



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C
POR SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN 5' UTR.

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

RAMÓN ALBERTO VÁZQUEZ OVIEDO



DIRECTOR: DR. EDUARDO STALIN GARCÍA LÓPEZ

ASESOR: Q.F.B. LOURDES VEGA NAVARRETE

MÉXICO, DF.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó en el departamento de Biología Molecular de Carpermor S.A. de C.V., Laboratorio de Referencia Internacional, bajo la dirección del Dr. Eduardo Stalin García López y M. en C. Minerva Mata Rocha; Codirección de la Q.F.B. Lourdes Vega Navarrete Docente de la Carrera de Química Farmacéutica Biológica en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la UNAM y directora del laboratorio ANIGEN Centro de Estudios e Investigaciones.

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

A DIOS:

Por permitirme el don de la vida, la salud, la inteligencia, sabiduría y fortaleza para poder alcanzar este triunfo y porque me ha guiado y cuidado hasta hoy, siendo el que me ha dado todo lo que hasta hoy tengo.

A MIS PADRES:

Lidia Oviedo Hernández y Efrén Vázquez Ruiz, por su cariño, amor, apoyo, dedicación y empeño, por ayudarme a ser la persona que soy hasta ahora y por tanto esfuerzo que realizaron para que yo alcanzara este triunfo.

A MIS HERMANOS:

Nancy Verónica, Jhonny Efrén y María Estefanía Por su cariño, apoyo y comprensión.

A TODOS LO QUE COLABORARON EN LA ELABORACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO:

Por su gran apoyo, unos con cariño, paciencia, amistad, aliento o conocimiento, otros que tuvieron la confianza de indicarme errores y desaciertos que permitieron disciplinarme, ambos generan mayor conocimiento, superación, experiencia y la satisfacción de llegar a la meta propuesta, este gran logro.

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA Y SUS DOCENTES:

Por compartir sus conocimientos e instruirme como lo que soy hasta ahora.

**A LOS LABORATORIOS DE REFERENCIA INTERNACIONAL CARPERMOR
S.A. DE C.V. Y SUS COLABORADORES:**

Por permitirme realizar este proyecto.

A LA DRA. MARTHA A. SÁNCHEZ RODRÍGUEZ:

Por su apoyo incondicional y darme la oportunidad de realizar este proyecto en los laboratorios Carpermor.

**AL DR. EDUARDO STALIN GARCÍA LÓPEZ Y LA M. EN C. MINERVA MATA
ROCHA:**

Por su apoyo y asesoramiento incondicional en la realización de este proyecto.

**A TODOS MIS SINODALES, Q.F.B. LOURDES VEGA NAVARRETE,
M. EN C. LEONOR AGUILAR SANTELISES, M. EN C. RAQUEL RETANA
UGALDE Y MTRA. YOLANDA FLORES CABRERA:**

Por su apoyo y corrección en la realización del presente trabajo

**Y A TODOS LOS PARTICIPANTES PARA LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE
TRABAJO.**

CONTENIDO

| | |
|--|----|
| RELACIÓN DE FIGURAS | 1 |
| RELACIÓN DE CUADROS | 3 |
| INTRODUCCIÓN | 4 |
| 1. ANTECEDENTES | 6 |
| 1.1. Hepatitis | 6 |
| 1.1.1. Definición | 6 |
| 1.1.2. Clasificación | 6 |
| 1.1.2.1. No Virales | 6 |
| 1.1.2.1.1. Hepatitis toxica y medicamentosa | 6 |
| 1.1.2.1.2. Hepatitis Alcohólica | 8 |
| 1.1.2.1.3. Hepatitis bacterianas o parasitarias | 8 |
| 1.1.2.2. Virales | 8 |
| 1.1.3. Hepatitis C | 11 |
| 1.1.3.1. Características | 11 |
| 1.1.3.1.1. Patogenia y respuesta inmunológica | 11 |
| 1.1.3.1.2. El virus de la Hepatitis C (VHC) | 13 |
| 1.1.3.1.2.1. Descubrimiento | 13 |
| 1.1.3.1.2.2. Taxonomía | 13 |
| 1.1.3.1.2.3. Morfología y estructura | 15 |
| 1.1.3.1.2.4. Estructura genómica | 17 |
| 1.1.3.1.2.4.1. Proteínas virales | 18 |
| 1.1.3.1.2.5. Variabilidad genética (Genotipos, subtipos y cuasiespecies) | 19 |
| 1.1.3.1.3. Epidemiología | 21 |
| 1.1.3.1.4. Métodos de diagnóstico | 23 |

| | |
|--|----|
| 1.1.3.1.4.1. Detección de genotipo | 24 |
| 2. JUSTIFICACIÓN | 27 |
| 3. OBJETIVOS | 28 |
| 3.1. Generales | 28 |
| 3.2. Particulares | 28 |
| 4. HIPÓTESIS | 28 |
| 5. MATERIAL Y EQUIPO | 29 |
| 5.1. General | 29 |
| 5.2. Particular | 29 |
| 5.2.1. Diseño de Primers | 29 |
| 5.2.2. Extracción de ARN | 29 |
| 5.2.3. RT-PCR | 29 |
| 5.2.4. Determinación de la calidad del RT-PCR y purificación del producto de PCR | 30 |
| 5.2.5. Secuenciación | 30 |
| 5.2.6. Recursos empleados para el análisis de resultados | 30 |
| 6. MÉTODO | 31 |
| 6.1. Obtención de la secuencia genómica del VHC y diseño de los Primers para su amplificación y secuenciación. | 31 |
| 6.2. Extracción de ARN | 31 |
| 6.3. RT-PCR | 32 |
| 6.4. Determinación de la calidad del RT-PCR y purificación del producto de PCR | 33 |
| 6.5. Secuenciación y purificación de los productos | 33 |
| 6.6. Recursos empleados para el análisis de resultados | 34 |
| 7. RESULTADOS | 35 |
| 7.1. Región de amplificación y secuenciación (5'UTR) | 35 |
| 7.2. Secuencias nucleotídicas de los diferentes genotipos | 36 |

| | |
|---|----|
| 7.3. Análisis del alineamiento de las secuencias nucleotídicas de los distintos genotipos | 38 |
| 7.4. RT-PCR | 39 |
| 7.5. Secuenciación | 40 |
| 7.6. Validación del método | 47 |
| 7.6.1. Precisión | 47 |
| 7.6.2. Exactitud | 48 |
| 7.6.3. Especificidad analítica | 49 |
| 7.6.4. Sensibilidad y Linealidad analítica | 50 |
| 8. DISCUSIÓN | 52 |
| 9. CONCLUSIONES | 60 |
| 10. PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES | 61 |
| 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 62 |
| 12. GLOSARIO | 65 |
| 13. ANEXOS | 68 |

RELACIÓN DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Órgano afectado por la hepatitis | 6 |
| Figura 2. Información general de las hepatitis virales | 10 |
| Figura 3. Historia natural de la hepatitis C | 11 |
| Figura 4. Historia natural de la hepatitis C crónica y su variabilidad de persona a persona | 12 |
| Figura 5. Estructura antigénica del VHC, comparada con los <i>Flavivirus</i> y los <i>Pestivirus</i> | 14 |
| Figura 6. Modelo de la estructura del virus de la hepatitis C | 16 |
| Figura 7. Representación esquemática del genoma del VHC | 17 |
| Figura 8. Variabilidad genética del Virus de la hepatitis C. Genotipos, Subtipos y cuasiespecies. | 19 |
| Figura 9. Homología y nomenclatura de las variantes del VHC. | 20 |
| Figura 10. Número de personas infectadas en diferentes zonas geográficas | 21 |
| Figura 11. Prevalencia de los distintos genotipos del VHC en las diferentes partes del mundo | 22 |
| Figura 12. Fundamento e interpretación del INNO-LIPA® HCV II | 25 |
| Figura 13. Resumen del procedimiento para obtener el genotipo del VHC | 34 |
| Figura 14. Secuencia nucleotídica de la región 5'UTR | 35 |
| Figura 15. Secuencias nucleotídicas de los diferentes genotipos. | 37 |
| Figura 16. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de la región 5'UTR de los diferentes genotipos y la parte inicial de la región de la nucleocápside o región core. | 38 |
| Figura 17. Producto de RT-PCR. | 39 |
| Figura 18. Producto de RT-PCR de muestras. | 40 |
| Figura 19. Secuencia del Genotipo 1a de ARMORED TECHNOLOGY™ con el primer Forward. | 41 |
| Figura 20. Secuencia del Genotipo 1a de ARMORED TECHNOLOGY™ con el primer Reverse. | 42 |

| | |
|---|----|
| Figura 21. Electroferograma del Genotipo 1a ARMORED TECHNOLOGY™. | 43 |
| Figura 22. Alineamiento del Genotipo 1a ARMORED TECHNOLOGY™. | 44 |
| Figura 23. Alineamiento de diferentes muestras al mismo tiempo. | 45 |
| Figura 24. Secuencia 1 de 3 del Genotipo 1a de ARMORED TECHNOLOGY™. | 47 |
| Figura 25. Secuencia 2 de 3 del Genotipo 1a de ARMORED TECHNOLOGY™. | 48 |
| Figura 26. Secuencia 3 de 3 del Genotipo 1a de ARMORED TECHNOLOGY™. | 48 |
| Figura 27. Especificidad analítica del método. | 50 |
| Figura 28. Sensibilidad y Linealidad analítica del método | 51 |

RELACIÓN DE CUADROS

| | |
|---|----|
| Cuadro 1. Principales Fármacos y Sustancias causante de hepatitis | 7 |
| Cuadro 2. Características del proceso al daño hepático | 9 |
| Cuadro 3. Hepatitis producida por cada tipo de Virus | 10 |
| Cuadro 4. Características de los virus de la hepatitis | 11 |
| Cuadro 5. Regiones genómicas, proteínas y porcentaje de variabilidad | 18 |
| Cuadro 6 Características de los Primers Forward y Reverse para RT-PCR | 39 |
| Cuadro 7. Características de los Primers Forward y Reverse para Secuenciación. | 41 |
| Cuadro 8. Resultados de cada muestra analizada. | 46 |
| Cuadro 9. Correlación entre los resultados obtenidos con los reportados por Specialty Laboratories. | 49 |

INTRODUCCIÓN

La infección por el Virus de la hepatitis C (VHC) es una de las más frecuentes en los últimos años y en la actualidad es considerada como una pandemia mundial que afecta a millones de personas alrededor del mundo

La infección se adquiere principalmente por vía parenteral, lo que se puede justificar que su incidencia es más elevada en ciertos grupos de riesgo como pueden ser drogadictos y personas que han sido sometidas a alguna intervención o manipulación quirúrgica, sin embargo, hace algún tiempo una de las principales fuentes de infección era la transfusión de sangre o de alguno de sus derivados, pero afortunadamente, la determinación del anti-VHC en todos los donantes de sangre ha permitido reducir de una forma casi absoluta la hepatitis postransfusional por el VHC.

La infección aguda por el VHC suele ser asintomática y alrededor del 70-80% de los casos evoluciona a la cronicidad. Desde su descubrimiento y hasta la época, el padecimiento crónico por este virus se ha convertido en uno de los problemas de salud pública de mayor relieve a escala mundial.

Anteriormente no existía un tratamiento eficaz para erradicar la infección, pero actualmente existen fármacos capaces de mejorar el padecimiento entre los cuales destacan el interferón pegilado asociado a la ribavirina. Los resultados obtenidos en los ensayos clínicos publicados indican que entre el 40 y el 70% de los pacientes tratados, dependiendo del genotipo de la hepatitis C, son capaces de eliminar el VHC y curar por tanto la enfermedad.

Se han descrito seis genotipos y hasta 80 subtipos del virus, el conocimiento de los mismos es importante para el tratamiento adecuado del paciente y el método de referencia para la tipificación molecular del VHC es la secuenciación completa del genoma viral y su posterior análisis filogenético, pero esta posibilidad no está al alcance de todos los laboratorios de diagnóstico clínico, pero existen varios métodos alternativos comerciales, los cuales se basan en el análisis de la región 5'UTR mediante amplificación y posterior secuenciación directa o hibridación inversa de los amplificados con sondas dispuestas en línea sobre membrana-LIPA, además existe una nueva generación de pruebas comercializadas con mejores prestaciones que analizan otras regiones del genoma como la NS5B y la *Core*.

La determinación del genotipo del VHC tiene interés clínico (patogenicidad, diagnóstico, resistencia al tratamiento) y epidemiológico. El genotipo del VHC es un factor pronóstico con estadística propia e independiente de otros factores (carga viral periférica o daño hepático previo), de respuesta virológica mantenida (RVM) al tratamiento antiviral (interferón estándar o pegilado en monoterapia o en combinación con ribavirina). La tasa de RVM es dos a tres veces mayor en pacientes infectados por los genotipos 2 y 3 que en los

infectados por el genotipo 1, en donde los pacientes que no responden inicialmente al tratamiento tienen mayor probabilidad de responder a un segundo curso terapéutico si están infectados por los genotipos 2 o 3 que si lo están por el 1, existen pocos datos sobre el grado de RVM en casos de infecciones por los genotipos 4, 5 y 6, sin embargo, se tratan como si fueran infecciones causadas por el genotipo 1 y parecen responder mejor que las producidas por éste, aunque peor que las generadas por los genotipos 2 y 3, por otra parte, la caracterización de subtipo de las cepas circulantes del VHC permite establecer la forma en que se transmiten eficazmente y conocer su distribución geográfica, los genotipos del 1 al 3 son de distribución mundial, los subtipos 1a, 1b, 2b, 2a/c y 3a, representan la mayoría de los subtipos en el norte y sur de América, Australia, este de Europa y Japón. Las áreas endémicas del genotipo 1 y 2 son específicas fundamentalmente en el Este de África, en el Oeste y centro del mismo el tipo 4, en la India el tipo 3 y en el Sureste de Asia el tipo 6. No existe un área endémica del genotipo 5.

El método de referencia para la tipificación del virus es la secuenciación completa del genoma, es decir, la determinación del genotipo, sin embargo esto no resulta tan sencillo debido a la variabilidad genética del virus, por lo que es necesario seleccionar una región que no sea tan variable entre un genotipo y otro (Región altamente conservada) para su posterior secuenciación y así, plantearnos la siguiente pregunta de investigación ¿La determinación del genotipo del VHC será de utilidad para predecir el curso clínico, así como la progresión del daño hepático o la respuesta al tratamiento?, por tal motivo en el presente trabajo se estableció un método confiable para poder determinar el genotipo del virus de la hepatitis C (VHC), empleando técnicas de Biología Molecular y estandarizando el mismo, lo cual para poder lograrlo se obtuvo la secuenciación nucleotídica de la región 5'UTR por cada genotipo (1a, 1b, 2a/c, 2b, 3a, 4, 5 y 6), se alinearon las secuencias de cada genotipo con lo que se realizó el diseño de los Primers y mandados a sintetizar con Applied Biosystems (AB), posteriormente se aisló el ARN a partir de plasma de 10 muestras de pacientes positivos al VHC provenientes de diferentes zonas de la ciudad de México, Estado de México y otras, de igual manera se aisló el ARN de muestras provenientes de ARMORED TECHNOLOGY™: ARMORED RNA® con los genotipos 1a, 1b, 2a/c, 2b y 3a, ya teniendo el aislado de ARN se obtuvo el ADNc, lo cual se logro realizando el RT-PCR, ya obtenido el amplificado, se determino la calidad del mismo por medio de un Gel de Agarosa y se realizó su purificación para la secuenciación y por último se efectuó el análisis de la secuenciación obtenida para la determinación del genotipo.

1. ANTECEDENTES

1.1. HEPATITIS

1.1.1. DEFINICIÓN

Es un trastorno inflamatorio del Hígado (ver figura 1), caracterizado por ictericia, hepatomegalia, anorexia, molestias gástricas y abdominales, trastornos de la función hepática y producción de heces de color claro y orina oscura, dicho trastorno puede deberse a infección bacteriana o vírica, siendo esta última la de mayor interés; infestaciones parasitarias, acción del alcohol y determinados fármacos y toxinas, el cual puede tener una evolución breve y leve o grave y fulminante que ponga en peligro la vida del paciente, ya que el Hígado generalmente puede regenerar sus tejidos pero en algunos casos la hepatitis grave evoluciona a cirrosis y disfunción hepática crónica.¹

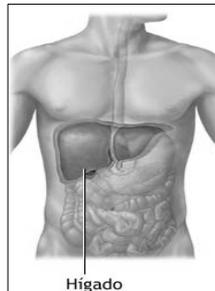


Figura 1. Órgano afectado por la hepatitis¹

1.1.2. CLASIFICACIÓN

Existen varios criterios para clasificar la hepatitis, el principal es por su agente etiológico.

No Viral. Causadas por agentes ajenos a los virus, como son agentes tóxicos, medicamentos, ingesta de alcohol o por bacterias o parásitos.

Viral. Provocadas por virus, destacando los denominados A, B, C, D, E y recientemente descubiertos el F y G.^{2,3}

1.1.2.1. NO VIRALES

1.1.2.1.1. HEPATITIS TÓXICA Y MEDICAMENTOSA

La hepatitis puede ser causada por muchos fármacos y agentes tóxicos, las toxinas hepáticas o hepatotoxinas constituyen un grupo heterogéneo de sustancias químicas, naturales o sintéticas, que producen una variedad de lesiones en el hígado, denominadas hepatitis tóxicas.² El hígado tiene una elevada capacidad de unión no específica a los

agentes químicos en virtud de su tamaño y alta concentración celular de proteínas, además contiene concentraciones elevadas de enzimas metabolizadoras de drogas, que con frecuencia causan la formación de metabolitos tóxicos, por lo que el hígado es especialmente vulnerable a la toxicidad inducida metabólicamente, ésta se asocia generalmente a agentes liposolubles.³

Los xenobióticos pueden producir una lesión hepática dependiente de la dosis en humanos y animales de experimentación, son considerados hepatotoxinas verdaderas (predecibles) directas o indirectas, mientras que los que producen lesión hepática, en individuos no susceptibles, no dependientes de la dosis, son llamados hepatotoxinas idiosincrásicas (no predecibles).³

Las hepatoxinas indirectas actúan interfiriendo la función del hepatocito, interrumpiendo rutas o procesos metabólicos específicos, este tiene como consecuencia la alteración secundaria de la estructura o la invalidación de una función, en donde la lesión estructural es secundaria a la lesión metabólica, mientras que la producida por hepatotoxinas directas es primaria y conlleva a una alteración metabólica, el daño hepático producida por hepatotoxinas indirectas puede ser principalmente citotóxico y expresado como esteatosis o necrosis, o colestásico y caracterizado por estancamiento del flujo biliar.³ El Cuadro 1 enlista los fármacos y las sustancias comunes causantes de hepatitis.

Cuadro 1. Principales Fármacos y Sustancias causante de hepatitis⁴

| TIPO DE AGENTE | EJEMPLO |
|--|--|
| Anestésico | Halotano |
| Anticonvulsionante | Fenitoína Carbamacepina |
| Antihipertensivo | Metildopa Captoprilo Enalaprilo |
| Antibióticos | Isoniacida Rifampicina Nitrofurantoína |
| Diurético | Clorotiacida |
| Laxante | Oxifenisantina |
| Antidepresor | Amitriptilina Impramina |
| Antiinflamatorio | Ibuprofeno |
| Antifúngico | Ketoconazol Floconazol |
| Antiviral | Zidovudina Dideoxinosina |
| Bloqueadores de los Canales de Calcio | Nifedipino Verapamilo |

1.1.2.1.2. HEPATITIS ALCOHÓLICA

El término hepatitis alcohólica define unas alteraciones morfológicas que se asocian con manifestaciones clínicas muy variables, que van desde cuadros asintomáticos a otros con signos de insuficiencia hepatocelular grave.⁵

El patrón histológico de la hepatitis alcohólica se caracteriza por áreas de necrosis celular con un infiltrado inflamatorio constituido por leucocitos polimorfonucleares de localización preferentemente centro lobulillar, en estas áreas de necrosis los hepatocitos son abalonados, con un citoplasma claro en cuyo interior se observan acúmulos de una material homogéneo, de contornos irregulares e intensamente eosinófilo, que reciben el nombre de hialina alcohólica o cuerpos de Mallory, dicha hepatitis se acompaña de un grado variable de esteatosis y de fibrosis y puede asociarse a una cirrosis, en donde la forma clínica común de este tipo de hepatitis aparece generalmente después de una temporada de ingestión de alcohol superior a la habitual, y se caracteriza por astenia, anorexia, pérdida de peso, ictericia, fiebre y hepatomegalia dolorosa, que en las formas graves existen signos de malnutrición, ascitis y encefalopatía y en los exámenes de laboratorio destaca una hiperbilirrubinemia conjugada, una elevación moderada de las transaminasas, que no se corresponde con la extensión de la necrosis y con un predominio de las aminotransferasas AST sobre la ALT, una elevación de gammaglutamiltranspeptidasa y de fosfatasa alcalina, siendo frecuente la anemia, trombopenia y leucocitosis con neutrofilia, así también, el aumento de bilirrubina es mayor y también existe hipoalbuminemia y descenso de la tasa de protrombina, que junto a esta forma clínica existen formas asintomáticas, formas colestáticas y formas en las que predominan las manifestaciones secundarias a una hipertensión portal.⁵

1.1.2.1.3. HEPATITIS BACTERIANAS O PARASITARIAS

Es el resultado de afecciones producidas a nivel de hígado por bacterias como las causantes de la fiebre tifoidea, y por parásitos tales como protozoarios (amebas) y toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*).⁶

1.1.2.2. VIRALES

Existen otros virus además de los hepatotrópicos convencionales, que pueden causar un síndrome de hepatitis aguda como manifestación clínica inicial; pueden ser de la familia herpes (EBV, CMV, HSV, VZV, y HHV6), el de la rubéola, sarampión, Coxsackie, la fiebre amarilla y ébola, capaces de presentar formas de hepatitis primaria o secundaria. El EBV es la causa más común de hepatitis aguda dentro de esta categoría.^{7,8}

Cuando se padece de hepatitis aguda el organismo empieza a producir defensas en forma de anticuerpos dirigidos contra el virus causante de la infección, de forma que, en un periodo variable, disminuye la inflamación y los virus son progresivamente eliminados, ello ocurre en la mayoría de las hepatitis agudas víricas que tienden a evolucionar hacia la curación espontánea, sin embargo en determinados casos, los virus de la hepatitis escapan a la acción de los sistemas defensivos inmunitarios y en estos casos, la inflamación persiste en el tiempo y aparece la llamada hepatitis crónica (Cuadro 2). Sin embargo, la posibilidad de que la hepatitis evolucione a la cronicidad depende fundamentalmente del tipo de virus de la hepatitis causante de la infección.⁹

Cuadro 2. Características del proceso al daño hepático⁹

| DAÑO HEPÁTICO | CARACTERÍSTICA |
|--------------------------|--|
| Hepatitis Aguda | Inflamación del hígado de aparición brusca que comporta lesión o necrosis más o menos intensa de las células hepáticas. |
| Hepatitis Crónica | Inflamación del hígado de más de 6 meses de duración que comporta lesión o necrosis más o menos intensa de las células hepáticas y aparición de fibrosis. |
| Cirrosis | Enfermedad crónica, difusa e irreversible del hígado caracterizada por fibrosis y nódulos de regeneración que comporta una alteración importante de la arquitectura y función hepáticas. |

Existen siete tipos diferentes de virus hepatotrópicos capaces de producir hepatitis; se les designa como A, B, C, D, E (ver figura 2 y cuadro 4) y hoy en día se conocen otros dos como son F, y G, aunque hay evidencias de la existencia de más virus que pueden causar inflamación y necrosis del hígado.

