center for Human Papillomaviruses*.