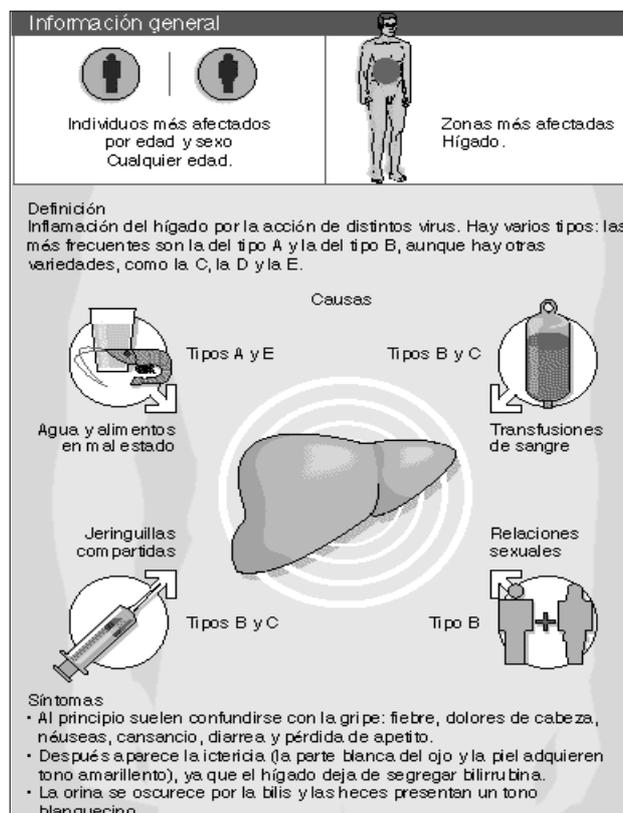
Todos los virus hepatotrópicos tienen la capacidad de causar infección aguda del hígado pero sólo el B, C, y D, ocasionan formas crónicas de la enfermedad (Cuadro 3).^{7, 8}

Cuadro 3. Hepatitis producida por cada tipo de Virus⁹

| TIPO DE VIRUS | MATERIAL GENÉTICO | HEPATITIS PRODUCIDA |
|--------------------------------------|-------------------|-------------------------------|
| Virus de la hepatitis A (VHA) | ARN | No produce hepatitis crónica |
| Virus de la hepatitis B (VHB) | ADN | Hepatitis crónica |
| Virus de la hepatitis C (VHC) | ARN | Hepatitis crónica |
| Virus de la hepatitis D (VHD) | ARN | Hepatitis crónica |
| Virus de la hepatitis E (VHE) | ARN | No produce hepatitis crónica |
| Virus de la Hepatitis F (VHF) | ARN | No produce hepatitis crónica |
| Virus de la Hepatitis G (VHG) | ARN | *No produce hepatitis crónica |

* En un porcentaje menor (25% aproximadamente) de los casos puede ocasionar hepatitis crónica.

Figura 2. Información general de las hepatitis virales¹⁰



Cuadro 4. Características de los virus de la hepatitis¹¹

| FAMILIA DEL VIRUS | VHA | VHE | VHB | VHC | VHD (delta) Satélite virus (Sólo en combinación con VHB) |
|------------------------------|---|--------------------|--|----------------------------------|---|
| | Piconavirus | Calicivirus | Hepadnavirus | Flavivirus | |
| Daño | Todos generan condiciones de infecciones en el Hígado | | | | |
| Síntomas (Aguda) | Todas presentan mareos, orina oscura, anorexia, náuseas, vómitos, ictericia | | | | |
| Transmisión | Entérica (comida y agua) | | Sexual, sangre, parenteral. | | |
| Condición Crónica | No | | Si | | |
| Material Genético | ARN | ARN | ADN (transcriptasa reversa) | ARN | ARN |
| Antígenos | HA-AG | HEV ORF2 proteínas | HBsAg, HBcAg, HBeAg | Muchos-core, E1 | Antígeno delta |
| Periodo de Incubación | 1 mes (15-20 días) | | 4 meses (45-160 días) | 2 meses (15-150 días) | 1-2 meses |
| Terapéutica actual | Tratamiento no específico | | Interferón, lamivudina, adenovir | Interferón pegilado, rabavirina, | Sigue como VHB |
| Vacunas Disponibles | Si; Havrix (GSK), Vacta (Merck) | No | Si; Engerix-B (rHBsAg) GSK, Recombivax B (Merck) | No | Puede ser prevenida por vacunación contra VHB |

1.1.3. HEPATITIS C

1.1.3.1. CARACTERÍSTICAS

1.1.3.1.1. PATOGENIA Y RESPUESTA INMUNOLÓGICA

Todavía no se conoce con certeza el mecanismo de producción de la lesión hepática en la infección por VHC, aunque podría ser consecuencia de un efecto citopático directo, como de mecanismos mediados por el sistema inmunológico. En la figura 3 se muestra la historia natural de la hepatitis C.⁹

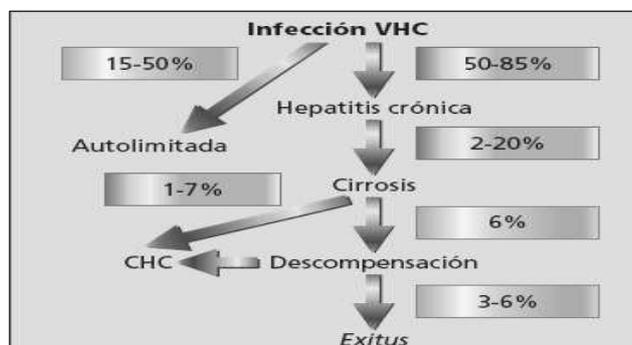


Figura 3. Historia natural de la hepatitis C⁹

El cuadro histológico hepático se caracteriza por una hepatitis crónica leve, acompañada por lesiones del conducto biliar, esteatosis, nódulos o folículos linfoides intraportales y alteración eosinofílica del citoplasma del hepatocito, la infiltración linfática es más leve en la hepatitis C que en la hepatitis B, sin embargo, varía de persona a persona (ver figura 4).^{9,12}

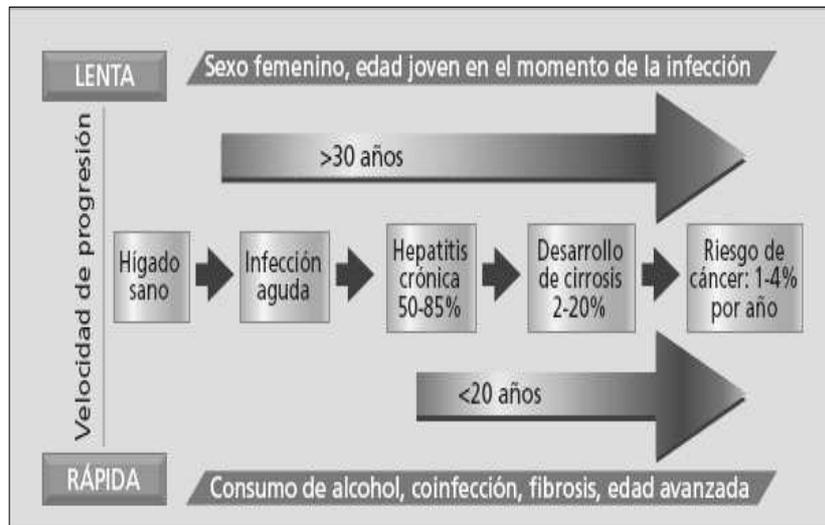


Figura 4. Historia natural de la hepatitis C crónica y su variabilidad de persona a persona.⁹

Los mecanismos inmunes juegan un papel primordial en la hepatitis C, ya que la infección por VHC estimula tanto la respuesta celular como la humoral, donde la respuesta inmunitaria celular basada en la cooperación de los linfocitos auxiliares CD4+ y los linfocitos T citotóxicos CD8+ es importante en la eliminación de la infección vírica, mientras que la respuesta inmunitaria humoral es generalmente más importante en la prevención de una infección secundaria.¹²

Los mecanismos de respuesta inmune: la primera línea de defensa del huésped contra los patógenos es la respuesta inmune innata inespecífica; en la que intervienen las citocinas, los interferones, el sistema del complemento, los neutrófilos, los macrófagos, las células NK y NKT y las células dendríticas, ocurre dentro de horas a días para tratar de controlar la infección inicial.¹³ La respuesta inmune adaptativa específica a los patógenos incluye la respuesta humoral, dada por las células B con la formación de anticuerpos neutralizantes que se enlazan a las partículas virales y limitan la diseminación del virus, las CD4 son los reguladores de la respuesta inmune adaptativa, y la respuesta celular que corresponde a las células T por medio de los CD4 y CD8. Los mecanismos de persistencia viral y progresión de la enfermedad son multifactoriales.¹⁴

En general, una respuesta vigorosa de CD4 y CD8 se asocia a eliminación del virus y control de la enfermedad, mientras que una respuesta débil se asocia con persistencia viral y progresión de la enfermedad.¹³

Una respuesta inmune humoral puede ser inefectiva, mientras que una respuesta celular T se asocia a eliminación del virus. Tal vez, el desarrollo de terapias que estimulen el sistema inmune (inmunomoduladores o vacunas) que aumenten la respuesta antiviral de células T pueden actuar como coadyuvantes para las terapéuticas actuales contra el virus C.¹³

1.1.3.1.2. EL VIRUS DE LA HEPATITIS C

1.1.3.1.2.1. DESCUBRIMIENTO

En la década de 1940, existían por lo menos dos tipos de hepatitis, la A y la B pero no fue hasta la década de los 70 que se logró con marcadores serológicos, identificar la causa de la enfermedad de ambos y distinguirlos clínica y serológicamente.^{15,16}

En 1974, Prince y col., en el New York Blood Center reportaron que el 25% de los pacientes sometidos a cirugía cardiovascular desarrollaron una hepatitis postransfusional y el 18% de ellos dieron negativo a los marcadores de ambos virus y con características clínicas diferentes. Por este motivo, sugieren la posibilidad de un nuevo tipo de virus y proponen identificarlo como virus de la hepatitis tipo C (VHC). Sin embargo, fue hasta 15 años después que un grupo de la Corporación Chiron, en Emeryville, California, a través de métodos de biología molecular e inmunológicos, logró identificar el agente etiológico del VHC.¹⁷ Ellos construyeron una “secuencia” de ADN complementario (ADNc), del plasma que contenía el agente no caracterizado de la hepatitis no-A no-B (HNANB). Después, buscaron en la biblioteca de ADN y aislaron un clon de ADNc que codificaba un antígeno asociado específicamente con HNANB y se encontró que este clon derivaba del genoma de un agente similar a *Togaviridae* o Flavivirus. Este nuevo agente fue nombrado hepatitis C el virus causante de la mayoría de las hepatitis post-transfusionales.^{15,16}

1.1.3.1.2.2. TAXONOMÍA

La identificación y caracterización de los virus de la hepatitis B (VHB) y de la hepatitis A (VHA) fue entre los años 60 y 70, con el consiguiente desarrollo de técnicas para el diagnóstico, se puso de manifiesto la existencia de casos de hepatitis con periodos de incubación y modos de transmisión característicos de una enfermedad infecciosa pero sin evidencia serológica por los virus hepatotrópicos humanos conocidos. Prince y

colaboradores (1992), comunicaron por primera vez en 1974 el desarrollo de hepatitis postransfusional en pacientes sometidos a cirugía cardiovascular sin infección por el VHB y proponen la existencia de uno o varios virus de la hepatitis tipo C, en un artículo aparecido en “The Lancet” en 1975 acuñó el término hepatitis no A-no B para una patología cuyo diagnóstico debía ser hecho por exclusión.¹⁷

Se considera al virus de la hepatitis C como un género independiente dentro de la familia *Flaviviridae*, la cuál incluye además a los géneros *Flavivirus* y *Pestivirus*. El análisis de la secuencia de nucleótidos del ARN del vírico y de los aminoácidos de los péptidos del VHC muestra un elevado grado de homología y organización genómica entre el VHC y los miembros de la familia *Flaviviridae*, como se observa en la figura 5.¹⁷

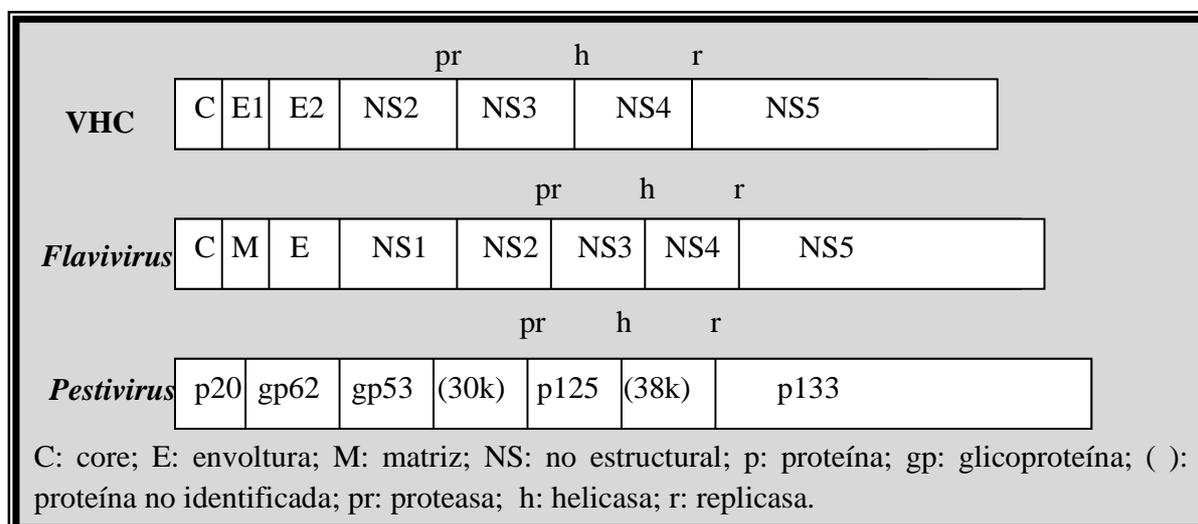


Figura 5. Estructura antigénica del VHC, comparada con los *Flavivirus* y los *Pestivirus*¹⁸

Desde el extremo 5' al 3' del genoma, se encuentran sucesivamente regiones que codifican la nucleocápside, proteínas de envoltura glicosiladas y proteínas no estructurales implicadas en el proceso de replicación del VHC.¹⁷

La región 5' no codificadora (5'NC) muestra aproximadamente un 50% de homología con la correspondiente región de los *Pestivirus*, existen tres regiones de la poliproteína del VHC que comparten homología tanto con los *Flavivirus* y *Pestivirus* como con otros virus que infectan las plantas, una de estas regiones contiene muchos residuos en común con las helicasas codificadas por los *Flavivirus*, los *Pestivirus* y los *Potyvirus* de las plantas, siendo mayor con los *Pestivirus*.¹²

Una segunda región contiene secuencias cortas que están altamente conservadas en todas las ARN polimesas-ARN dependientes codificadas por virus de ARN y la tercera

región contiene los aminoácidos conservados en las serín-proteasas codificadas por los *Flavivirus* y *Pestivirus*, indicando, por tanto, la existencia de una organización similar.¹²

La poliproteína del VHC comparte muchas otras características con los *Flavivirus* y *Pestivirus* como en su tamaño, ya que es similar en todos ellos (entre 3000 y 4000 aminoácidos y las proteínas estructurales, situadas en el aminoterminal (N-terminal), comienzan con una proteína de la nucleocápside de carácter básico, por otro lado el dominio de la replicasa se encuentra en el extremo carboxiterminal (C-terminal) en los tres géneros de la familia *Flaviviridae*, en cambio, la proteína de la nucleocápside está situada en el extremo C-terminal en los *Potyvirus* y *Carnovirus* de las plantas, otra característica es la hidrofobicidad de las proteínas del VHC, *Flavivirus* y *Pestivirus*, la cual es muy similar, indicando una similitud en la estructura de la proteína y en la organización genética a pesar de la ausencia de una homología estructural en las secuencias primarias.¹²

En el VHC inmediatamente después del dominio de la nucleocápside, se encuentran muchos lugares de glicosilación potencial, lo cual lo asemeja muy cerca con los *Pestivirus* y el grado de identidad en las secuencias primarias, tanto a nivel de nucleótidos como de aminoácidos, es mayor entre el VHC y los *Pestivirus*, lo que sugiere una relación evolutiva más cercana que con los *Flavivirus*. Incluso la densidad de las partículas infecciosas del VHC parece más próxima a los *Pestivirus* que a los *Flavivirus*.¹²

Actualmente el VHC es considerado como un virus ARN, de polaridad positiva, con un genoma de 9,5 Kb, un miembro de la familia *Flavivirus*, de un género separado: *Hepacivirus*, cuyo único miembro es el VHC.¹⁸

1.1.3.1.2.3. MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA

Existen varias partículas de muy diversos tamaños (entre 30 y 65 nm de diámetro) que se asocian a la infección VHC, en las primeras microfotografías electrónicas de partículas asociadas al VHC mostraban unas esferas de 30 nm de diámetro, cuyo tamaño de asemeja al atribuido en el momento actual a la cápside del VHC. Abe y colaboradores (1989), observaron tanto en sueros humanos como de chimpancés infectados con VHC, partículas víricas cuyo tamaño varía entre 36 y 62 nm de diámetro, en cuanto a Kato y Colaboradores (1994), obtuvieron microfotografías de alta resolución que mostraban partículas esféricas de 55 a 65 nm de diámetro incluidas en el interior de vesículas citoplásmicas.¹⁹

Estudios en gradientes de sacarosa y otros estudios basados en ultracentrifugación, mostraron que las partículas asociadas con VHC tienen varias densidades. Los estudios de Bradley y colaboradores (1991) y de Miyamoto y colaboradores (1992), establecieron la densidad del VHC, entre 1.08 y 1.11 g/mL, sin embargo se han encontrado fracciones de

menos densidad (1.05 g/mL) que probablemente corresponden a complejos del virus con la beta lipoproteína sérica, y otras fracciones de mayor densidad (1.17 g/mL) que parecen corresponder a inmunocomplejos de virus y anticuerpos, por otra parte mediante el tratamiento con detergentes no iónicos, se han identificado partículas de 1.25 g/mL que parecen corresponder a la nucleocápside viral, esta variedad de tamaños se explica por el hecho de que las partículas observadas incluyen las siguientes formas víricas y estructuras asociadas: partículas víricas completas, nucleocápsides, viriones unidos a proteínas séricas como lipoproteínas e inmunoglobulinas, partículas aberrantes, incompletas o parcialmente descompuestas, vesículas con VHC en si interior liberadas de células infectadas.¹²

De los estudios realizados hasta el momento parece deducirse que el VHC tiene un tamaño de 50 nm, que presenta una envoltura derivada de la célula hospedadora, en las que se insertan las glicoproteínas virales E1 y E2, la cual dicha estructura explica la sensibilidad al cloroformo de las partículas infecciosas y los cambios en la densidad de flotación después del tratamiento con detergentes.¹²

Además de los lípidos en la superficie del virus se encuentran moléculas de azúcares. Parece ser que las proteínas de la envoltura se glicosilan mediante la unión de manosa en el retículo endoplásmico de la célula hospedadora, con la posterior adición de carbohidratos durante el transito a través del aparato de Golgi, esa cubierta rodea a la nucleocápside formada por subunidades proteicas C, la cual contiene el genoma vírico.¹⁷

En la figura 6 se observa la estructura del VHC en donde se muestra la envoltura de glicoproteínas, la nucleocápside (proteína core) y su material genético (ARN).

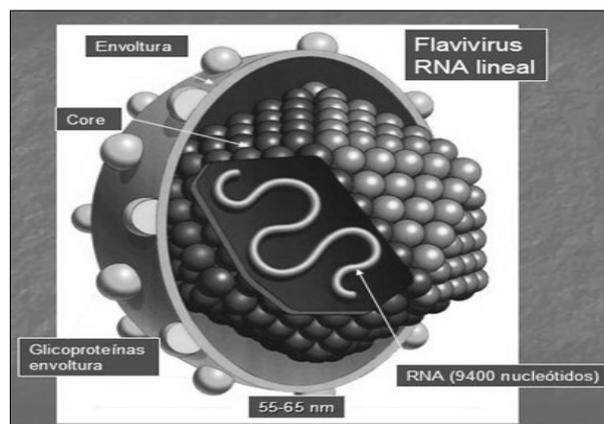


Figura 6. Modelo de la estructura del virus de la hepatitis C²⁰

1.1.3.1.2.4. ESTRUCTURA GENÓMICA

El genoma (ver figura 7) contiene un marco abierto de lectura único de aproximadamente 3000 aminoácidos, flanqueado por regiones no traducidas altamente conservadas, denominadas 5' y 3'UTR. De las dos, la región 5' es la mejor conservada, la que menos varía, con analogías superiores al 98%, y cuya principal función es permitir la unión del ribosoma de las células hospedadoras al ARN vírico en la estructura conocida como IRES (*internal ribosome entry sites*).²¹

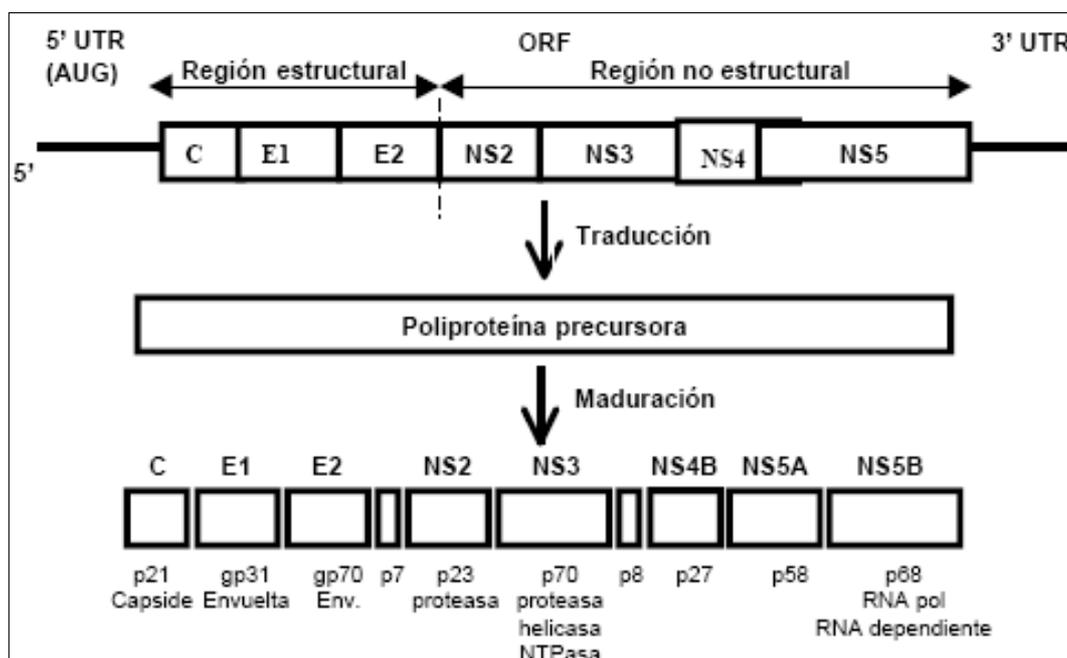


Figura 7. Representación esquemática del genoma del VHC²⁵

El marco de lectura presenta dos regiones: una estructural y otra no estructural, la primera es capaz de codificar las proteínas de la cápside (C) y las gp31 y gp70 (E1 y E2) de la envuelta y entre las regiones E1 y E2 se encuentra la zona denominada HVR1 (hipervariable) que permite al virus su escape del sistema inmunitario y, por lo tanto, su capacidad de influencia en la aparición de infecciones persistentes y de fracasos terapéuticos, la segunda región, no estructural, codifica para toda una serie de enzimas con acción proteasa, helicasa, ARN-polimerasa dependiente de ARN, etc, que dentro de esa región, es importante reseñar el papel de NS3 y, sobre todo, NS5 por presentar ésta el sitio de unión a la PKR (protein-quinasa) y la zona ISDR (región determinante de la sensibilidad al interferón), ambas implicadas en los fenómenos de variabilidad y resistencia al tratamiento.²¹

1.1.3.1.2.4.1. PROTEÍNAS VIRALES

El genoma del VHC está constituido por una cadena simple positiva de ácido ribonucleico (ARN) de entre 9,500-10,000 nucleótidos (9.6 kb), que codifica para una poliproteína de aproximadamente 3,010 aminoácidos y caracterizada por un elevado grado de heterogeneidad genética y con un marco de lectura visible (ORF).²²

El genoma está precedido por una región no codificante 5'UTR de 42 bases, altamente conservada y resistente a la desnaturalización y seguida por una región no codificante 3'UTR de 27 bases con una secuencia de poli(A) (adenina) en el extremo 3'.²²

La poliproteína puede ser fragmentada, por calor o proteasas virales, en al menos nueve proteínas funcionales, la porción amino terminal forma la proteína estructural (región 5'terminal) y se divide en tres proteínas estructurales (C, E1, E2), mientras que la carboxilo terminal (región 3'terminal) da lugar a varias enzimas virales y seis proteínas no estructurales (NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a, NS5b), por lo que el orden y la nomenclatura de los productos procesados en la proteína precursora del VHC es: NH₂-C-E1-NS1/E2-p7-NS2-NS3-NS4a-NS4b-NS5a-NS5b-COOH. En la Cuadro 5 se muestra la región genómica así como las proteínas codificadas y su porcentaje de variabilidad.²²

Cuadro 5. Regiones genómicas, proteínas y porcentaje de variabilidad²²

| REGIÓN GENÓMICA | PROTEÍNAS | % SIMILITUD NUCLEÓTIDOS | % SIMILITUD AMINOÁCIDOS | FUNCIÓN |
|---------------------------|------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------------------|
| 5' no codificadora | | 90 | | Iniciación traducción replicación |
| Nucleocápside | Proteína de core | 81 | 90 | Encapsidación |
| Envuelta E1 | Glicoproteína | 56 | 49 | Adherencia celular |
| Envuelta E2, E2-p7 | Glicoproteína | 56 | 49 | Adherencia celular |
| No estructural NS2 | Metaloproteína | 57 | 56 | Clivaje NS2-NS3 |
| No estructural NS3 | Serín-proteasa NTPasa ARN helicasa | 70 | 80 | Clivaje poliproteína Energía |
| No estructural NS4 | Cofactor proteasa | 65 | 50 | Replicación |
| No estructural NS5 | ARN Polimerasa-ADN dependiente | 72 | 71 | Replicación |
| 3' no codificadora | | | 26 | Empaquetado vírico |

1.1.3.1.2.5. VARIABILIDAD GENÉTICA (GENOTIPOS, SUBTIPOS Y CUASIESPECIES)

De entre los virus de interés en patología humana, el virus de la hepatitis C es uno de los virus con un mayor grado de diversidad genética que se han estudiado hasta el momento y la heterogeneidad genética que presenta puede ser intragenoma, dando lugar a las cuasiespecies víricas, e intergenómica, que da lugar a los genotipos y subtipos (ver figura 8).⁹

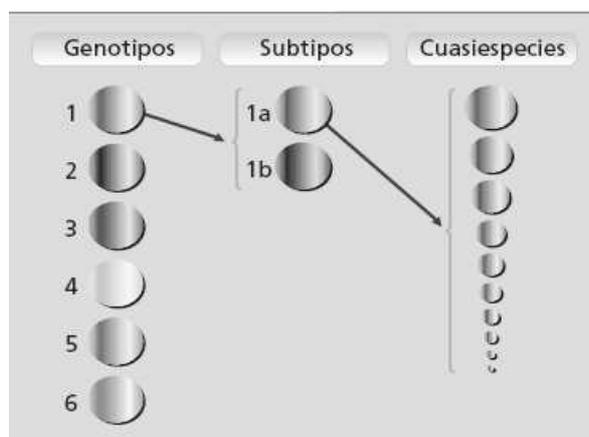


Figura 8. Variabilidad genética del Virus de la hepatitis C. Genotipos, Subtipos y cuasiespecies.⁹

La elevada cinética de replicación viral y la baja fidelidad de la enzima responsable de la replicación (la ARN polimerasa dependiente de ARN) son los dos principales factores que explican la elevada variabilidad genética de este virus, el cual tiene una vida media de 2.5 hs en sangre y existe una alta producción diaria de partículas virales (10^{12}) en los pacientes con infección crónica; la cinética de replicación viral es, por lo tanto, superior incluso a la del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), en segundo lugar, la enzima que se encarga de la replicación tiene una tasa de error aproximada de 10^{-4} . Desgraciadamente no existen modelos experimentales para el cultivo del virus, lo que dificulta la obtención de datos aunque, siguiendo el modelo propuesto para el VIH, la probabilidad de una mutación puntual será del orden de 10^{-4} y de una mutación doble de 10^{-11} , lo que se traducirá en la producción diaria de aproximadamente 3300 virus distintos al virus parental y de este modo, será fácil comprender que la población que infecta a un individuo es una mezcla muy heterogénea de genomas muy relacionados entre sí, con una homología superior al 98%, y que se denominan cuasiespecies, siendo responsables de la variabilidad intragenoma.²¹

Recientemente, un equipo de investigadores ha estimado que el virus parental del que se originaron todas las variantes que hoy existen apareció hace, al menos 2000 años. Si aplicamos los datos de cinética de replicación, de tasa de error de la enzima y de probabilidades de mutación, podremos entender como en todos estos años se han ido seleccionando variantes tan diversas que alcanzan un grado de diferencias en el ácido nucleico suficiente como para hablar no ya de variantes dentro de un mismo genoma, sino de variaciones intergenoma. En efecto, un modelo experimental en chimpancés (tomando muestras en la fase aguda de la infección experimental y en la fase crónica, 8 años y medio después) ha demostrado que la tasa de mutación (secuenciando genomas completos en ambas muestras) es de aproximadamente 1.44×10^{-3} sustituciones por año, datos que apoyan la hipótesis anterior de que la diversidad genética existente en el VHC es el resultado de la acumulación de mutaciones durante los últimos dos milenios.²¹

La variabilidad intergenoma da lugar a los conceptos de genotipo, subtipo y aislado, en donde se denominan genotipos a aquellos genomas cuyo grado de homología se encuentra entre el 66- 69%; se designan con un número arábigo y, hasta el momento, se han descrito 6 genotipos mayores y hasta 11 genotipos distintos, dentro de un mismo genotipo, cuando el grado de homología se encuentra entre el 77-80% se habla de subtipo; se designan con una letra, que seguirá al número que nombra al genotipo; hasta la fecha se han descrito más de 100 subtipos distintos y dentro de un mismo subtipo, se denomina aislado a aquellos genomas en los que el grado de homología no es superior al 91-95%, en la figura 9 muestra los porcentajes de homología y la nomenclatura de las variantes del VHC.²¹

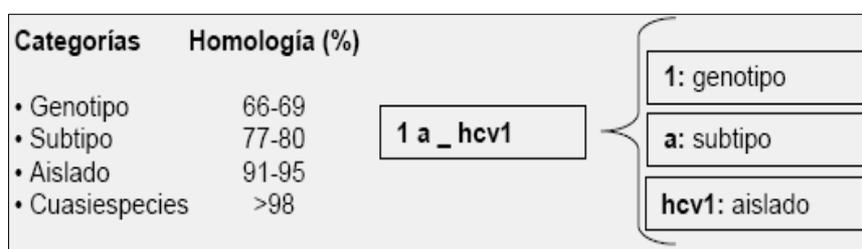


Figura 9. Homología y nomenclatura de las variantes del VHC.²¹

Existen pacientes infectados por más de un genotipo o subtipo, lo que se denomina infección mixta, en un mismo paciente sólo se han descrito por el momento variantes intragenoma, y no variantes intergenoma, lo que quiere decir que no se ha demostrado el cambio de genotipo o de subtipo, por lo que según esto, si tenemos en cuenta la tasa de mutación anual del VHC, podemos deducir que para que en un mismo hospedador se pudiera originar el cambio de subtipo desde el virus parental deberían pasar al menos 50-60 años, todo esto puede cambiar en el futuro, si se confirman los datos recientes que describen el primer caso de recombinación intergenotipo en el VHC.²¹

1.1.3.1.3. EPIDEMIOLOGÍA

A nivel mundial se estima que existen más de 170 millones de personas infectadas de forma crónica por el VHC (ver figura 10), lo que representa alrededor de tres por ciento de la población mundial, a la vez que se producen de tres a cuatro millones de nuevos infectados cada año, la situación epidemiológica varía mucho de unos países a otros, en función sobre todo de su nivel de desarrollo socioeconómico, por ejemplo en los Estados Unidos se estima que el número de portadores es de 2.7 millones de personas en Francia el número de portadores se estima en 600,000 y en Italia se aportan cifras de 1, 500,000 de personas afectadas.¹²



Figura 10. Número de personas infectadas en diferentes zonas geográficas¹⁶

En España, algunos estudios realizados de base poblacional aportan tasas de prevalencia del 12.67% de la población, lo que supone de 400,000 a 1, 000,000 personas infectadas y las cifras se elevan considerablemente en países de África (Egipto), en donde se han comunicado prevalencias de infección superiores al 15% de la población, es muy difícil conocer las tasas de incidencia real de la enfermedad, dado que puede permanecer largo tiempo asintomática, pasando inadvertida y no comunicándose de forma adecuada los nuevos casos.¹⁶ Alrededor de cuatro millones de estadounidenses tienen el VHC, en los Estados Unidos, aproximadamente uno de cada 50 latinos están infectados con el VHC, y para el 2025 se espera que duplique la población hispana infectada.²³

En México las enfermedades hepáticas ocupan el tercer lugar de mortalidad y la hepatitis se considera ahora un problema importante de salud nacional, sobre todo la cronicidad que se desarrolla, y en esto la hepatitis C tiene un papel importante, observando los datos epidemiológicos del año 2002 por grupos de edad, la mayor incidencia de la hepatitis viral tipo C, se encuentra, en 24-44 años con 597 casos, con mayor número de

casos en Baja California Norte (103 casos), esto explica que la infección aparece en la mayoría de los casos después de una transfusión sanguínea o por vía sexual, en segundo lugar de la incidencia se encuentra el grupo de edad de 50-59 años con 222 casos, lo que también podría confirmar que después de varios años se presenta la sintomatología y se hace manifiesta la enfermedad, según el boletín epidemiológico en el año 2003 se encontró un total de 19,942 casos de hepatitis virales y en el 2002 fueron 19,614 casos en total, en estos se incluyen la hepatitis A y C.²⁴

Considerando sólo la población femenina del país, el grupo de edad de mayor incidencia es el de 50-59 años con una tasa global de 157, seguido de la edad de 25-44 años y en la entidad federativa con mayor número de casos es el Distrito Federal, seguido del Estado de México y en cuanto a la población masculina, el grupo de edad de mayor incidencia se presenta en 45-49 años, con una tasa de 3.14, seguido de la edad de 60-64 años, y la entidad federativa de mayor prevalencia es el estado de Baja California, seguido por el estado de Chihuahua. En el año 2003 se reportaron 1382 casos de ambos géneros.²⁴

En cuanto a la distribución mundial de acuerdo a los tipos del VHC (ver figura 11), los genotipos del 1 al 3 son de distribución mundial, los subtipos 1a, 1b, 2a/c, 2b y 3a, representan la mayoría de los subtipos en el norte y sur de América, Australia, Oeste de Europa y Japón, las áreas endémicas del genotipo 1 y 2 son específicos fundamentalmente en el Oeste, centro y Este de África el tipo 4, en la India el tipo 3 y en el Sureste de Asia el tipo 6, no existiendo un área endémica del genotipo 5.²³

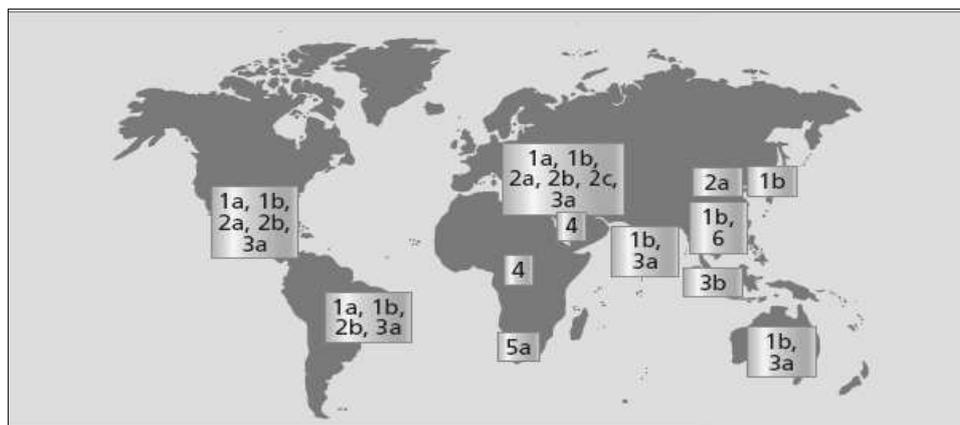


Figura 11. Prevalencia de los distintos genotipos del VHC en las diferentes partes del mundo⁵

1.1.3.1.4. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de laboratorio de la infección por VHC es fundamentalmente serológico y se basa en la detección de anti-VHC, sin embargo, la determinación del ARN viral y la determinación del genotipo es una importante ayuda diagnóstica para aquellos pacientes susceptibles a ser tratados.²⁵

Tres métodos utilizados para el diagnóstico de la infección por el virus de la hepatitis C son:

1. La detección de anticuerpos dirigidos contra el VHC mediante ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), que es capaz de detectar inmunoglobulinas dirigidas contra cuatro antígenos del virus (C22-3, C33, C100-3, C200)²⁵
2. Detección de anticuerpos anti-VHC con ensayo recombinante (RIBA), que detecta anticuerpos dirigidos contra los antígenos C22-3, C33, C100-3 y 511. Sin embargo, la reacción sólo es positiva cuando existen dos o más antígenos, si sólo hay una es indeterminada y con ninguno es negativa, esto hace que la prueba sea altamente específica pero con baja sensibilidad.²⁵
3. La prueba de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) es la que se utiliza para confirmar la presencia del VHC, en donde tomando como estándar de oro a dicha prueba, se ha evaluado que la ELISA tiene una sensibilidad de 93% y especificidad de 92%; RIBA 86 y 94% respectivamente. Esta técnica es por excelencia la utilizada para confirmar la presencia del VHC, puesto que dicho virus es un ARN virus y la PCR amplifica ADN, las secuencias del VHC que van a amplificarse deben ser previamente transcritas a ADN complementario (ADNc), éste es posteriormente amplificado mediante PCR, por lo tanto, lo que se utiliza es la técnica denominada RT-PCR.¹⁷

Existen varias circunstancias por las que es conveniente utilizar la PCR para amplificación del virus en plasma:

- 1) *Periodo de ventana inmunológica.* Este es el periodo de tiempo que transcurre entre la adquisición de la infección y el desarrollo de anticuerpos, este periodo es generalmente de 2 a 6 meses, pero puede llegar a ser mayor, durante dicho tiempo es posible identificar al virus en sangre mediante PCR aunque los anticuerpos sean aún negativos.²⁶
- 2) *Viremia.* Los anticuerpos son útiles para el diagnóstico del contacto con el virus, pero no sirve para conocer el estado del portador del virus, ni tampoco para saber si el paciente cursa con replicación activa del virus, este tipo de

información puede obtenerse a partir de PCR y es útil en el manejo del paciente bajo terapia con interferón.²⁷

- 3) *Genotipo*. Con PCR es posible no sólo detectar el virus en sangre, si no también detectar el genotipo viral específico y cuantificarlo.²⁷

Los ensayos cuantitativos normalmente son capaces de detectar hasta 1,000 copias/mL; sin embargo, los resultados obtenidos con diferentes ensayos no son intercambiables y los límites de detección varían de un método a otro, en cuanto a los ensayos cualitativos para ARN de VHC tienen normalmente límites de detección menores que los de los métodos cuantitativos que utilizan la misma técnica de amplificación, son menos costos y más útiles para detectar la presencia o ausencia de infección.²⁸

1.1.3.1.4.1. DETECCIÓN DE GENOTIPOS

Las técnicas que permiten establecer la variante de VHC se pueden clasificar en moleculares, que determinan el genotipo, y serológicas, que determinan el serotipo, para determinar el genotipo del VHC la técnica de referencia es la secuenciación de ácidos nucleicos y el posterior análisis filogenético de la secuencia obtenida, dentro de los métodos basados en el uso de la PCR puede utilizar cebadores o “Primers” tipo específicos diseñados para unirse a secuencias definidas de un determinado genotipo y que, por lo tanto, no amplifica secuencias de otros tipos,²⁰ el ADN amplificado de manera no selectiva se puede analizar mediante secuenciación directa, clivaje con enzimas de restricción y electroforesis de los fragmentos de ADN (RFLP) o mediante ensayos de hibridación con sondas específicas.¹²

Se pueden estudiar varias regiones del genoma de VHC (NS5b, E1, core) ya que aquí es donde se pueden localizar con mayor exactitud las diferencias que caracterizan a los distintos genotipos y subtipos; sin embargo, la elevada variabilidad genética que caracteriza a esta región del genoma condiciona que los protocolos de amplificación para la posterior secuenciación sean extremadamente complejos, incluyendo la amplificación por separado de cada uno de los genotipos, por lo tanto, la secuenciación de esta zona del genoma está, por el momento, restringida a determinados laboratorios de investigación especializada en el VHC, por dicha razón, para utilizar las técnicas moleculares para la detección de genotipos, generalmente se recurre a la amplificación de una parte del genoma mucho más conservada, la región 5' no codificante o región 5'UTR, además la utilización de esta región como base para la determinación del genotipo presenta una ventaja adicional: sirve el amplificado que se obtiene para la determinación de ARN-VHC (cualitativa o cuantitativa) que se esté usando de rutina en el laboratorio ya que la mayoría de estos ensayos amplifican dicha región.²⁹

Las técnicas moleculares comerciales que se pueden emplear en el laboratorio son básicamente dos: INNO-LiPA® HCV II y Truprep® HCV 5'NC Genotyping Kit (ambos de Bayer Diagnostics), el primero es un ensayo basado en la hibridación inversa: una vez obtenido el amplificado de la región 5'UTR, este se desnaturaliza y se enfrenta a una tira de nitrocelulosa que contiene sondas que permiten la hibridación del producto de amplificación, dichas sondas son específicas de genotipo/subtipo, el producto de la hibridación se somete posteriormente a un revelado de tipo inmunoenzimático, en donde todo el proceso queda automatizado, y finalmente se interpreta la tira comparándola con un patrón que proporciona la casa comercial, el procedimiento y los patrones de interpretación se resumen en la figura 12.²⁹

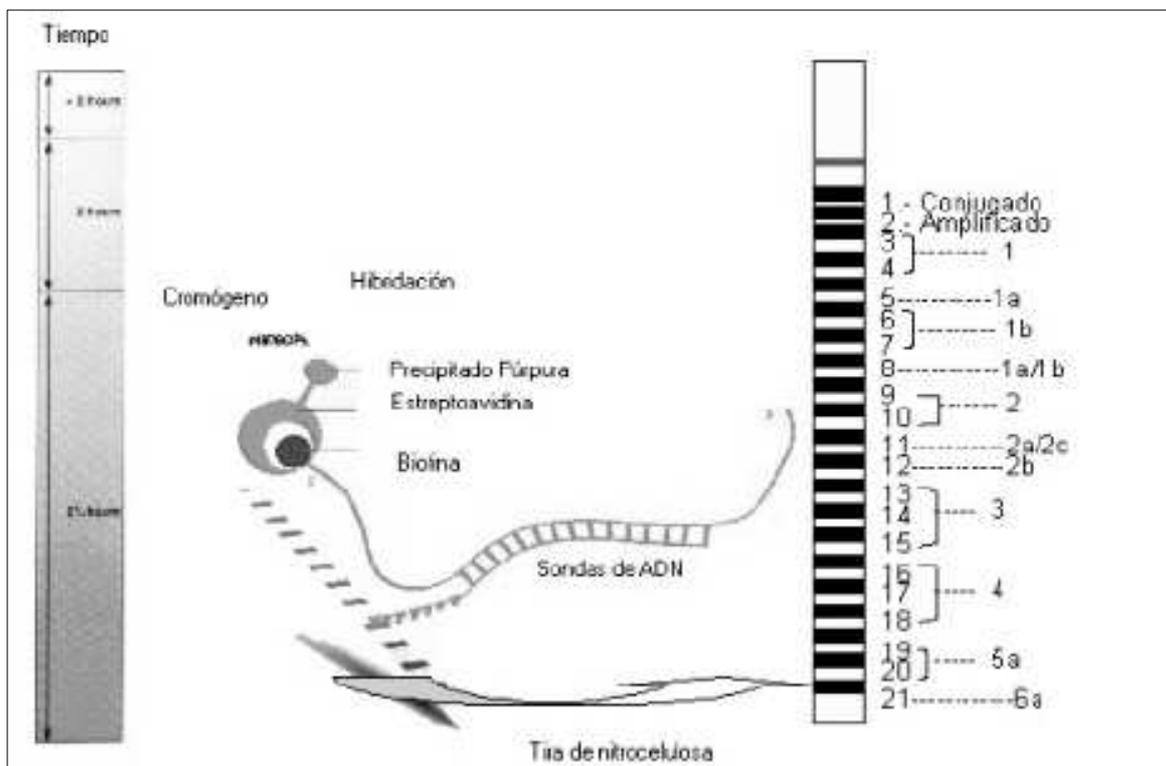


Figura 12. Fundamento e interpretación del INNO-LiPA® HCV II³²

Truprep® HCV 5'NC Genotyping Kit se basa en la secuenciación bidireccional del producto de amplificación de la región 5'UTR, para ello se necesita purificar el producto de amplificación, y secuenciarlo mediante el empleo de cebadores marcados con distintos fluoróforos (síntesis dirección 3') y (síntesis dirección 5'), y dideoxi-terminadores (ddATP, ddCTP, ddGTP y ddTTP), en donde para cada muestra se requieren 4 reacciones de secuenciación para determinar en cada una la secuencia de A, C, G y T que al final un software de interpretación alinea las secuencias con las de referencia y establece un informe

que indica el genotipo, subtipo y aislado con el que muestra una mayor homología, en esta técnica se secuencian un fragmento de 183 bases, de las que 66 son responsables de las diferencias entre genotipos/subtipos/aislados y en el resto de las posiciones no existen diferencias entre los genotipos ya que, como sabemos, la región que se secuencian es altamente conservada, dicha técnica es de mayor complejidad que la citada con anterioridad.²⁹

Ambas técnicas comerciales muestran una muy buena correlación para la determinación del genotipo y subtipo de VHC, pero hay que destacar que ninguna demuestra una eficacia superior al 80% para la estimación del subtipo, aunque de menor difusión, la PCR específica de tipo y el estudio del polimorfismo de los fragmentos de restricción del producto de amplificación (PCR-RFLP), que hasta hace poco se consideraba como la técnica de referencia, también se pueden utilizar para la determinación de genotipos, aunque actualmente se usan en pocos laboratorios debido a que es difícil incorporarlas al trabajo habitual del laboratorio de diagnóstico.²⁹

Como alternativa a los métodos moleculares se han propuesto diversos sistemas para la determinación del serotipo infectante, pero estos sistemas no se han propuesto, en gran parte debido a la pobre especificidad para la discriminación de la mayoría de los subtipos, a la falta de sensibilidad (más del 20 % de las muestras no son tipables), y a problemas de reactividad cruzada entre genotipos, lo que origina gran número de resultados discordantes, además mediante estas técnicas se detectan con mayor frecuencia infecciones mixtas.²⁹

Mediante métodos moleculares podemos estudiar las cuasiespecies virales, para ello, no existen técnicas comerciales y los métodos de laboratorio son laboriosos y complejos, por lo que la mejor aproximación a este estudio consiste en amplificar la región hipervariable (E2) y clonar el producto de PCR, para posteriormente secuenciar un número suficiente de clones (generalmente se acepta el 10%) y establecer el número de secuencias diferentes, que corresponderán al número de cuasiespecies (mayoritarias) presentes en la muestra, ya que dicha técnica es extremadamente compleja, se recurre a métodos de relativa menor complejidad, que se basan en la amplificación de la región hipervariable para posteriormente evaluar el número de cuasiespecies presentes en la muestra mediante SSCP (single stranded conformation polymorphism) o HA (heteroduplex analysis).²⁹

Cabe mencionar que actualmente existe gran variedad de métodos alternativos comercializados, pero ninguno identifica al 100% los genotipos.³⁰

2. JUSTIFICACIÓN

De entre los virus de interés en la patología humana, el Virus de la Hepatitis C (VHC) es un miembro de la familia *Flavivirus*, de un género separado: *Hepacivirus*, siendo este el único que lo conforma, es un virus envuelto con un tamaño de 30 a 60 nm de diámetro, posee un genoma de ARN de cadena sencilla con 9,600 nucleótidos que codifica una proteína que oscila entre 3,037-3,808 aminoácidos.

El VHC es un virus genéticamente estudiado hasta el momento y su característica de acuerdo a numerosos aislamientos y su análisis filogenético es su variabilidad genética: genotipos, subtipos y cuasiespecies, dicha variabilidad genética tiene importantes implicaciones tanto clínicas (patogenicidad, diagnóstico y resistencia al tratamiento) como epidemiológicas, lo que dificulta el desarrollo de vacunas, así como la falta de respuesta al tratamiento.

El genotipo del VHC es un factor con significación estadística propia e independiente de otros factores (carga viral periférica o daño hepático previo) de Respuesta Viroológica Mantenido (RVM) al tratamiento antiviral (interferón estándar o pegilado en monoterapia o en combinación con ribavirina), la tasa de RVM es dos a tres veces mayor en pacientes infectados por los genotipos 2 y 3 que en los infectados por el genotipo 1. Por otra parte se ha observado que de acuerdo al genotipo algunos pacientes muestran patrones de replicación significativamente diferentes que otros y aquellos con mayor viremia son los que fueron contagiados por medio de transfusión y responden menos a terapia con interferón, de igual manera dependiendo de la heterogeneidad genética es la exposición a la terapia (24 semanas en los genotipos 2 y 3, y 48 semanas en el genotipo 1), también se conoce que el genotipo viral puede estar relacionado con la evolución de la hepatopatía y que la distribución de los genotipos virales varía en diferentes áreas geográficas.

En este sentido, el método de referencia para la tipificación del virus es la secuenciación completa del genoma, es decir, la determinación del genotipo, sin embargo esto no es tan sencillo debido a la variabilidad genética del virus, por lo que es necesario seleccionar una región que no varíe entre un genotipo y otro (Región altamente conservada) para su posterior secuenciación.

Por lo anterior nos planteamos la siguiente pregunta de investigación ¿La determinación del genotipo del VHC será de utilidad para predecir el curso clínico, así como progresión del daño hepático o la respuesta al tratamiento?

3. OBJETIVOS

3.1. Generales

- Establecer un método confiable para poder determinar el genotipo del virus de la hepatitis C (VHC), empleando técnicas de Biología Molecular, así como la estandarización del método.

3.2. Particulares

- Desarrollar las fases para obtener la secuenciación genómica del VHC.
- Determinar la región de amplificación del genoma y realizar el alineamiento de los diferentes genotipos del VHC.
- Diseñar los cebadores (Primers) necesarios para la amplificación y secuenciación.
- Estandarizar las condiciones óptimas de amplificación y secuenciación.

4. HIPÓTESIS

El método de referencia para la determinación del genotipo del VHC es la secuenciación de ácidos nucleicos (se pueden estudiar varias regiones del genoma), sin embargo, la variabilidad genética que existe en las regiones del genoma condiciona los protocolos de amplificación para la posterior secuenciación dependiendo de la región seleccionada, por lo tanto, con la selección de la región altamente conservada, es decir, una zona que no varíe mucho entre uno y otro genotipo; diseñando los Primers específicos para la misma y las condiciones óptimas de amplificación para la posterior secuenciación será posible determinar el genotipo del VHC en cada paciente, y así ayudar a predecir el curso clínico, progresión del daño hepático o la respuesta al tratamiento.

5. MATERIAL Y EQUIPO

5.1. General

- Gradilla para tubos eppendorf
- Micropipetas (10, 100 y 1000 μ L)
- Puntas para micropipetas (10, 100 Y 1000 μ L)
- Vortex (VELP® Scientifica)
- Microcentrífuga (Beckman Coulter™: Microcentrifuge® 22R Centrifuge)
- H₂O desionizada y libre de DNAsas y RNAsas (GIBCO: UltraPure Distilled, DNase, RNase free (Molecular Biology Grade))

5.2. Particular

5.2.1. Diseño de Primers

- Computadora
- Software MultiAlin (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>)
- Software Primer3Plus

5.2.2. Extracción de ARN

- Muestras positivas a VHC.
- Campana de extracción.
- Kit de purificación de RNA (QIAGEN: QIAamp® Ultrasens™ Virus Kit).

5.2.3. RT-PCR

- Termociclador (Corbett Research CG1-96)
- Enzima (Invitrogen: SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System).
- Primers (sintetizados por Applied Biosystems)

5.2.4. Determinación de la calidad del RT-PCR y purificación del producto de PCR

- Cámara de Electroforesis (Life Technologies™: GIBCO BRL Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus)
- Fuente de Poder (Life Technologies™: GIBCO BRL Electrophores)
- Agarosa (Invitrogen: UltraPure™ Agarose)
- Buffer TAE (Invitrogen: UltraPure™ 10X TAE Buffer)
- Bromuro de Etidio (Invitrogen: Ethidium Bromide Solution)
- Enzima para purificar productos de PCR (USB®:ExoSAP-IT®)
- Software Kodak 1D v3.6.
- Sistema Analizador de Imagen (Kodak)

5.2.5. Secuenciación

- Termociclador (Corbett Research CG1-96)
- Analizador Genético (Applied Biosystem: 3130 Genetic Analyzer)
- DNTPs (Applied Biosystems: BigDye® Terminator v1.1. Cycle Sequencing Kit)
- Kit de purificación de Reacciones de secuenciación (QIAGEN: DyeEx™ 2.0 Spin Kit)
- Primers (sintetizados por Applied Biosystems)

5.2.6. Recursos empleados para el análisis de resultados

- Computadora
- Software DNA Sequencing Análisis v5.1
- Software SeqScape® v2.5.

6. MÉTODO

6.1. Obtención de la secuencia genómica del VHC, análisis bioinformático y diseño de los Primers para amplificación y secuenciación

Las secuencias genómicas de los tipos virales seleccionados del VHC a obtener fueron los genotipos y subtipos 1a, 1b, 2a/c, 2b, 3a, 4, 5 y 6. La selección de estos tipos virales fue con base en los reportados bibliográficamente de acuerdo a los más comunes.

Se obtuvo la secuencia genómica del VHC de cada genotipo de ARMORED TECHNOLOGY™: ARMORED RNA® de los genotipos 1a, 1b, 2a/c, 2b y 3a de acuerdo a su inserto de cada genotipo; y de GenBank 4, 5 y 6.

Una vez teniendo las respectivas secuencias del genoma se realizó el alineamiento de las secuencias nucleotídicas de los diferentes genotipos del VHC con el Software MultiAlin (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>), se buscó la región más conservada de las secuencias, una vez determinada la región más conservada se reanalizó con el mismo software de alineamiento pero específicamente de esta región 5'UTR (Región no Traducible) y como resultado de este análisis se diseñaron los Primers para la amplificación y la secuenciación empleando el Software Primer3Plus específicamente de la región mencionada.

Ya diseñados los primers por medio del software mencionado se procedió a realizar una comparación de estos primers en el banco de genes (GenBank, www.ncbi.nlm.nih.gov) mediante el programa computacional BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), para verificar que sólo se alineaban con el genoma del VHC y sus respectivos genotipos.

Por último se solicitó la síntesis de los mismos con Applied Biosystems (AB).

6.2. Extracción de ARN

Se obtuvieron 10 muestras de pacientes positivos al VHC, las cuales previamente fueron genotipificadas en Specialty Laboratories; de igual manera de los genotipos ARMORED RNA®.

El ARN se aisló a partir de plasma para cada muestra positiva a VHC de cada paciente provenientes de diferentes zonas de la Ciudad de México, Estado de México y otras, las cuales llegaron a los laboratorios Carpermor S.A de C.V., durante el año 2008 y principios del 2009 para solicitar la determinación del genotipo del VHC. De igual manera se aisló el ARN de las muestras provenientes de ARMORED TECHNOLOGY™: ARMORED RNA® con los genotipos 1a, 1b, 2a/c, 2b y 3a. Para la extracción, se empleó

el Kit de purificación de ARN Y ADN; QIAGEN: QIAamp® Ultrasens™ Virus Kit con algunas modificaciones respecto al protocolo de dicho kit como se describe a continuación:

Medir 500 µL de agua y 500 µL de plasma en un tubo para microcentrífuga de 2 mL limpio y estéril. Añadir 800 µL de buffer AC y 6 µL de solución acarreadora de ARN. Cerrar el tubo y mezclar por inversiones del tubo y posteriormente mezclar por vortex durante 10 segundos. Incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Transcurrido el tiempo centrifugar a 1500 X g durante 4 minutos. Remover y desechar completamente el sobrenadante con ayuda de una pipeta pasteur con punta capilar. Mezclar por vortex durante 10 segundos para poder disgregar un poco la pastilla. Adicionar 300 µL de buffer AR precalentado a 60°C y 20 µL de Proteinasa K. Mezclar por vortex hasta disolver completamente la pastilla. Incubar en baño seco durante 10 minutos a 40 °C +/- 2°C. Centrifugar brevemente para remover las burbujas. Añadir 300 µL de buffer AB y mezclar por vortex durante 15 segundos y centrifugar brevemente para remover las burbujas que se encuentren en el tubo. Transferir todo el lisado (aproximadamente 700 µL) en una columna QIAamp Spin y centrifugar a 4000 X g durante 1 minuto. Colocar en un nuevo tubo colector la columna, adicionar cuidadosamente 500 µL de buffer AW1 y centrifugar a 6000 X g durante 1 minuto. Colocar nuevamente en un tubo colector la columna, adicionar 500 µL de buffer AW2 y centrifugar a 20,000 X g durante 3 minutos. Cambiar cuidadosamente la columna a un tubo limpio y estéril para microcentrífuga de 1.5 mL. Realizar dos eluciones, cada una con 50 µL de buffer AVE y centrifugar a 6000 X g durante 1 minuto.

El procedimiento anterior fue realizado por cada muestra y por cada genotipo de ARMORED TECHNOLOGY™: ARMORED RNA®.

6.3. RT-PCR

Para poder obtener el ADNc y posteriormente la amplificación se realizó una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual es la RT-PCR, en donde se obtienen ambos procedimientos en un sólo paso, es decir la obtención de ADNc (Transcripción reversa) y al mismo tiempo la amplificación del mismo.

La composición de la mezcla y las condiciones de amplificación para la región 5'UTR se determinaron a partir de las condiciones estándar para PCR y de la temperatura de alineamiento de cada primer.

En todas las reacciones de RT-PCR se utilizaron 5 µL del extracto de ARN, 1 U de Invitrogen: SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System, 25 µL de Buffer 2X, 0.5 µM de cada Primer tanto Forward como Reverse y completando con Agua hasta obtener un volumen final de 50 µL por cada reacción. El Programa utilizado para poder obtener el ADNc, consistió de 1 ciclo de 25 minutos a 42°C, 1 ciclo de 2 minutos

a 95°C, 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 1 minuto a 55 °C y 1 minuto a 60°C, por último un HOLD a 4°C. Las reacciones de RT-PCR se llevaron a cabo en un Termociclador (Corbett Research CG1-96).

6.4. Determinación de la calidad del RT-PCR y purificación del producto de PCR.

Una vez realizada la amplificación los productos fueron resueltos por electroforesis en geles de agarosa al 2% (2 g de Agarosa en 100 mL de agua) coloreados con 3 µL de Bromuro de Etidio (10mg/mL) en una solución amortiguadora de TAE 1X (400 mM Tris acetato y 1 mM de EDTA) pH 8.3, y se corrió en una cámara de electroforesis horizontal (Life Technologies™: GIBCO BRL Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus) a 100 Volts por 50 minutos usando una fuente de poder (Life Technologies™: GIBCO BRL Electrophores). Fueron irradiados con luz UV y analizados por el sistema analizador de imagen (Kodak) con el Software Kodak 1D v3.6.

Para purificar los productos de PCR se utilizó una enzima (USB®:ExoSAP-IT®), la cual es utilizada para purificar reacciones de PCR. El protocolo se describe a continuación:

Adicionar directamente a cada producto de RT-PCR 3 µL de la enzima (directamente en el tubo de PCR) e incubar en un termociclador (Corbett Research CG1-96), de la siguiente manera; 1 ciclo de 25 minutos a 37°C y un último de 15 minutos a 80°C.

6.5. Secuenciación y purificación de los productos

La secuenciación se llevo a cabo de acuerdo al protocolo de BigDye® Terminator v1.1., con algunas modificaciones respecto al ciclado.

En todas las reacciones de Secuenciación se utilizó de 3 a 9 ng del producto de RT-PCR purificado, 2 µL de Big Dye v1.1, 3 µL de Buffer 5X, 2 µM de Primer y agua para obtener un volumen final de 20 µL. La mezcla de reacción anterior fue a ¼ de Big Dye según el protocolo de BigDye® Terminator v1.1. Se realizó para cada muestra lo anterior tanto con el primer Forward como Reverse, una reacción por cada primer. El programa utilizado consistió de 1 ciclo de 1 minuto a 96°C, 30 ciclos de 20 segundos a 96°C, 30 segundos a 50°C y 2 minutos a 60°C, por último un HOLD a 4°C. La reacción se llevo a cabo en un Termociclador (Corbett Research CG1-96).

Los productos de las reacciones fueron purificadas con el kit de purificación de reacciones de secuenciación QIAGEN: DyeEx™ 2.0 Spin Kit, de acuerdo al protocolo del mismo.

6.6. Recursos empleados para el análisis de resultados

Los resultados de la secuenciación por cada muestra fue analizada con el Software DNA Sequencing Análisis v5.1, una vez analizada y observada de acuerdo si se obtuvo una secuencia de calidad, se reanalizó con el Software SeqScape® v2.5 y así obtener el genotipo de cada muestra.

En la figura 13 se muestra el procedimiento efectuado para poder obtener el genotipo del VHC, en donde se observan los pasos que se siguieron para poder llegar a la obtención del genotipo del virus.

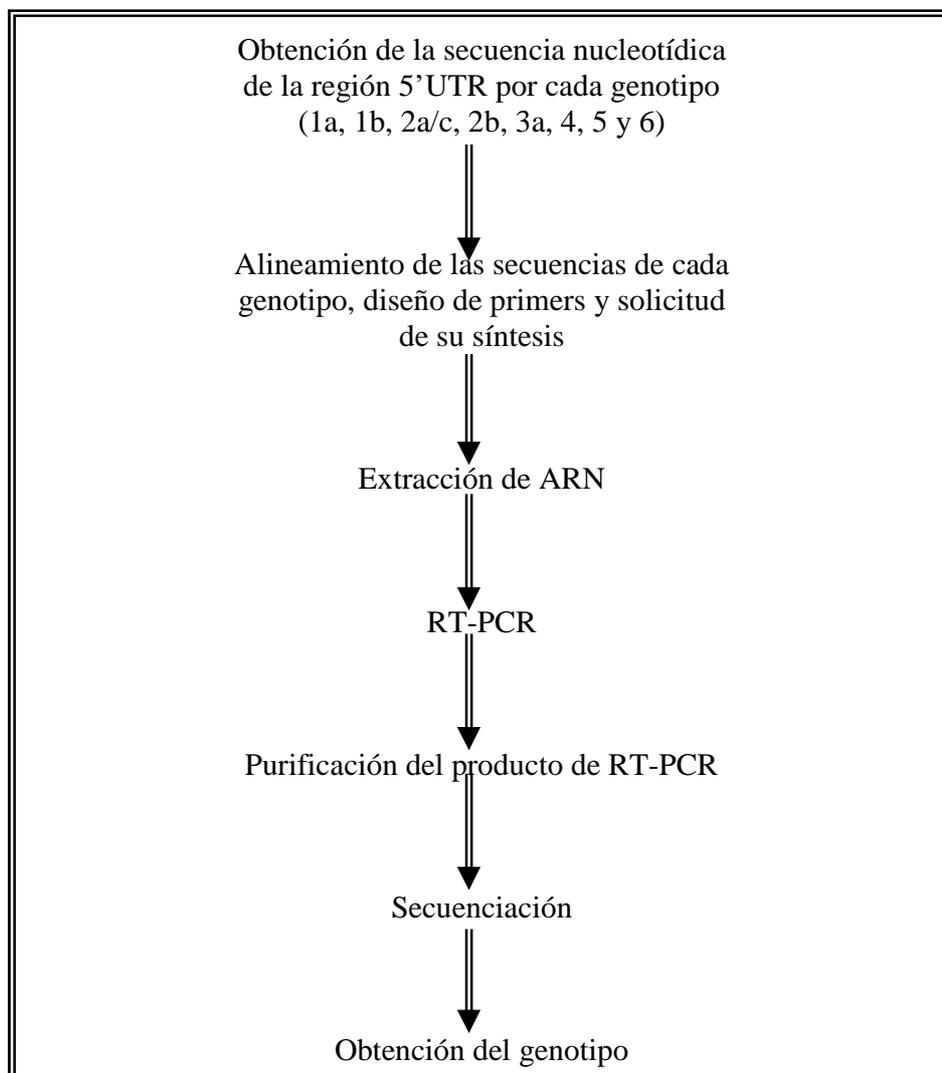


Figura 13. Resumen del procedimiento para obtener el genotipo del

7. RESULTADOS

7.1. Región de amplificación y secuenciación (5'UTR)

Para la selección de la región a amplificar se realizó todo el procedimiento antes mencionado en el procedimiento, desde la obtención de la secuencia del genoma del VHC de cada genotipo y de ahí la realización del alineamiento para así poder obtener la región en la cual los genotipos a determinar en dicho estudio de acuerdo a lo reportado bibliográficamente con respecto a la epidemiología, es decir, en cuanto a mayor incidencia en el territorio del continente americano y particularmente en nuestro país, no variara mucho entre uno y otro (región más conservada del genoma).

La región seleccionada fue la 5'UTR o también denominada región no codificante, la cual está comprendida entre los nucleótidos 1-342 esto es aproximadamente porque en realidad entre cada genotipo varia un poco dependiendo de cual se esté hablando. Esta región es altamente conservada como efectivamente se demostró con el análisis bioinformático realizado, el porcentaje de similitud entre aislamientos del mismo grupo es de aproximadamente del 98% y entre aislamientos de diferentes grupos del 93% y está implicada en la regulación de la replicación del genoma viral o en la expresión de los genes.

A continuación en la figura 14 se muestra la secuencia genómica obtenida del GenBank para el VHC, específicamente de la región 5'UTR, la cual va del nucleótido número 1 al 342.

```
GCCAGCCCCCTGATGGGGGCGACACTCCACCATGAATCACTCCCCTGTGAGGA  
ACTACTGTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTTCGTG  
CAGCCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGT  
GAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCCTTTCTTGGATAAACCCGCTC  
AATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTTG  
GGTCGCGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCTTGCGAGTGCCCCGG  
GAGGTCTCGTAGACCGTGCACCA
```

Figura 14. Secuencia nucleotídica de la región 5'UTR. La secuencia de nucleótidos va desde el número 1 hasta el 342, los cuales representan aproximadamente la región entre los diferentes genotipos.

7.2. Secuencias nucleotídicas de los diferentes genotipos.

Las secuencias nucleotídicas (figura 15) de cada genotipo particularmente de la región 5'UTR como se ha mencionado se obtuvieron de ARMORED TECHNOLOGY™: ARMORED RNA® para los tipos 1a (Cat. No. 42004), 1b (Cat. No. 42006), 2a/c (Cat. No. 42008), 2b (Cat. No. 42010) y 3a (Cat. No. 42012)); y del GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) para los tipos 4 (VHC_Y11604), 5 (VHC_9826) y 6 (NC_009827) específicamente.

>1a

```
CTCCCCTGTGAGGAACTACTGTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATG
AGTGTCGTGCAGCCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAAC
CGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCCTTTCTTGGATCAACCCGCTCA
ATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGGTCGC
GAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTA
GACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACCAAACGTAACACCA
ACCGTCGCCACAGGACGTCAAGTTCCCGGGTGGCGGTCAGATC
```

>1b

```
CTCCCCTGTGAGGAACTACTGTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATG
AGTGTCGTGCAGCCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAAC
CGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCCTTTCTTGGATCAACCCGCTCA
ATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCCCGGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGGTCGC
GAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTA
GACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACCAAACGTAACACCA
ACCGCCGCCACAGGACGTCAAGTTCCCGGGCGTTGTTTCAGATC
```

>2a/c

```
CTCCCCTGTGAGGAACTACTGTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATG
AGTGTCGTACAGCCTCCAGGCCCCCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAAC
CGGTGAGTACACCGGAATTGCCGGGAAGACTGGGTTCCTTTCTTGGATAAAACCCACTCT
ATGCCCCGGCCATTTGGGCGTGCCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGCGTTGGGTTGC
GAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCTTGCGAGTACCCCCGGGAGGTCTCGTA
GACCGTGCACCATGAGCACAAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACCAAAGAAACACAA
ACCGTCGCCACAAGACGTAAAGTTCCCGGGCGGCGGCCAGATC
```

>2b

```
CTCCCCTGTGAGGAACTACTGTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATG
AGTGTCGTACAGCCTCCAGGCCCCCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAAC
CGGTGAGTACACCGGAATTCGCGAAAGACTGGGTTCCTTTCTTGGATAAAACCCACTCTA
TGTCCGGTCATTTGGGCGTGCCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGCGTTGGGTTGCGA
AAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCTTGCGAGTACGTAGGGAGGTCTCGTAGA
CCGTGCCATCCATGAGCACCAAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACCAAAGAAACACA
AACCGCCGCCACAGGACGTAAAGTTCCCGGGTGGCGGTCAGATC
```

>3a

CTCCCCTGTGAGGAACTACTGTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTACG
AGTGTGCGTGCAGCCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAAC
CGGTGAGTACACCGGAATCGCTGGGGTGACCGGGTCCTTTCTTGAGCAACCCGCTCA
ATACCCAGAAATTTGGGCGTGCCCCCGGAGATCACTAGCCGAGTAGTGTGGGGTCGC
GAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCTTGCAGGTGCCCCGGGAGGTCTCGTA
GACCGTGCAACATGAGCACACTTCCTAAACCTCAAAGAAAAACCAAAGAAACACCAT
CCGTCGCCACAGGACGTCAAGTTCCCGGGTGGCGGACAGATC

>4

CTCCCCTGTGAGGAACTACTGTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATG
AGTGTGTACAGCCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTTCGGAAC
CGGTGAGTACACCGGAATCGCCGGGATGACCGGGTCCTTTCTTGATTAACCCGCTCA
ATGCCCCGAAATTTGGGCGTGCCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGGTCGC
GAAAGGCCTTGCGGTACTGCCTGATAGGGTGCTTGCAGGTGCCCCGGGAGGTCTCGTA
GACCGTGACCATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACCAAACGTAACACCA
ACCGCCGCCAATGGACGTAAAGTTCCCGGGTGGTGGCCAGATC

>5

CTCCCCTGTGAGGAACTACTGTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATG
AGTGTGGAACAGCCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAAC
CGGTGAGTACACCGGAATTGCCGGGATGACCGGGTCCTTTCTTGATAAACCCGCTCA
ATGCCCCGAGATTTGGGCGTGCCCCCGGAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGGTCGC
GAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCTTGCAGGTGCCCCGGGAGGTCTCGTA
GACCGTGACCATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACCAAAGAAACACCA
ACCGCCGCCACAGGACGTCAAGTTCCCGGGCGGTGGTCAGATC

>6

CTCCCCTGTGAGGAACTACTGTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTAT
GAGTGTGCGTGCAGCCTCCAGGCCCCCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTAGTCTGCGGAA
CCGGTGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCCTTTCCATTGGATCAAACCCG
CTCAATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGCGTTGGG
TTGCGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCTTGCAGGTGCCCCGGGAGGTCTC
GTAGACCGTGCAACATGAGCACACTTCCTAAACCTCAAAGAAAAACCAAAGAAACA
CCAACCGTCGCCAATGGACGTCAAGTTCCCGGGCGGCGGCCAGATC

Figura 15. Secuencias nucleotídicas de los diferentes genotipos. Se muestra la secuencia completa de la región 5'UTR, la cual se encuentra subrayada, mientras que la parte no subrayada corresponde a la parte inicial de la región de la nucleocápside o región core. Las secuencias esquematizadas corresponden del nucleótido 40 al 432, correspondiendo específicamente de la región 5'UTR.

7.3. Análisis del alineamiento de las secuencias nucleotídicas de los distintos genotipos.

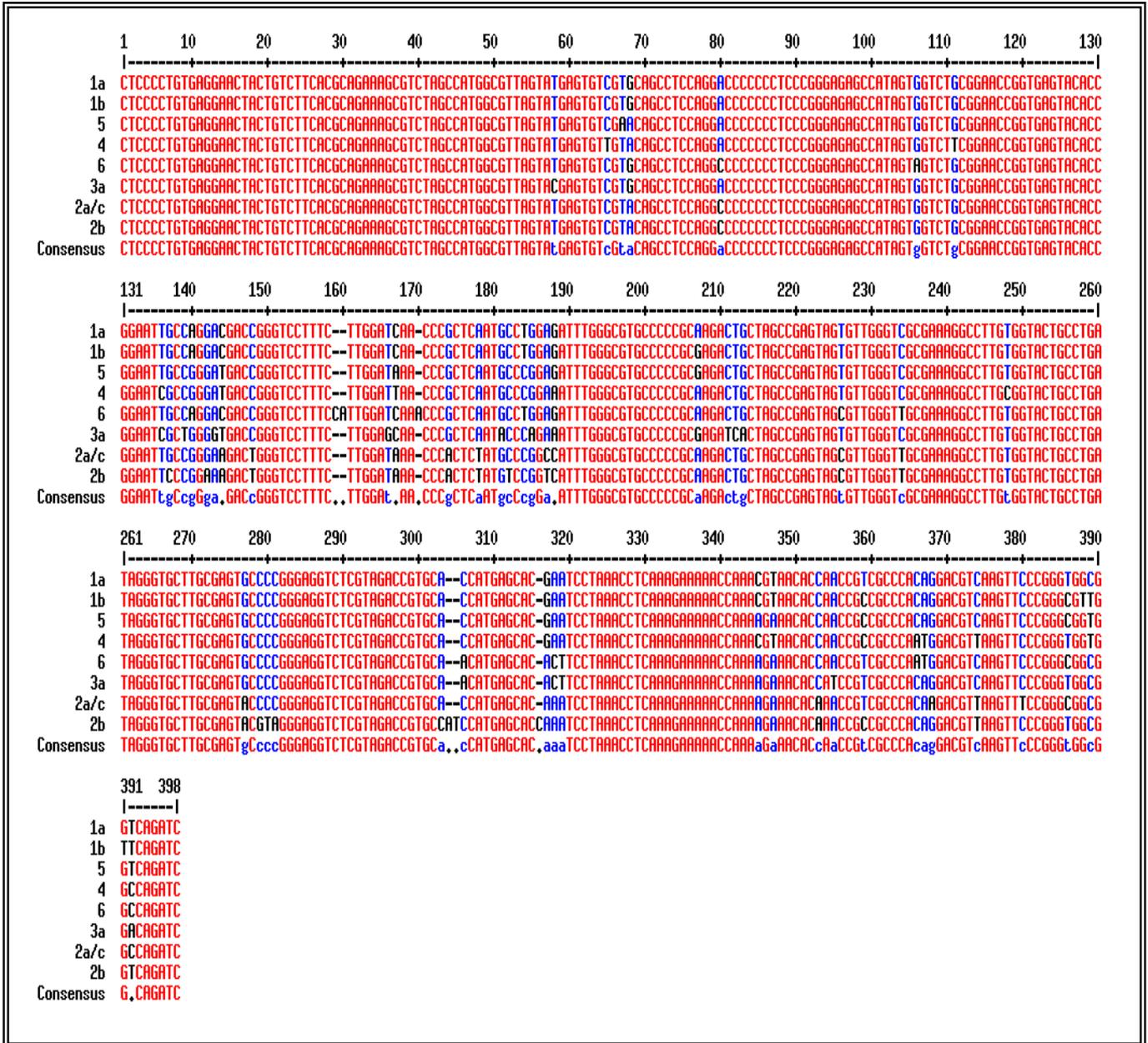


Figura 16. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de la región 5'UTR de los diferentes genotipos y la parte inicial de la región de la nucleocápside o región core. Las secuencias esquematizadas corresponden del nucleótido 40 al 432, pertenecientes específicamente de la región 5'UTR, en donde el marcado con número 1 en la figura indica al 40 y así respectivamente. Los nucleótidos marcados con color rojo corresponden a la similitud entre los diferentes genotipos, las azules y negras a las diferencias, en donde las azules a su vez demuestran la similitud en la mayoría y las negras en la minoría, mientras que donde se localizan líneas significa una inserción de nucleótidos con respecto a los demás genotipos.

7.4. RT-PCR

La estandarización del RT-PCR, como se menciono anteriormente se realizó de acuerdo a las condiciones estándar del PCR y de la temperatura de alineamiento de cada primer tanto Forward y Reverse. En el cuadro 6 se muestran algunas de sus características de cada primer utilizado, así como el nombre asignado por el laboratorio.

Cuadro 6. Características de los Primers Forward y Reverse para RT-PCR

| PRIMER | LONGITUD (Pb) | T _m (°C) | GC (%) | SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS |
|----------------------------|---------------|---------------------|--------|----------------------------|
| <i>Forward</i> (HCV21F) | 20 | 60.3 | 55 | 5'-CCCTGTGAGGAACTACTGTC-3' |
| <i>Reverse</i> (HCVR) | 20 | 59.4 | 50 | 5'-ACTCGCAAGCACCTATCAG-3' |

Con los primers mencionados y específicos para la amplificación de la región 5'UTR se obtuvo un producto de 270 pb, el cual se verifico y determino su calidad por medio de una electroforesis utilizando un gel de agarosa a las condiciones ya mencionadas (figura 17 y 18).

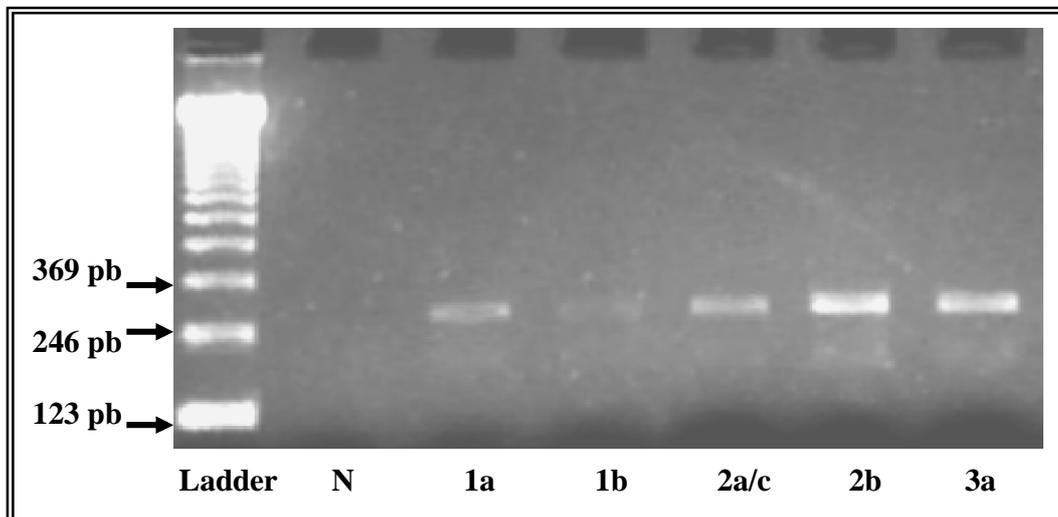


Figura 17. Producto de RT-PCR. Amplificado del RT-PCR en un corrimiento electroforético en gel de agarosa al 2 %. Se observa el amplificado de diferentes muestras, los cuales corresponden en todos los casos a un fragmento único de 270 pb utilizando los primers correspondientes (Forward y Reverse). Ladder: Marcador de ADN de 123 pb por cada línea, N: Negativo y 1a, 1b, 2a/c, 2b, 3a: Genotipos de ARMORED TECHNOLOGY™: ARMORED RNA®.

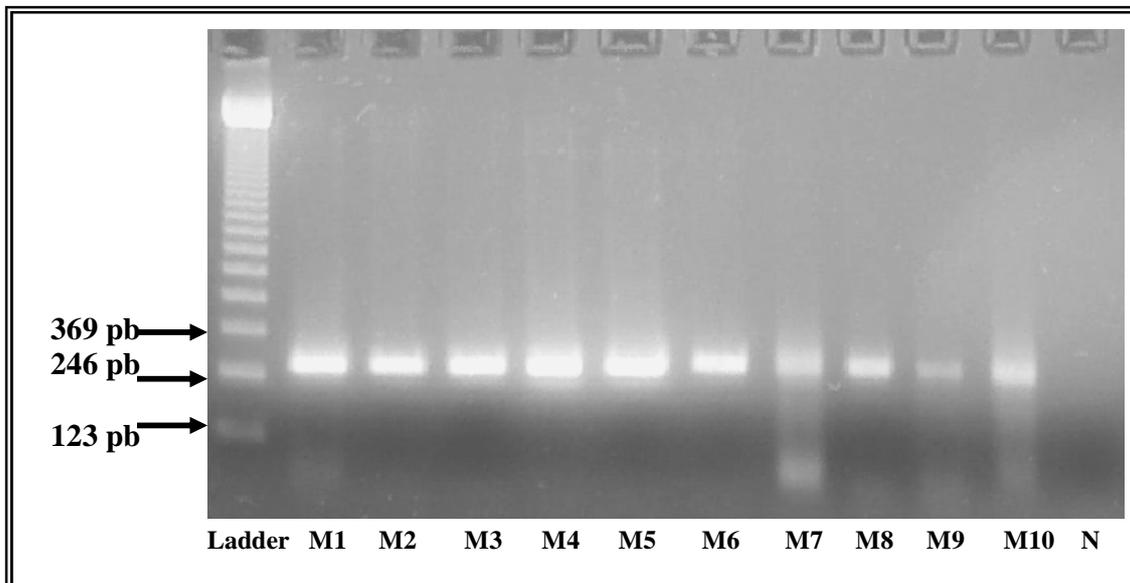


Figura 18. Producto de RT-PCR de muestras. Gel de agarosa al 2% en donde se observa el corrimiento electroforético de las diferentes muestras con un amplificado de 270 pb en cada caso. Ladder: Marcador de ADN de 123 pb por cada línea, N: Negativo y M: Muestra.

7.5. Secuenciación

La estandarización de la reacción de secuenciación se llevo a cabo como ya se ha mencionado de acuerdo al protocolo de BigDye® Terminator v1.1, con algunas modificaciones en cuanto al ciclado.

La misma estandarización de la secuenciación fue llevada a cabo a $\frac{1}{4}$ de BigDye® Terminator v1.1 de acuerdo a su protocolo, obteniéndose a esta concentración una buena señal y buena calidad de secuenciación.

Cabe mencionar que el primer Forward utilizado en el RT-PCR de igual manera fue usado para la secuenciación del VHC, cambiando únicamente el Reverse. En el cuadro 7 se muestran las características de los primers utilizados para la secuenciación.

Cuadro 7. Características de los Primers Forward y Reverse para Secuenciación.

| PRIMER | LONGITUD (Pb) | Tm (°C) | GC (%) | SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS |
|-----------------------------|---------------|---------|--------|----------------------------|
| <i>Forward</i> (HCV21F) | 20 | 60.3 | 55 | 5'-CCCTGTGAGGAACTACTGTC-3' |
| <i>Reverse</i> (HCV288R) | 20 | 60.4 | 50 | 5'-CAAGCACCTATCAGGCAGT-3' |

Con cada uno de los Primers como ya se ha mencionado se realizó una reacción por cada uno, con los cuales en ambos casos se logró secuenciar correctamente un fragmento de aproximadamente 240pb (figuras 19 y20).

En las figuras 19 y 20 se muestran las secuencias obtenidas de una misma muestra con ambos primers (Forward y Reverse), en este caso corresponden al genotipo de una de las muestras de ARMORED TECHNOLOGY™: ARMORED RNA®.

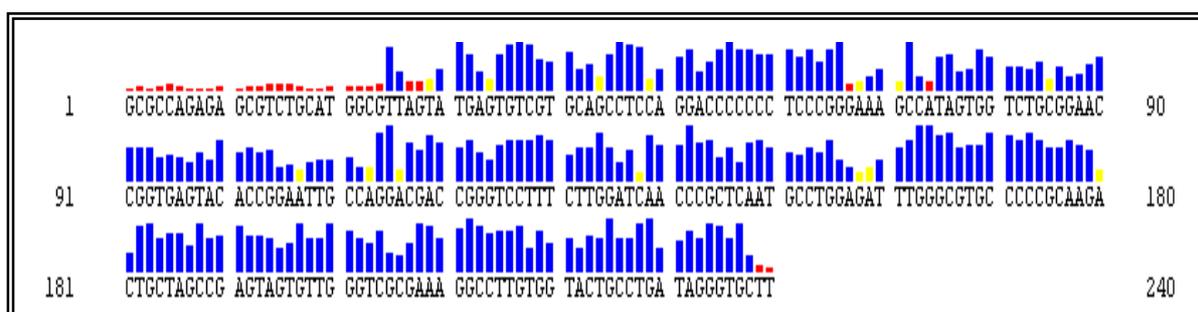


Figura 19. Secuencia del Genotipo 1a de ARMORED TECHNOLOGY™ con el primer Forward. Corresponde a la secuencia del genotipo 1a donde se muestra la calidad de la secuencia, la cual se representa por las barras sobre cada una de las bases nucleotídicas, siendo las de color rojo de baja calidad, amarillo media calidad y azul de muy buena calidad. La zona con barras rojas corresponde al inicio de la secuenciación.

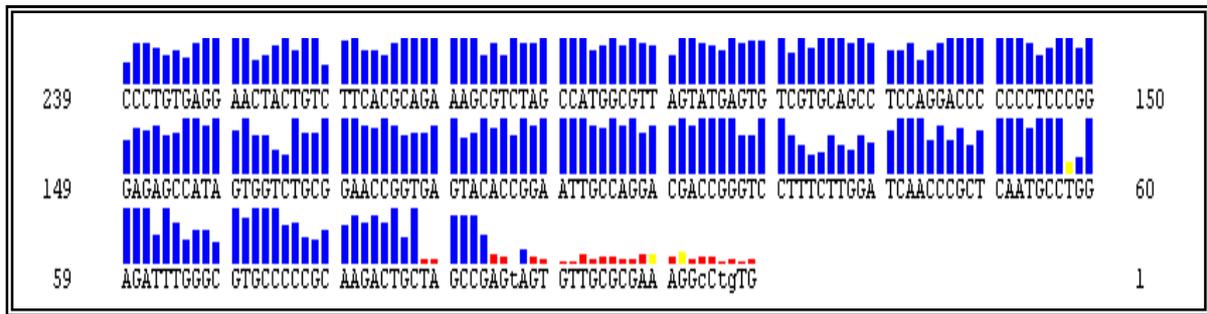


Figura 20. Secuencia del Genotipo 1a de ARMORED TECHNOLOGY™ con el primer Reverse.

Cabe mencionar que así como las secuencias ilustradas en las figuras 19 y 20 por cada primer, se obtuvieron de igual manera en cuestión de la calidad obtenida, todas las demás muestras de ARMORED TECHNOLOGY™ y de las 10 muestras, con la única variante en cuestión de la secuencia nucleotídica dependiendo del genotipo.

En la secuenciación de cada una de las muestras se obtuvo un electroferograma, el cual muestra con un color distinto cada tipo de base (A,T,G,C), que de igual manera muestra la intensidad de la señal. En la figura 21 se muestra el electroferograma de una de las muestras de ARMORED TECHNOLOGY™.

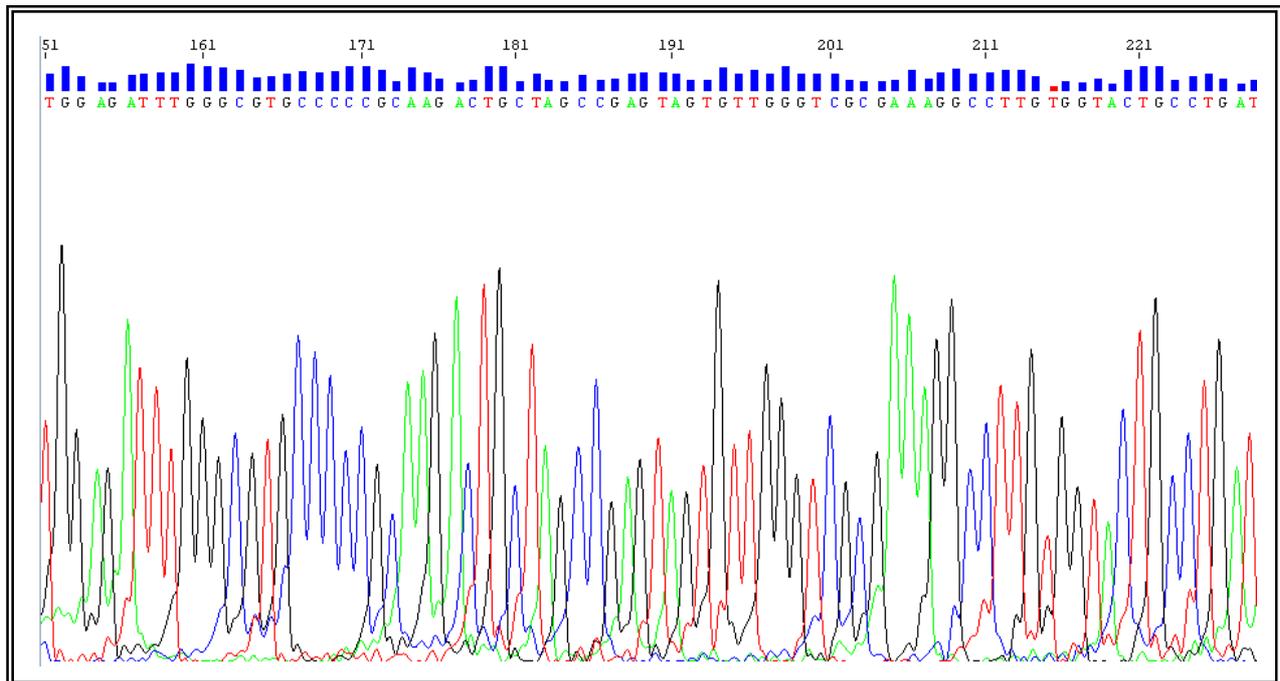


Figura 21. Electroferograma del Genotipo 1a ARMORED TECHNOLOGY™. Secuencia con su respectivo electroferograma, el cual demuestra la calidad de la secuencia con barras azules, la secuencia de nucleótidos con sus respectivos colores, así como la intensidad de la señal de igual manera con sus colores específicos a cada base. La Adenina (A) se representa con color verde, Timina (T) con rojo, Guanina (G) de negro y Citosina (C) azul.

De igual manera se obtuvieron los electroferogramas de las muestras de ARMORED TECHNOLOGY™ y de las 10 muestras.

Todos los datos anteriores, son resultados que proporciona el Software SeqScape® v2.5 al analizar las secuencias obtenidas por el Analizador Genético de Applied Biosystem: 3130 Genetic Analyzer.

En la figura 22 se observa el ensamble de una de las muestras ARMORED TECHNOLOGY™ realizado por el Software antes mencionado, la cual representa como ilustra los resultados de las secuencias ensambladas dicho programa. Cabe mencionar que para un ensamble por muestra se analizaron tanto la secuencia obtenida para Forward como Reverse por cada muestra.

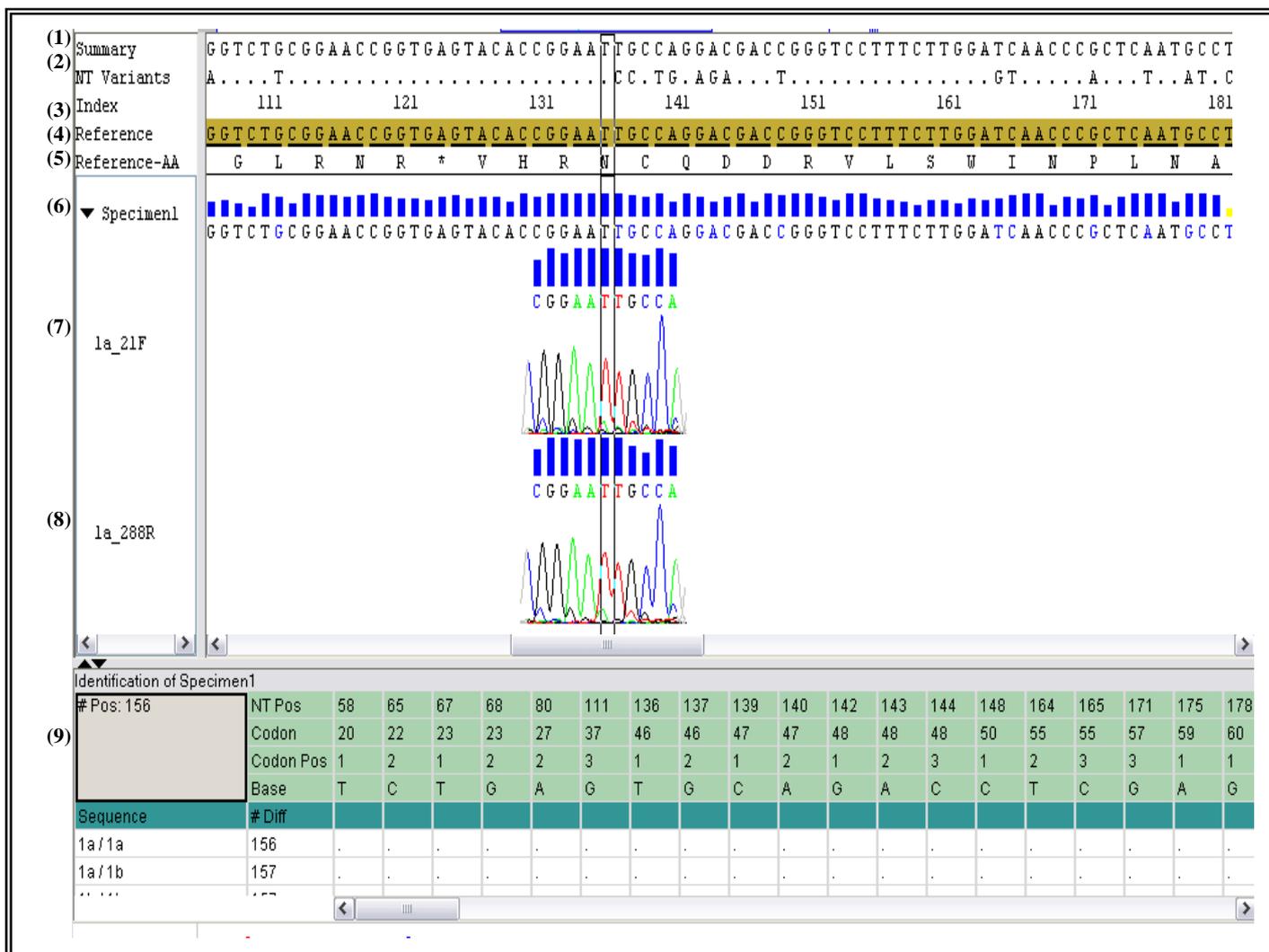


Figura 22. Alineamiento del Genotipo 1a ARMORED TECHNOLOGY™. Resultados del Software SeqScape® v2.5 con respecto al ensamble de la secuencia del genotipo 1a representado en niveles con sus respectivos electroferogramas y calidad de la secuencia para la muestra. (1) Representa la secuencia consenso cuando en un mismo proyecto se analizan más de 1 muestra. (2) Posibles Variantes en la secuencia nucleotídica que existen dependiendo al genotipo con respecto a la secuencia de referencia. (3) Número de nucleótido. (4) Secuencia de referencia. (5) Aminoácidos correspondientes a la secuencia de referencia. (6) Muestra analizada y su respectiva secuencia (involucra la secuencia de Forward y Reverse). (7) Secuencia con el primer Forward para la muestra 1a con su respectivo electroferograma. (8) Secuencia con el primer Forward para la muestra 1a con su respectivo electroferograma. (9) Librería, la cual busca con respecto a las variaciones de nucleótidos y las compara con cada secuencia (genotipo) de librería y dependiendo a cual se parezca más es el tipo de genotipo (menos número de diferencias) es como se determina el genotipo del cual se está tratando en cada muestra.

Así como el resultado anterior donde se obtuvo el genotipo de la muestra 1a de ARMORED TECHNOLOGY™, se realizó el mismo procedimiento para todas las muestras tanto del mismo ARMORED, como las 10 muestras, cabe mencionar que se realizó el alineamiento de cada muestra individualmente y en conjunto, es decir, un alineamiento general de todas las muestras al mismo tiempo en un mismo análisis (figura 23).

En la figura 23 se muestra como se obtiene un alineamiento de varias muestras al mismo tiempo, en donde también se puede observar algunos de los diferentes cambios en las bases entre cada uno de los genotipos, marcándose con color azul cielo.

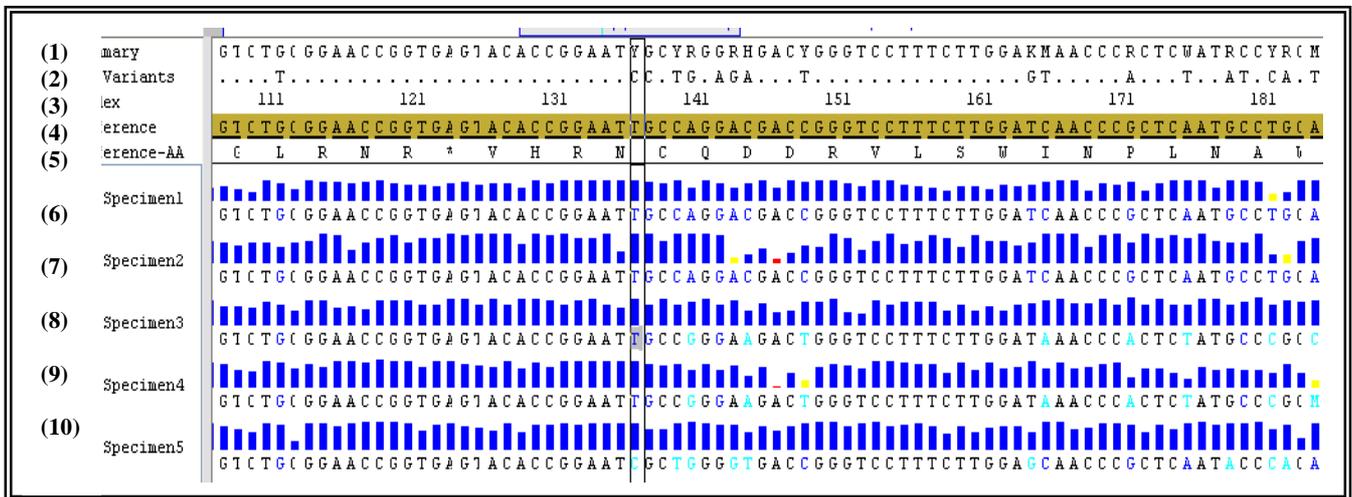


Figura 23. Alineamiento de diferentes muestras al mismo tiempo. Resultados del Software SeqScape® v2.5 con respecto al ensamblaje de varias muestras en un mismo instante, en donde se muestran sus respectivas secuencias de cada muestra, además se observa las diferencias de nucleótidos en cada una de las diferentes muestras, lo que indica que se trata de diferentes genotipos. (1) Representa la secuencia consenso cuando en un mismo proyecto se analizan más de 1 muestra. (2) Posibles Variantes en la secuencia nucleotídicas que existen dependiendo al genotipo con respecto a la secuencia de referencia. (3) Número de nucleótido. (4) Secuencia de referencia. (5) Aminoácidos correspondientes a la secuencia de referencia. (6), (7), (8), (9) y (10) Muestras analizadas y su respectiva secuencia (involucra la secuencia de Forward y Reverse).

De acuerdo a lo realizado una vez que se efectuaron los alineamientos correspondientes como ya se ha mencionado, los resultados obtenidos (genotipos) para cada una de las muestras de los genotipos de ARMORED TECHNOLOGY™ y para las de los pacientes se muestran en el siguiente cuadro.

Cuadro 8. Resultados de cada muestra analizada.

| MUESTRA | GENOTIPO |
|---------------------|-----------------|
| <i>ARMORED 1a</i> | 1a |
| <i>ARMORED 1b</i> | 1b |
| <i>ARMORED 2a/c</i> | 2a/c |
| <i>ARMORED 2b</i> | 2b |
| <i>ARMORED 3a</i> | 3a |
| <i>PACIENTE 1</i> | 1b |
| <i>PACIENTE 2</i> | 1a |
| <i>PACIENTE 3</i> | 1b |
| <i>PACIENTE 4</i> | 2a/c |
| <i>PACIENTE 5</i> | 3a |
| <i>PACIENTE 6</i> | 1b |
| <i>PACIENTE 7</i> | 1a |
| <i>PACIENTE 8</i> | 1a |
| <i>PACIENTE 9</i> | 1b |
| <i>PACIENTE 10</i> | 1a |

De los resultados anteriores se logro también el porcentaje de cada uno de los genotipos, así como sus subtipos tomando en cuenta únicamente las muestras analizadas por cada paciente, en donde el 80% correspondió al genotipo 1, de donde un 40% es de 1a y el otro 40% 1b; un 10% para genotipo 2, siendo únicamente del genotipo 2a/c; por último el otro 10% del genotipo 3.

7.6. Validación del método

Se realizó la validación del método, en donde los parámetros estudiados fueron los siguientes:

- Precisión (Reproducibilidad y Repetibilidad)
- Exactitud (Correlación con los resultados reportados por los laboratorios de referencia)
- Especificidad analítica
- Linealidad
- Sensibilidad analítica

Para cada uno de los parámetros se obtuvieron los siguientes resultados:

7.6.1. Precisión

La precisión del método fue obtenida de acuerdo a la repetibilidad y reproducibilidad del mismo.

La repetibilidad y/o precisión intermedia fue realizada en relación con la muestra de ARMORED TECHNOLOGY™ del genotipo 1a por triplicado, en donde no fue cambiado ningún parámetro, es decir, fue analizada en un sólo día, con la misma muestra, mismo tiempo, analizada por un sólo analista, etc. Los resultados de las secuencias obtenidas se muestran en las figuras 24, 25 y 26.

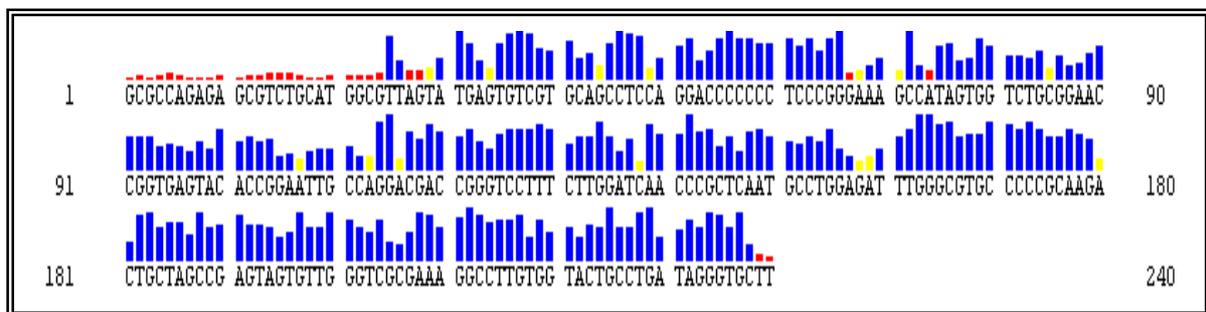


Figura 24. Secuencia 1 de 3 del Genotipo 1a de ARMORED TECHNOLOGY™.

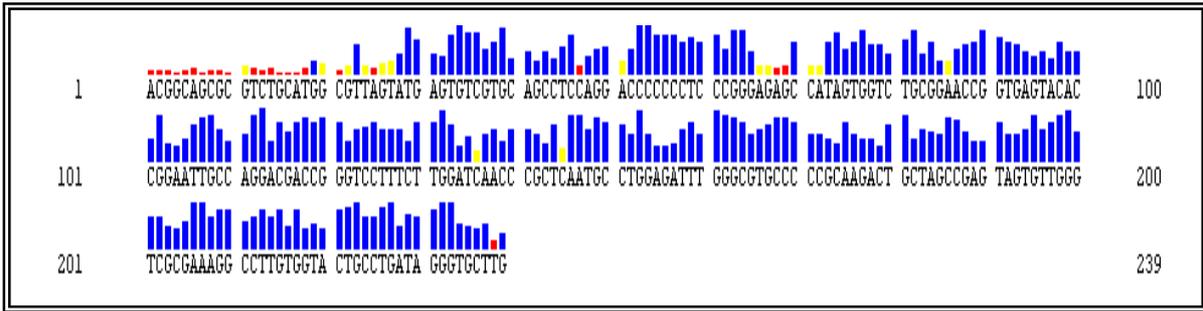


Figura 25. Secuencia 2 de 3 del Genotipo 1a de ARMORED TECHNOLOGY™.

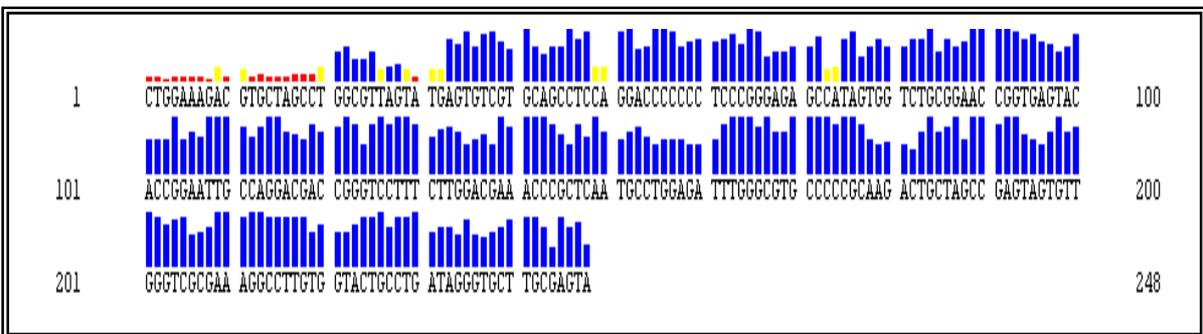


Figura 26. Secuencia 3 de 3 del Genotipo 1a de ARMORED TECHNOLOGY™.

La reproducibilidad se llevo a cabo con la misma muestra utilizada para la repetibilidad, en donde a diferencia de lo anterior, en este caso se cambiaron diferentes parámetros, como fue la persona quien realizó el análisis completo, el tiempo en que se realizaron los análisis, en relación a diferentes días, por lo tanto cambiaron temperaturas, ya que en un día y otro no reencontraban a las mismas condiciones ambientales. El análisis anterior fue realizado de igual manera por triplicado obteniéndose en todos los casos el mismo resultado.

7.6.2. Exactitud

De acuerdo a la precisión del método se realizó la correlación de los resultados obtenidos por el método implementado con respecto a lo reportado por los laboratorios de referencia (Specialty Laboratories) en cuanto a las muestras de cada paciente y de igual manera para las muestras de ARMORED TECHNOLOGY™: ARMORED RNA® (Cuadro 9).

Cuadro 9. Correlación entre los resultados obtenidos con los reportados por Specialty Laboratories.

| MUESTRA | GENOTIPO (SPECIALTY LABORATORIES) | GENOTIPO (MÉTODO) |
|---------------------|--|--------------------------|
| <i>ARMORED 1a</i> | 1a | 1a |
| <i>ARMORED 1b</i> | 1b | 1b |
| <i>ARMORED 2a/c</i> | 2a | 2a/c |
| <i>ARMORED 2b</i> | 2b | 2b |
| <i>ARMORED 3a</i> | 3a | 3a |
| <i>PACIENTE 1</i> | 1b | 1b |
| <i>PACIENTE 2</i> | 1a | 1a |
| <i>PACIENTE 3</i> | 1b | 1b |
| <i>PACIENTE 4</i> | 2a | 2a/c |
| <i>PACIENTE 5</i> | 3a | 3a |
| <i>PACIENTE 6</i> | 1b | 1b |
| <i>PACIENTE 7</i> | 1a | 1a |
| <i>PACIENTE 8</i> | 1a | 1a |
| <i>PACIENTE 9</i> | 1b | 1b |
| <i>PACIENTE 10</i> | 1a | 1a |

7.6.3. Especificidad analítica

La especificidad analítica fue analizada en cuanto a los primers, es decir, que tan específicos son los primers en la amplificación del VHC, por lo tanto, dependiendo de esto fue la calidad de la muestra, si ocurrió la amplificación o no.

En la siguiente figura se observa el producto de la amplificación de los primers sometidos a diferentes microorganismos.

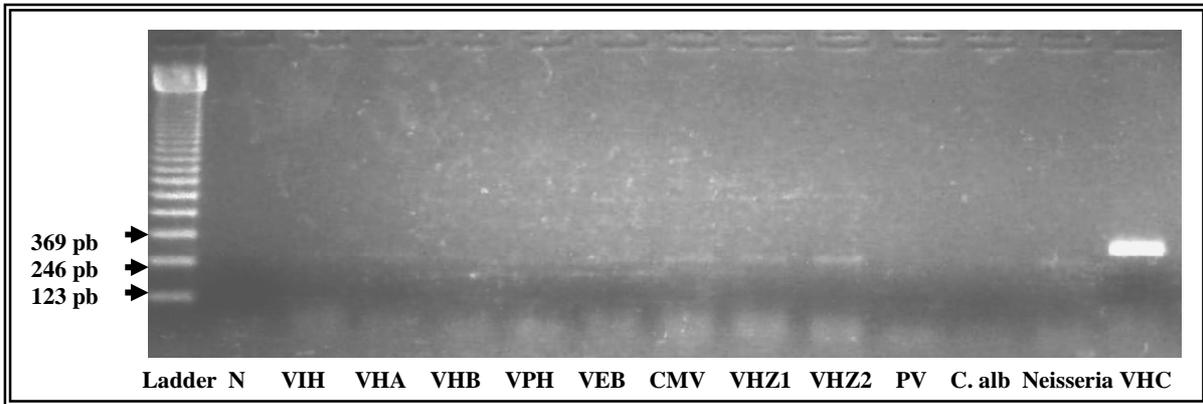


Figura 27. Especificidad analítica del método. Gel de agarosa al 2%, en donde se muestra la especificidad analítica del método, siendo específico de los primers. (Ladder) Marcador de ADN de 123 pb/ línea, (N) Negativo, (VIH) Virus de Inmunodeficiencia Humana, (VHA) Virus de Hepatitis A, (VHB) Virus de Hepatitis B, (VPH) Virus de Papiloma Humano, (VEB) Virus de Epstein-Bar, (CMV) Citomegalovirus, (VHZ1) Virus de Herpes Zoster tipo1, (VHZ2) Virus de Herpes Zoster tipo2, (PV) Parvovirus, (C. alb) *Candida albicans*, (Neisseria) *N. gonorrhoeae* y (VHC) Virus de Hepatitis C.

7.6.4. Sensibilidad y Linealidad analítica

La sensibilidad obtenida para el método fue de aproximadamente 1000 UI/mL de copias del VHC en plasma, y la linealidad encontrada por el método fue de este mismo valor en adelante (Figura 28).

En la figura 28 se muestra el resultado obtenido por una muestra, en la cual se realizaron diluciones y de acuerdo a su valor de carga viral se obtuvo el siguiente resultado en cuanto a la amplificación dependiendo la concentración (UI/mL) de VHC.

En los resultados representados en la figura, cabe mencionar que se utilizó un estándar del Colegio Americano de Patólogos (CAP) de la cual se realizaron diferentes diluciones sucesivas, sin embargo, es importante decir que dicha muestra es de ARMORED TECHNOLOGY™. La muestra de un paciente de igual manera que la de CAP se le realizó diluciones sucesivas. La muestra de CAP contaba con 200 000 UI/mL y la del paciente con 100 000 UI/mL.

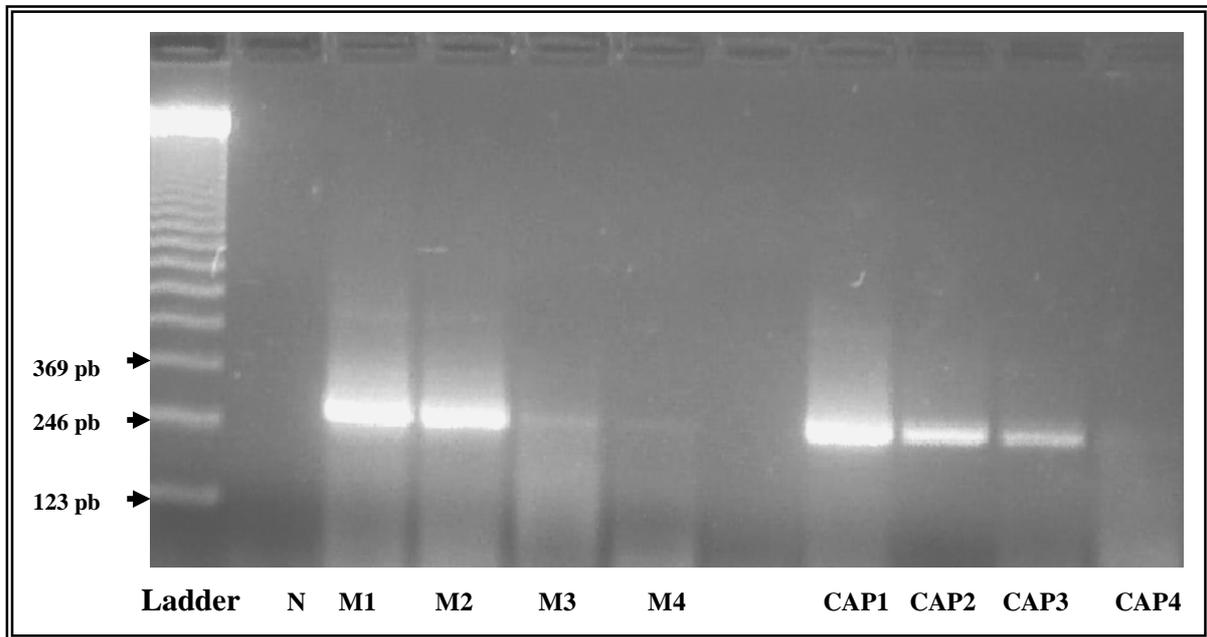


Figura 28. Sensibilidad y Linealidad analítica del método. Gel de agarosa al 2% donde se muestra la linealidad y la sensibilidad analítica del método, siendo CAP las muestras del Colegio Americano de Patólogos, M la muestra de un paciente con carga viral para VHC, 1-4 diluciones sucesivas. Ladder: marcador de ADN de 123 pb por cada línea, N: negativo, M1: 100 000 UI/mL, M2: 10 000 UI/mL, M3: 1 000 UI/mL, M4: 100 UI/mL, CAP1: 200 000 UI/mL CAP2: 20 000 UI/mL, CAP3: 2 000 UI/mL, CAP4: 200 UI/mL.

8. DISCUSIÓN

En la actualidad el método de referencia para la determinación del genotipo de VHC es la secuenciación de ADN, sin embargo la variabilidad genética que existe en las regiones del genoma condiciona los métodos para la amplificación, seguida de su secuenciación correspondiente. En el presente estudio se diseñó un método confiable para poder determinar el genotipo del virus en estudio, empleando técnicas de Biología Molecular, así como la estandarización del método en donde se estableció la región a amplificar seguido del diseño de los Primers necesarios para su respectiva extracción de ARN, amplificación, purificación y por último la secuenciación de ADN para poder decretar el genotipo de dicho virus.

La extracción y purificación de ARN del método diseñado se llevó a cabo por el Kit de purificación QIAGEN: QIAamp® Ultrasens™ Virus Kit, de acuerdo al protocolo descrito con algunas modificaciones como se mencionó anteriormente, el uso de éste equipo con un método estandarizado y validado nos aporta mayor rapidez y seguridad al manejar la muestra en comparación con algunos otros métodos utilizados, como es el caso del método convencional (Tiocianato/fenol/cloroformo) u algún otro empleado para dicho proceso, ya que dicho estuche de extracción y purificación de ARN, combina las propiedades de unión selectiva de una membrana de silica gel con la velocidad de una microcentrífuga y/o la técnica de vacío y es idealmente adecuado para el procesamiento simultáneo de muestras múltiples.

Con el Kit utilizado para extracción y purificación de ARN, inicialmente la muestra es lisada bajo condiciones altamente desnaturizantes, para inactivar las RNasas y para asegurar el aislamiento del ARN viral intacto; las soluciones amortiguadoras se ajustan para proveer una unión óptima del ARN a la membrana de QIAamp, y que la muestra sea cargada dentro de la columna; el ARN se une a la membrana y los contaminantes son lavados eficientemente a través de 2 pasos utilizando 2 buffers de lavado diferentes y un ARN de alta calidad es obtenido por elusión en un buffer especial libre de RNasas, listo para su uso directo ó su almacenamiento seguro, por lo tanto el ARN purificado se encuentra libre de proteínas, nucleasas y otros contaminantes e inhibidores, ya que la columna de QIAamp garantiza la recuperación extremadamente alta de ARN puro e intacto en aproximadamente 30 minutos sin el uso de tiocianato/fenol/cloroformo y la extracción ó precipitación con alcohol, además el ARN puede ser purificado por este sistema utilizado, de plasma (con anticoagulantes diferentes a heparina), suero y otros líquidos corporales libres de células y las muestras utilizadas pueden ser frescas ó congeladas, pero sí son congeladas sólo se pueden descongelar una vez, ciclos repetidos de congelamiento/descongelamiento de muestras podrían: 1) reducir los títulos virales y modificar una óptima sensibilidad, lo que se traduce en una baja amplificación y por tal motivo no lograra la secuenciación correctamente, 2) favorecer la aparición de acúmulos de crioprecipitados, que se traduce en una obstaculización de las membranas, por lo tanto se

obtiene un bajo rendimiento de ARN traduciéndose nuevamente a una baja amplificación y secuenciación inadecuada.

De igual manera las condiciones diseñadas para la RT-PCR del presente estudio se realizó utilizando la enzima Invitrogen: SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System, la cual combina SuperScript™ III Transcriptasa Reversa (RT) y Platinum® Taq DNA polimerasa en una simple mezcla enzimático, con ésta se tiene una gran ventaja respecto a la RT-PCR convencional en dos pasos, ya que se obtiene la amplificación del ARN en un sólo paso, es decir, no es necesario realizar dos PCR's; como primer paso la Retrotranscripción y segundo la amplificación para poder obtener el ADN complementario (ADNc), si no que en un mismo paso se obtiene el ADNc que sirve como molde para la producción de nuevas copias virales, en base a la utilización de cambios de temperatura específicos que sirven para separar las hebras originales (ARN viral + ADNc), para alinear y pegar los primers de las cadenas genómicas por formar, para que actúe la enzima (ADN Polimerasa) y forme los nuevos genomas.

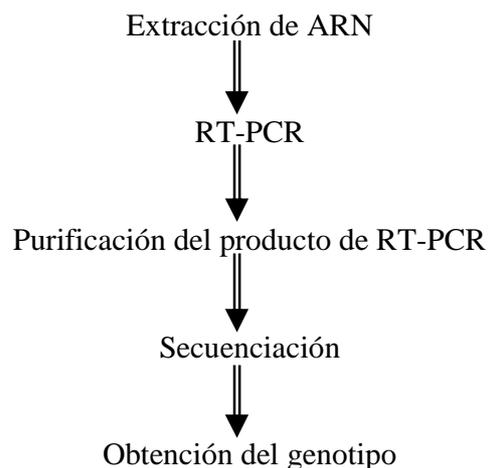
Por otra parte en el método diseñado es necesario purificar los productos de RT-PCR antes de la Secuenciación de ADN por lo que en la estandarización se utilizó la enzima USB®:ExoSAP-IT®, la cual está diseñada para la purificación de PCR para usos posteriores tales como, Secuenciación de ADN ó Análisis de Polimorfismo de un sólo nucleótido (SNP), ya que cuando la amplificación por PCR es completa cualquier resto de dNTPs consumido y Primers restantes en la mezcla del producto del PCR interfiere con dichos métodos, por lo que es necesario eliminarlos de la mezcla. El reactivo utiliza dos enzimas hidrolíticas, Exonucleasa I y Fosfatasa Alcalina de Camarón juntas en un Buffer formulado especialmente para la purificación del producto de PCR. Exonucleasa I elimina residuos de una sola cadena como Primers y otros extraños residuos de ADN de simple cadena producidos en el PCR. La Fosfatasa Alcalina de Camarón elimina los dNTPs restantes que pudieran interferir en reacciones posteriores, tal como es el caso de la secuenciación. Varias ventaja de utilizar dicho reactivo es porque 1) Es de fácil uso, es decir, se puede realizar en un sólo paso y en el mismo tubo donde se encuentra el producto de PCR, sólo es necesario la transferencia con una micropipeta, 2) No hay pérdida de muestra a diferencia de otros métodos utilizados para la purificación, tales como, purificación por geles, columnas de purificación, sedimentación, filtraciones, etc., donde se pierde una cantidad de producto considerable, con el uso de esta enzima se obtiene hasta el 100% de recuperación de producto, entre otras ventajas más.

Para la secuenciación se utilizó la matriz de Applied Biosystems: BigDye® Terminator v1.1., realizando el ciclo de secuenciación respecto al protocolo establecido con algunas modificaciones ya mencionadas en el procedimiento, ya que como se sabe en la actualidad es una de las más utilizadas para secuenciación de ADN, por lo que es una nueva formulación que proporciona 1) Aumento en la Robustez, 2) Datos de Elevada Calidad y 3) Mejora del éxito de difíciles platillas de secuenciación.

De igual manera que la purificación de los productos de PCR es necesario la purificación de la reacción de BigDye® Terminator v1.1., después del ciclado con dicha matriz, para ello se utilizó el kit de purificación de reacciones de secuenciación QIAGEN: DyeEx™ 2.0 Spin Kit, el cual tiene grandes ventaja respecto a otras técnicas de purificación de reacciones de secuenciación, tales como, precipitación con Etanol/EDTA, precipitación con Etanol/EDTA/Acetato de Sodio y otros, en cuanto a tiempos, rendimientos y más. DyeEx utiliza filtración en gel para eliminar de forma rápida y eficiente terminadores que no son incorporados a la reacción de secuenciación. La eliminación de los terminadores de la reacción es importante para prevenir que estos puedan interferir con el análisis de la secuenciación de los resultados. El gel DyeEx del material de filtración consta de esferas con poros uniformes, los cuales separan las moléculas según su peso molecular, en este caso son retenidos los terminadores y el ADN es excluido y recuperado en el flujo continuo.

Por último para el análisis de los resultados obtenidos por cada secuenciación en el método diseñado se utilizó el Software DNA Sequencing Análisis v5.1 y SeqScape® v2.5, los cuales son de un fácil manejo, el primero tiene la función principal de alinear la secuencias únicamente y poder realizar algunas modificaciones dentro de la secuencia, como es el caso cuando la señal de secuenciación es buena pero por algún motivo el software no lo nombra, en estos caso se puede nombrar manualmente, y el segundo además de poder realizar lo anterior es capaz de identificar el genotipo, los polimorfismos, traslocaciones, deleciones, etc., es decir este segundo es más complejo.

De acuerdo al método estandarizado, los pasos necesarios para obtener el genotipo del VHC como se ha mencionado anteriormente son:



Lo anterior nos indica que dicho método es muy sencillo de llevar a cabo (fácil manipulación), el personal no necesita estar sumamente capacitado para la realización del mismo, ya que se realiza la mayor parte por medio de Kits; es de suma confianza, se

obtienen rendimientos elevados, buena calidad de nuestros resultados, entre otras, ya que como se ha mencionado los insumos utilizados en el método nos brindan grandes ventajas y características especiales con respecto a otros utilizados para el mismo fin, con lo cual nos brinda una mayor calidad y una mejor confianza en nuestros resultados.

Cabe mencionar que hoy en día en México existen pocos laboratorios en donde se identifique el genotipo del VHC por secuenciación de ADN, por tal motivo no existe mucha información de estudios previamente realizados utilizando dichas técnicas moleculares. A nivel mundial existen estudios efectuados por diferentes técnicas moleculares, por mencionar algunos en 1991 Toshifumi Nakao y colaboradores identificaron el Genotipo del VHC por medio de Polimorfismos de Longitud de fragmentos de restricción (RFLP)³¹, en donde utiliza para la extracción de ARN por el método convencional de Tiocianato/fenol/cloroformo, la amplificación (RT-PCR) se lleva a cabo en dos pasos y las regiones identificadas son la región 5'UTR, NS5, sin embargo cabe mencionar que durante este tiempo aun no se tenía el conocimiento de los genotipos actuales, y sólo reconocieron los genotipos que en ese entonces habían sido identificados, los cuales eran el genotipo denominado como K1 y K2; en el año de 1992 Hiroaki Okamoto y colaboradores identificaron los genotipos del VHC 1, 2, 3 y 4 únicamente por medio de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando Primers específicos para cada uno de los genotipos³², utilizando de igual manera que Nakao en 1991 el mismo método para la extracción del ARN, la amplificación fue realizada del mismo modo en dos pasos de la región *Core* y parte de la 5'UTR, fueron utilizados cuatro primers deferentes (Forward) y un Reverse, los primeros específicos para cada uno de los genotipos (1, 2, 3 y 4) y el segundo en general para los cuatro; en 1999 Jeff J. Germer y colaboradores identificaron el genotipo de VHC por medio del análisis directo de la secuencia de productos generados con la prueba de Amplicor HCV³³, se utilizó para la extracción del ARN de igual manera el método convencional y para la determinación del genotipo se recurrió a la prueba comercial Amplicor HCV en donde detecta las regiones 5'UTR y NS5, dicho método identifica los genotipos 1, 2, 3, 4, 5 y 6 así como algunos de sus variantes; y así hay varios estudios realizados pero ninguno específicamente por medio de secuenciación de ADN.

Como se puede observar en la mayoría de los estudios realizados utilizan el método de extracción de ARN convencional, el cual tiene varias limitantes, como son el tiempo de extracción y el rendimiento entre otras, en cambio con la utilización del método diseñado como ya se ha mencionado la extracción es mucho más fácil, se reduce el tiempo y se obtiene un mayor rendimiento, por mencionar algunas ventajas. También cabe resaltar que en la mayoría de estudios la técnica en común es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), por lo que se puede observar que dicha técnica se ha planteado como una herramienta molecular muy útil en el diagnóstico de enfermedades producidas por

patógenos virales, por lo que el método diseñado en este estudio es de igual manera muy confiable y útil para diagnosticar el genotipo del VHC, ya que involucra dicha técnica.

La mayoría de estudios donde se involucra la detección del genotipo del VHC involucra la identificación de la zona 5'UTR así como la mayor parte de las técnicas comerciales, tal es el caso de INNO-LIPA® HCV II²⁹ por mencionar alguno. La selección de la mayoría de los estudios y técnicas comerciales se basa en que como se ha mencionado es una de las regiones dentro del genoma altamente conservada, es decir, no varía mucho entre un nucleótido y otro respecto a cada uno de los genotipos, con esto es mucho más sencillo poder diferenciar entre cada uno de los genotipos. Por lo anterior el método estandarizado involucra dicha región para poder realizar el análisis del genotipo, con lo cual nuevamente dicho método brinda confiabilidad en los resultados.

Con los Primers diseñados y las condiciones del RT-PCR estandarizadas se obtiene un amplificado de 270 pb tal como se observa en las figuras 17 y 18, donde se puede además rescatar que se obtiene un producto sumamente específico y sin residuos, es decir, se obtiene un producto único sin alguna interferencia aparente o productos inespecíficos, dicho fragmento no es muy grande pero sí suficiente para poder discriminar entre un genotipo y otro, ya que dentro de éste se encuentra la mayoría de los cambios importantes de cada uno de los nucleótidos entre cada genotipo del virus tal y como se muestra en la figura 16 donde se observa el alineamiento de cada uno de los genotipos dentro de la región amplificada junto con sus diferentes variantes de nucleótidos. De igual manera con los Primers diseñados y las condiciones estandarizadas de secuenciación se obtiene una secuencia de 240 pb, la cual nuevamente es suficiente para poder discriminar entre cada genotipo. Cabe resaltar que la utilización de los primers para la secuenciación como ya se ha mencionado, el Forward fue el mismo que para el RT-PCR, pero el Reverse fue distinto, el motivo es para poder obtener una señal de secuenciación con mucho mayor calidad, ya que la unión se lleva a cabo no desde el inicio o final del producto de amplificación, si no un poco más al centro logrando tener una mejor señal de secuenciación, con esto no quiere decir que no es recomendable utilizar los mismos Primers tanto en RT-PCR como secuenciación, ya que en diferentes estudios de secuenciación para identificar algún organismo específico se utilizan los mismos Primers en ambas técnicas. Dichos resultados brindan gran confiabilidad para identificar cada uno de los genotipos.

En la Cuadro 8 se puede observar los resultados obtenidos, en donde se puede ver que para los genotipos de ARMORED RNA se obtuvo el mismo resultado que el emitido por dicha muestra, para las siguientes muestras de los 10 pacientes se obtuvieron genotipos 1, 2 y 3, junto con algunos de sus variantes. Se puede observar que de las 10 muestras de los pacientes se obtuvo un 80% de genotipos correspondientes tipo 1, de los cuales la mitad del mismo corresponden al subtipo 1a y la otra mitad al subtipo 1b; un 10% para el genotipo 2, siendo únicamente del genotipo 2 a/c y por último el otro 10% correspondió al genotipo 3 subtipo 3a. De los resultados anteriores se puede ver que uno de los genotipos

de mayor incidencia es el genotipo 1, el cual como se describe en la literatura es uno de los que tienen mayor porcentaje en cuanto a epidemiología.

Durante el estudio fue necesario calificar el desempeño del método, es decir, validarlo, ya que en cualquier método diseñado es un requisito primordial cuando deseamos obtener resultados técnicamente válidos, exactos y confiables. La validación del método es necesaria ya que nos permite conocer los parámetros de desempeño y proporciona un elevado grado de confianza y seguridad en el método y en los resultados que se obtienen al aplicarlo. Se puede decir que la validación es la confirmación por examen y el suministro de evidencia objetiva que se han cumplido los requisitos particulares para la utilización o aplicación específica prevista, es decir, es el proceso que establece mediante amplios estudios de laboratorio que los parámetros del método cumplen las especificaciones relacionadas con el uso previsto de los resultados, en este caso para la determinación del genotipo del VHC por el método descrito.

Durante la validación se realizaron como ya se describió anteriormente la prueba de exactitud, el cual entre varias características, evalúa la veracidad del método, ya que expresa la cercanía entre el valor que es aceptado, sea como un valor convencional verdadero, sea como un valor de referencia aceptado y el valor encontrado obtenido al aplicar el procedimiento de análisis un cierto número de veces, en dicho método se evaluó la exactitud por medio de la correlación de los resultados obtenidos respecto a los reportados por el laboratorio de referencia (Specialty Laboratories), es decir, comparando los valores obtenidos por el método con respecto a los reportados por dicho laboratorio. En la Cuadro 9 se observan los resultados obtenidos junto con los reportados por los laboratorios de referencia rescatando que de las 5 muestras de ARMORED RNA y las 10 de los pacientes se encontró que de los 15 genotipos correspondientes a las muestras analizadas por el método arrojó los mismos resultados que la de los laboratorios de referencia, cabe resaltar que para el resultado del paciente 4, el genotipo que reporta Specialty Laboratories es 2a, mientras que para el obtenido por el método es 2a/c, sin embargo, es el mismo resultado, ya que de acuerdo ARMORED RNA el genotipo 2a y 2c es el mismo, de igual manera como lo reporta Liang J, Hoffnagle en su libro titulado "Hepatitis C biomedical research reports"²³. Lo anterior nos demuestra que el método es capaz de obtener resultados sin desconfiar de los mismos.

Un parámetro más que se evaluó dentro de la validación fue la precisión, ya que es de suma importancia al igual que la exactitud puesto que nos expresa la cercanía de coincidencia, es decir, el grado de dispersión entre una serie de mediciones obtenidas de múltiples muestreos de una misma muestra homogénea bajo condiciones establecidas como es el analista quien realiza el examen, así como las condiciones ambientales por mencionar algunas. Dicho parámetro fue evaluado de acuerdo a su repetibilidad o repetitividad, la cual nos evalúa la precisión obtenida bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo, como es el caso del análisis en el mismo día, por el mismo analista, la

misma muestra homogénea y el mismo equipo, obteniéndose como se observa en las figuras 24, 25 y 26 resultados iguales en cuanto a secuencia y calidad de los mismos en donde en los tres casos se llegó a la misma conclusión, es decir, al mismo genotipo en todas las muestras, por lo que la repetibilidad fue satisfactoria demostrando que el método es capaz de obtener el mismo resultado de una misma muestra analizada cuantas veces se requiera y siempre se obtendrá un mismo resultado sin discrepancia entre un análisis y otro, por lo que se obtendrá el mismo genotipo sin desconfiar en los mismos. También como ya se mencionó dicho parámetro fue evaluado mediante la reproducibilidad y/o precisión intermedia la cual nos evalúa la precisión obtenida dentro del laboratorio por diferentes analistas, en días distintos (distintas condiciones ambientales) con la misma muestra, obteniéndose los mismos resultados que con repetibilidad en cuanto a que se llegó a la misma conclusión (mismo genotipo en la muestra analizada). De igual manera que la exactitud obtenida, la precisión conseguida nos demuestra que el método una vez más es confiable y sirve para lo que fue diseñado.

En un método diseñado para poder identificar o diagnosticar ciertas enfermedades por algún agente patógeno es probable que no solamente se encuentre en el espécimen (muestra) un sólo tipo de microorganismo, sino que dos o más de diferentes naturalezas, en estos casos es probable que el método si no es específico para un cierto tipo de microorganismo se pueden obtener falsos negativos o positivos según sea el caso, por lo que es necesario que todo método sea selectivo o exacto para evitar dichos problemas de interferencias, en este caso se evaluó dicho parámetro (especificidad analítica) de acuerdo a la especificidad o selectividad de los Primers diseñados, ya que en métodos de esta índole, en donde se usan técnicas moleculares es muy común que durante la amplificación existan amplificados inespecíficos o de diferentes microorganismos dentro de una misma reacción, por lo que es importante que sean específicos y/ selectos sólo para VHC. Dentro de este parámetro se sometió como se puede observar en la figura 27 a diferentes microorganismos, los cuales fueron seleccionados de acuerdo a las pruebas de identificación que se realizan dentro del laboratorio, es decir, los microorganismos que son detectados y a los posibles microorganismos de los cuales una muestra de esta índole puede contener desde que es tomada o contaminada dentro del mismo laboratorio por alguna contaminación cruzada. Lo anterior nos demuestra que el método tiene la habilidad de evaluar inequívocamente el analito (muestra) en presencia de componentes que se puede esperar que estén presentes.

Por último se determinó la concentración mínima de VHC que es posible ser detectada, es decir, la sensibilidad analítica del método y también la concentración mínima y la máxima con la que se puede trabajar, es decir, la linealidad analítica (intervalo de linealidad). Para lo anterior como se muestra en la figura 28 se utilizaron dos tipos de muestras, a las cuales se le realizaron diluciones sucesivas de múltiplos de 10, el primer tipo fue un estándar de ARMORED RNA, muestras del Colegio Americano de Patólogos (CAP), y las segundas fueron muestras de un paciente con una concentración particular. De

los resultados obtenidos se rescata que para el método diseñado se obtuvo una sensibilidad de 1000 UI/mL aproximadamente de copias de VHC en plasma y la linealidad del mismo valor en adelante, es decir, mayor o igual a 1000 UI/mL. Lo anterior nos demuestra que dentro de estas concentraciones el método es capaz de obtener resultados que tienen un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad. Cabe resaltar que la concentración encontrada para el método es relativamente baja a comparación a otros métodos tanto comerciales como no comerciales.²⁹

Una característica que es importante mencionar respecto al método es que además de todo lo que se ha descrito, es posible diferenciar fácilmente y sin error los genotipos 1a y 1b, ya que como se describe en algunas bibliografías dichos genotipos son sumamente difíciles de diferenciar por el simple hecho que en la región 5'UTR solamente existe la diferencia de un sólo nucleótido (A por G).

En la actualidad es importante poder encontrar o diseñar ciertos estándares de oro para la determinación de ciertas enfermedades, ya que como se sabe son métodos que por su validez, confiabilidad y aplicabilidad es utilizado como primer método de referencia para poder diagnosticar una determinada enfermedad por algún tipo de microorganismo. La importancia de ciertos estándares de oro es de suma importancia principalmente en el área de la Biología Molecular, ya que existen pocos estándares de este tipo, debido a la complejidad de las técnicas utilizadas. Por todo lo descrito anteriormente es posible que en algún futuro si el método es estudiado con mucho más detalle podría ser utilizado como un estándar de oro para lo que fue diseñado, es decir, para la determinación del Virus de la Hepatitis C, ya que como se ha mencionado y con los resultados obtenidos se demuestra que el método es de suma confiabilidad, con una alta validez y es relativamente sencillo de poder llevarse a cabo.

9. CONCLUSIONES

Se logro diseñar y estandarizar un método confiable para poder determinar el genotipo del virus de la hepatitis C, empleando técnicas de Biología Molecular, tales como RT-PCR y Secuenciación de ADN, desarrollando las fases para obtener la secuenciación genómica del virus, amplificando la región 5'UTR y diseñando los Primers específicos para dicha región tanto en su amplificación como su secuenciación.

Con la estandarización del método diseñado efectivamente fue posible determinar el Genotipo del Virus de la Hepatitis C (VHC) en cada uno de los pacientes, y aun que no fue posible demostrar la efectividad de la determinación del mismo para ayudar a predecir el curso clínico, progresión del daño hepático o la respuesta al tratamiento, ya que, no fue el objetivo de dicho estudio, se puede afirmar que efectivamente lo anterior es correcto.

10. PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES

Se recomienda que cada vez que se manden a sintetizar los Primers sean cuantificados y así poder determinar la concentración real de la muestra, ya que los proveedores nos indican una concentración pero en realidad no es la concentración exacta. Lo anterior es de suma importancia ya que si se toman concentraciones erróneas el método no funciona con concentraciones menores a las mencionadas en el método principalmente en la secuenciación, el cual es un punto crítico la concentración de los Primers para poder obtener resultados de calidad en cuanto a la secuenciación.

El método diseñado posiblemente puede ser utilizado en un futuro no muy lejano como un estándar de oro, debido a su confiabilidad, validez y aplicabilidad encontrada en el mismo.

11.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mosby. Diccionario de medicina. 4ª ed. Barcelona: Océano grupo editorial; pp. 649
2. Tierney L, Mc Phee S, Papadakis M. Diagnóstico y tratamiento clínico. 38ª ed. DF: El manual moderno; 2003.
3. Herrerías JM, Díaz A, Jiménez M. Tratado de hepatología. Sevilla: Universidad de Sevilla; 1996.
4. Mc Phee S, Lingappa V, Ganong W. Fisiopatología médica. Una introducción a la medicina clínica. DF: El manual moderno; 2001.
5. Cabré E, Rodríguez-Iglesias P, Caballería J, et al. Short- and longterm outcome of severe alcoholic hepatitis treated with steroids or enteral nutrition. A multicenter randomized study. *Hepatology* 2000
6. Marcus EL, Kasper R. Viral hepatitis in older adults. *J Am Geriatric Soc* 1997;45:755-63.
7. Cherem HJ, Angulo VF. Hepatitis Viral. *Fac Med UNAM Rev.* 2000; 43; 90-100.
8. Sherlock S. Enfermedades del hígado y vías biliares. 8ª ed. Buenos aires: El ateneo; 1990.
9. Planas VR, Crespo GJ. Hepatitis C todo lo que hay que saber. Barcelona: Ediciones Mayo; 2003, pp 1-18.
10. <http://www.elmundo.es/elmundosalud/fichas/hepatitis>
11. <http://www.abbottdiagnostics.com>
12. Méndez N, Uribe M. Conceptos actuales de hepatitis C. DF: Mc Graw-Hill; 2003.
13. Constant SL, Bottomly K. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol* 1997;15:297-322
14. Guidotti LG, Chisari FV. To kill or to cure: options in host defense against viral infection. *Curr Opin Immunol* 1996;8:478-83.
15. Cuthbert JA. Hepatitis C: Progress and problems. *Clin Microbiol Rev* 1994;7:505-32.
16. Purcell R. The hepatitis C virus: Overview. *Hepatology* 1997;26, Suppl. 1:S11-S14.
17. Alonso P, San Miguel A, Eiros J. El virus de la hepatitis C. Valladolid: Secretariado de publicaciones e intercambio científico; 1998.

18. Bukh J, Apgar CL. Five new or recently discovered (GBV-A) virus species are indigenous to new world monkeys and constitute a separate genus of *Flaviviridae*. *Virology* 1997;229:429.
19. Arroyo V, Bosch J, Bruix J. Tratamiento de las enfermedades hepáticas. Barcelona: Masson; 1999.
20. <http://www.medware.cl/medios/2007/mayo/cursoAvancesGastro/MuoszFigural.jpg>
21. Kato N. Molecular virology of hepatitis C virus. *Acta Med Okayama* 2001;55:133-59.
22. Gómez CI, Álvarez GM. Biología y métodos diagnósticos del virus de la hepatitis C. *Rev Biomed* 2003;14:253-68
23. Liang J, Hoffnagle. Hepatitis C biomedical research reports. New York: Academic Press; 2000.
24. <http://www.dgepi.salud.gob.mx> (septiembre 08, 18:24)
25. Feldman M, Scharschmidt B, Klein S. Enfermedades gastrointestinales y hepáticas. Fisiología, diagnóstico y tratamiento. Buenos aires: Panamericana; 2000.
26. Kuhns M, McNamara A, Medina M, et al. Detection of hepatitis C virus RNA in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 1994;4:1941
27. Yoshika K, Ishikara T, Itoh Y, et al. Detection of hepatitis C by polymerase chain reaction and response to interferon-alfa therapy: relationship to genotypes of hepatitis C virus. *Hepatology* 1992;16:293.
28. Henry T. El laboratorio en el diagnóstico clínico: Marban libros; 2005.
29. Majid AM, Gretch DR. Current and future hepatitis C virus diagnostic testing: problems and advancements. *Microbes and Infection* 2002;4:1227-36.
30. Zheng X, Pang A, Roberto A. Direct comparison of hepatitis C virus genotypes tested by INNO-LiPA HCV II and TRUGENE HCV genotyping methods. *J Clin Virol* 2003;28:214-16.
31. Nakao T, Enomoto N, Takada N, Akira Takada. Typing of hepatitis C virus genomes by restriction fragment length polymorphism. *J Virol* 1991 ; 72 :2105-2112.
32. Okamoto H, Sugiyama Y, Okada S, Kurai K, Akahane et al. Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources. *J Virol* 1992 ; 73 :673-679.

33. Germer JJ, Rys PN, Thorvilson JN, Persing DH. Determination of hepatitis C virus genotype by direct sequence analysis of products generated with the Amplicor HCV test. *J Clin Micro* 1999; 37(8): 2625-2630.

12.GLOSARIO

ADN: Abreviatura de ácido desoxirribonucleico (en inglés deoxyribonucleic acid o DNA). Es la molécula que contiene y transmite la información genética de los organismos. Está formada por dos cadenas complementarias de nucleótidos que se enrollan entre sí formando una doble hélice que se mantiene unida por enlaces de hidrógeno entre bases complementarias. Los cuatro nucleótidos que forman el ADN contienen las bases adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T). Dado que en el ADN la adenina se empareja sólo con la timina y la citosina sólo con la guanina, cada cadena del ADN puede ser empleada como molde para fabricar su complementaria.

ADNc: Abreviatura de ácido desoxirribonucleico complementario. ADN cuyas bases son complementarias al ARNm, se emplea para clonación o como sonda específica en estudios de hibridación.

ARN: Abreviatura de ácido ribonucleico (en inglés ribonucleic acid o RNA). Es la molécula formada por un poli-ribonucleótido de longitud variable que contiene Uracilo en vez de Timina. Hay tres tipos: ARN mensajero (ARNm), ARN ribosomal (ARNr) y ARN transferente (ARNt).

ADN Polimerasa: Enzima que puede sintetizar una nueva cadena de ADN, usando como molde una u otra cadena de ADN ya existente.

Alelo: Una de las dos o más formas alternativas de un gen en un locus determinado, que da lugar a características hereditarias alternativas.

Amplificación de ADN: Es el incremento en el número de copias de un fragmento específico de ADN.

Bases: También denominadas pares de bases y a cada par la conforman la unión de Adenina y Timina (Adenina y Uracilo en el caso de ARN), y Citosina y Guanina.

Biología Molecular: Ciencia cuyo objetivo fundamental es la comprensión de todos aquellos procesos celulares, que contribuyen a que la información genética se transmita eficientemente de unos seres a otros, y se exprese en los nuevos individuos.

Célula: Unidad anatomofuncional de los seres vivos, capaz de autoreproducirse y constituyente el único elemento que proporciona ADN para todo tipo de análisis independiente del órgano o fluido del que proceda.

Codón: Triplete de bases del ADN que codifica un aminoácido.

Cromatina: Material formado por ácidos nucleicos y proteínas que se observa en el núcleo de la célula en interface.

Cromosoma: Estructura de la célula portadora de los genes, filamentosa autoreplicativa constituida por cromatina.

dNTPs: Unidades básicas de construcción para la nueva molécula de ADN y son utilizados en múltiples ensayos basados en la PCR. La pureza de los dNTPs es de suma importancia para la obtención de resultados confiables.

Dominio: Segmento de un polipéptido o de ADN que tiene propiedades específicas conocidas.

Electroforesis: Es la técnica por la cual mezclas complejas de moléculas como proteínas, ADN o ARN se separan en un campo eléctrico de acuerdo al tamaño y a su carga eléctrica. La electricidad empuja las moléculas a través de los poros de un gel, que es una sustancia firme como la gelatina.

Exón: Porción de una molécula de ADN, que produce aquellas partes del ARN precursor que no son eliminadas durante la transcripción, forman el ARN mensajero y por tanto especifican la estructura primaria del producto de los genes.

Enzima: Sustancia orgánica soluble, que provoca o acelera una reacción bioquímica.

Gen: Unidad de herencia que ocupa una posición concreta en el genoma (locus) y está constituido por una secuencia de ADN que codifica un ARN funcional.

Genoma: Constitución completa del material genético en un organismo o individuo.

Genotipificación: Determinación del genotipo.

Genotipo: Conjunto de los alelos de un individuo en uno, varios o todos sus loci.

Locus: Sitio específico de un cromosoma.

Mapeo: Término que designa colectivamente los distintos procedimientos (tanto genéticos como físicos) empleados en la construcción de mapas génicos.

Mutación: Cambio en una secuencia de nucleótidos de ADN. Si dicho cambio ocurre en una célula sexualmente reproductiva, éste puede ser transmitido a su descendencia.

Nucleótido: Subunidad química compuesta de un azúcar con cinco carbonos, un fosfato y una base nitrogenada, que forma los ácidos nucleicos.

Oligonucleótidos: Secuencia lineal de nucleótidos unidos por enlaces fosfo-diéster, habitualmente no mayor de 50 nucleótidos

PCR: Abreviatura de Reacción en Cadena de la Polimerasa. Procedimiento de laboratorio en el cual, cantidades diminutas de ADN pueden ser copiadas millones de veces en unas pocas horas.

Polipéptido: Polímero formado por aminoácidos unidos por enlaces peptídicos.

Primer o cebador: Pequeña cadena de nucleótidos a partir de la cual la ADN polimerasa inicia la síntesis de una molécula nueva de ADN.

Proteína: Una molécula compuesta por una o más cadenas de aminoácidos. Las proteínas desempeñan una amplia gama de actividades vitales en la célula.

Replicación: Mecanismo que permite al ADN duplicarse (es decir, sintetizar una copia idéntica). Esta duplicación del material genético se produce de acuerdo con un mecanismo semiconservador, lo que indica que las dos cadenas complementarias del ADN original, al separarse, sirven de molde cada una para la síntesis de una nueva cadena complementaria de la cadena molde, de forma que cada nueva doble hélice contiene una de las cadenas del ADN original.

Transcripción: Proceso mediante el cual se transfiere la información contenida en la secuencia del ADN hacia la secuencia de proteína utilizando diversos ARN como intermediarios. Durante la transcripción genética, las secuencias de ADN son copiadas a ARN mediante una enzima llamada ARN polimerasa que sintetiza un ARN mensajero que mantiene la información de la secuencia del ADN. De esta manera, la transcripción del ADN también podría llamarse síntesis del ARN mensajero.

Secuencia del ADN: El proceso de descifrar el orden de las bases nitrogenadas que componen una molécula de ADN.

Secuenciación: Conjunto de métodos y técnicas de Biología Molecular cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos (A, C, G y T).

Virus: Microorganismo, mucho más pequeño que una bacteria, que al no poseer una actividad metabólica independiente, solo puede reproducirse dentro de una célula vegetal o animal viva.

13.ANEXOS

13.1. Fichas técnicas de los Genotipos del VHC por ARMORED RNA®



Armored RNA® Hepatitis C Virus (Genotype 1a)

Catalog #: 42004

Suggested Use

- Daily controls for RNA extraction, amplification, and detection
- Calibrating controls, proficiency samples, or new assay development

Packaged HCV-1a Sequence from the 5'UTR region

The Roche Amplicor® HCV Monitor® primer binding regions (KY80/KY78) are underlined (see below). The PCR product generated is 244 basepairs (Young, 1993).

| | | | | |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------|
| GACCTCCACC | ATGAATCACT | CCCCTGTGAG | GACTACTGT | CTTCACGCAG |
| <u>AAAGCGTCTA</u> | <u>GCCATGGCGT</u> | TAGTATGAGT | GTCGTGCAGC | CTCCAGGACC |
| KY80 | | | | |
| CCCCCTCCCG | GGAGAGCCAT | AGTGGTCTGC | GGAACCGGTG | AGTACACCGG |
| AATTGCCAGG | ACGACCGGGT | CCTTCTTGG | ATCAACCCGC | TCAATGCCTG |
| GAGATTTGGG | CGTGCCCCCG | CAAGACTGCT | AGCCGAGTAG | TGTTGGGTCC |
| CGAAAGGCCT | TGTGGTACTG | <u>CCTGATAGGG</u> | <u>TGCTTGCGAG</u> | TGCCCCGGGA |
| | | KY78 | | |
| GGTCTCGTAG | ACCGTGCACC | ATGAGCACGA | ATCCTAAACC | TCAAAGAAAA |
| ACCAAACGTA | ACACCAACCG | TCGCCCACAG | GACGTCAAGT | TCCCGGGTGG |
| CGGTCAATC | | | | |

References

1. Young, K, Resnick, R, Myers, T. Detection of hepatitis C virus RNA by a combined reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *J. Clin. Microbiol.* 31:882-886. 1993.
2. Pasloske BL, WalkerPeach CR, Obermoeller RD, Winkler M, DuBois DB. Armored RNA technology for production of ribonuclease-resistant viral RNA controls and standards. *J. Clin. Microbiol.* 36: 3590-3594. 1998.
3. WalkerPeach CR, Winkler M, DuBois DB, Pasloske BL. Ribonuclease-resistant RNA controls (Armored RNA) for reverse transcription-PCR, branched DNA and genotyping assays for hepatitis C virus. *Clin. Chem.* 45: 2079-2085. 1999.

Armored RNA® is a technology developed jointly by Ambion, Inc. and Cenetron Diagnostics, LLC (US patents #5,677,124, #5,919,625, #5,939,262, #6,214,982, and #6,399,307). Armored RNA® is a registered trademark of Ambion and Cenetron Diagnostics. For Research Use Only. Not For Use in Diagnostic Procedures.



**Armored RNA®
Hepatitis C Virus (Genotype 1b)**

Catalog #: 42006

Suggested Use

- Daily controls for RNA extraction, amplification, and detection
- Calibrating controls, proficiency samples, or new assay development

Packaged HCV-1b Sequence from the 5'UTR region

The Roche Amplicor® HCV Monitor® primer binding regions (KY80/KY78) are underlined (see below). The PCR product generated is 244 basepairs (Young, 1993).

| | | | | |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------------|
| GACCTCCACC | ATAGATCACT | CCCCTGTGAG | GACTACTGT | <u>CTTCACG<u>CAG</u></u> |
| <u>AAAGCGTCTA</u> | <u>GCCATGGCGT</u> | TAGTATGAGT | GTCGTGCAGC | CTCCAGGACC |
| | KY80 | | | |
| CCCCCTCCCG | GGAGAGCCAT | AGTGGTCTGC | GGAACCGGTG | AGTACACCGG |
| AATTGCCAGG | ACGACCGGGT | CCTTCTTGG | ATCAACCCGC | TCAATGCCTG |
| GAGATTTGGG | CGTGCCCCCG | CGAGACTGCT | AGCCGAGTAG | TGTTGGGTCTG |
| CGAAAGGCCT | <u>TGTGGTACTG</u> | <u>CCTGATAGGG</u> | <u>TGCTTGCGAG</u> | TGCCCCGGGA |
| | | KY78 | | |
| GGTCTCGTAG | ACCGTGCACC | ATGAGCACGA | ATCCTAAACC | TCAAAGAAAA |
| ACCAAACGTA | ACACCAACCG | CCGCCACAG | GACGTCAAGT | TCCCGGGCGT |
| TGTTCAGATC | | | | |

References

1. Young, K, Resnick, R, Myers, T. Detection of hepatitis C virus RNA by a combined reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *J. Clin. Microbiol.* 31:882-886. 1993.
2. Pasloske BL, WalkerPeach CR, Obermoeller RD, Winkler M, DuBois DB. Armored RNA technology for production of ribonuclease-resistant viral RNA controls and standards. *J. Clin. Microbiol.* 36: 3590-3594. 1998.
3. WalkerPeach CR, Winkler M, DuBois DB, Pasloske BL. Ribonuclease-resistant RNA controls (Armored RNA) for reverse transcription-PCR, branched DNA and genotyping assays for hepatitis C virus. *Clin. Chem.* 45: 2079-2085. 1999.

Armored RNA® is a technology developed jointly by Ambion, Inc. and Cenetron Diagnostics, LLC (US patents #5,677,124, #5,919,625, #5,939,262, #6,214,982, and #6,399,307). Armored RNA® is a registered trademark of Ambion and Cenetron Diagnostics. For Research Use Only. Not For Use in Diagnostic Procedures.



Armored RNA Hepatitis C Virus (Genotype 2a/c)

Catalog #: 42008

Suggested Use

- Daily controls for RNA extraction, amplification, and detection
- Calibrating controls, proficiency samples, or new assay development

Packaged HCV-2a/c Sequence from the 5'UTR region

The Roche Amplicor® HCV Monitor® primer binding regions (KY80/KY78) are underlined (see below). The PCR product generated is 244 basepairs (Young, 1993).

```
GACCTCCGCC  ATGAACACTC  CCCTGTGAGG  AACTACTGTC  TTCACGCAGA
AAGCGTCTAG  CCATGGCGTT  AGTATGAGTG  TCGTACAGCC  TCCAGGCCCC
  KY80
CCCCCCCCGG  GAGAGCCATA  GTGGTCTGCG  GAACCGGTGA  GTACACCGGA
ATTGCCGGGA  AGACTGGGTC  CTTTCTTGGA  TAAACCCACT  CTATGCCCGG
CCATTTGGGC  GTGCCCCCGC  AAGACTGCTA  GCCGAGTAGC  GTTGGGTTGC
GAAAGGCCTT  GTGGTACTGC  CTGATAGGGT  GCTTGCAGT  ACCCCGGGAG
  KY78
GTCTCGTAGA  CCGTGCAACA  TGAGCACAAA  TCCTAAACCT  CAAAGAAAAA
CCAAAAGAAA  CACAAACCGT  CGCCCACAAG  ACGTTAAGTT  TCCGGGCGGC
GGCCAGATC
```

References

1. Young, K, Resnick, R, Myers, T. Detection of hepatitis C virus RNA by a combined reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *J. Clin. Microbiol.* **31**:882-886. 1993.
2. Pasloske BL, WalkerPeach CR, Obermoeller RD, Winkler M, DuBois DB. Armored RNA technology for production of ribonuclease-resistant viral RNA controls and standards. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 3590-3594. 1998.
3. WalkerPeach CR, Winkler M, DuBois DB, Pasloske BL. Ribonuclease-resistant RNA controls (Armored RNA) for reverse transcription-PCR, branched DNA and genotyping assays for hepatitis C virus. *Clin. Chem.* **45**: 2079-2085. 1999.

Armored RNA® is a technology developed jointly by Ambion, Inc. and Cenetron Diagnostics, LLC (US patents #5,677,124, #5,919,625, #5,939,262, #6,214,982, and #6,399,307). Armored RNA® is a registered trademark of Ambion and Cenetron Diagnostics. Amplicor® and Monitor® are registered trademarks of Roche Molecular Systems. For Research Use Only. Not For Use in Diagnostic Procedures.



Armored RNA® Hepatitis C Virus (Genotype 2b)

Catalog #:

- 42010 Hepatitis C Virus (Genotype 2b)
- 42011 Amplicor® HCV Monitor® Qualified Positive Control

Suggested Use

- Daily controls for RNA extraction, amplification, and detection
- Calibrating controls, proficiency samples, or new assay development

Packaged HCV-2b Sequence from the 5'UTR region

The Roche Amplicor® HCV Monitor® primer binding regions (KY80/KY78) are underlined (see below). The PCR product generated is 244 basepairs (Young, 1993).

| | | | | |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| GACACTCCGC | CATGAATCAC | TCCCCTGTGA | GGAACTACTG | <u>TCITCACGCA</u> |
| <u>GAAAGCGTCT</u> | <u>AGCCATGGCG</u> | TTAGTATGAG | TGTCGTACAG | CCTCCAGGCC |
| | KY80 | | | |
| CCCCCCTCCC | GGGAGAGCCA | TAGTGGTCTG | CGGAACCGGT | GAGTACACCG |
| GAATTCCCGG | AAAGACTGGG | TCCTTTCTTG | GATAAACCCA | CTCTATGTCC |
| GGTCATTTGG | GCGTGCCCCC | GCAAGACTGC | TAGCCGAGTA | GCGTTGGGTT |
| GCGAAAGGCC | <u>TTGTGGTACT</u> | <u>GCCTGATAGG</u> | <u>GTGCTTGCGA</u> | <u>GTACGTAGGG</u> |
| | | KY78 | | |
| AGGTCTCGTA | GACCGTGCCA | TCCATGAGCA | CCAAATCCTA | AACCTCAAAG |
| AAAAACCAAA | AGAAACACAA | ACCGCCGCCC | ACAGGACGTT | AAGTTCCCGG |
| GTGGCGGTCA | GATC | | | |

References

1. Young, K, Resnick, R, Myers, T. Detection of hepatitis C virus RNA by a combined reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *J. Clin. Microbiol.* 31:882-886. 1993.
2. Pasloske BL, WalkerPeach CR, Obermoeller RD, Winkler M, DuBois DB. Armored RNA technology for production of ribonuclease-resistant viral RNA controls and standards. *J. Clin. Microbiol.* 36: 3590-3594. 1998.
3. WalkerPeach CR, Winkler M, DuBois DB, Pasloske BL. Ribonuclease-resistant RNA controls (Armored RNA) for reverse transcription-PCR, branched DNA and genotyping assays for hepatitis C virus. *Clin. Chem.* 45: 2079-2085. 1999.

Armored RNA® is a technology developed jointly by Ambion, Inc. and Cenetron Diagnostics, LLC (US patents #5,677,124, #5,919,625, #5,939,262, #6,214,982, and #6,399,307). Armored RNA® is a registered trademark of Ambion and Cenetron Diagnostics. Amplicor® and Monitor® are registered trademarks of Roche Molecular Systems. For Research Use Only. Not For Use in Diagnostic Procedures.



Armored RNA Hepatitis C Virus (Genotype 3a)

Catalog #: 42012

Suggested Use

- Daily controls for RNA extraction, amplification, and detection
- Calibrating controls, proficiency samples, or new assay development

Packaged HCV-3a Sequence from the 5'UTR region

The Roche Amplicor® HCV Monitor® primer binding regions (KY80/KY78) are underlined (see below). The PCR product generated is 244 basepairs (Young, 1993).

| | | | | |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------|
| GACATCCACC | ATGGATCACT | CCCCTGTGAG | GAACTTCTGT | CTTCACGCAG |
| <u>AAAGCGTCTA</u> | <u>GCCATGGCGT</u> | TAGTACGAGT | GTCGTGCAGC | CTCCAGGACC |
| | KY80 | | | |
| CCCCCTCCCG | GGAGAGCCAT | AGTGGTCTGC | GGAAACCGGTG | AGTACACCGG |
| AATCGCTGGG | GTGACCGGGT | CCTTTCTTGG | AGCAACCCGC | TCAATACCCA |
| GAAATTTGGG | CGTGCCCCCG | CGAGATCACT | AGCCGAGTAG | TGTTGGGTCTG |
| CGAAAGGCCT | <u>TGTGGTACTG</u> | <u>CCTGATAGGG</u> | <u>TGCTTGCGAG</u> | TGCCCCGGGA |
| | KY78 | | | |
| GGTCTCGTAG | ACCGTGCAAC | ATGAGCACAC | TTCCTAAACC | TCAAAGAAAA |
| ACCAAAGAA | ACACCATCCG | TCGCCACAG | GACGTCAAGT | TCCCGGGTGG |
| CGGACAGATC | | | | |

References

1. Young, K, Resnick, R, Myers, T. Detection of hepatitis C virus RNA by a combined reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *J. Clin. Microbiol.* 31:882-886. 1993.
2. Pasloske BL, WalkerPeach CR, Obermoeller RD, Winkler M, DuBois DB. Armored RNA technology for production of ribonuclease-resistant viral RNA controls and standards. *J. Clin. Microbiol.* 36: 3590-3594. 1998.
3. WalkerPeach CR, Winkler M, DuBois DB, Pasloske BL. Ribonuclease-resistant RNA controls (Armored RNA) for reverse transcription-PCR, branched DNA and genotyping assays for hepatitis C virus. *Clin. Chem.* 45: 2079-2085. 1999.

Armored RNA® is a technology developed jointly by Ambion, Inc. and Cenepron Diagnostics, LLC (US patents #5,677,124, #5,919,625, #5,939,262, #6,214,982, and #6,399,307). Armored RNA® is a registered trademark of Ambion and Cenepron Diagnostics. Amplicor® and Monitor® are registered trademarks of Roche Molecular Systems. For Research Use Only. Not For Use in Diagnostic Procedures.