

# Bioquímia

Volumen 29  
Volume 29

Número 1  
Number 1

Enero-Marzo 2004  
January-March 2004

*Artículo:*

Clonación de una secuencia representativa de la región no traducible 5' (5'-UTR) del virus de la hepatitis C

Derechos reservados, Copyright © 2004:  
Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica, AC

Otras secciones de este sitio:

- ☞ Índice de este número
- ☞ Más revistas
- ☞ Búsqueda

*Others sections in this web site:*

- ☞ *Contents of this number*
- ☞ *More journals*
- ☞ *Search*



# Clonación de una secuencia representativa de la región no traducible 5' (5'-UTR) del virus de la hepatitis C

Juan Navarrete-Castro,\* María de la Luz Martínez-Rodríguez,\*\*  
 Nanancy Siria-Torreblanca,\*\*\* Gloria María Calderón-Rodríguez\*\*\*\*

## RESUMEN

El uso de técnicas moleculares como pruebas diagnósticas se hace imprescindible en nuestros días. Para poder tener un control positivo adecuado en la prueba cualitativa de RT-PCR para la detección del virus de la hepatitis C (VHC) se clonó una secuencia representativa de la región altamente conservada no traducible 5' (5'-UTR) del virus de la hepatitis C (VHC). Se seleccionó un paciente positivo al VHC por las pruebas diagnósticas de HCV EIA 3.0 y RIBA HCV 3.0 y con carga viral > 90,000 copias de ARN/mL. Para la clonación de la secuencia representativa de la región estudiada se obtuvo inicialmente ARNviral (ARNv) del VHC a partir del plasma del paciente seleccionado, utilizándose la técnica de transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada, se utilizaron iniciadores específicos de la región, el KY-80 y KY-78/FIP y RIP obteniéndose un producto de ADN de 214 pb (ADN*i*) el cual se insertó en el vector de clonación pGem-T, con el que se construyó el plásmido recombinante pGem-T-5'-UTR, el cual fue transformado en células de *E. coli* DH5 $\alpha$  obteniéndose la línea celular *E. coli* DH5 $\alpha$  pGem-T-5'-UTR como células clonas. A partir de las células clonas se obtuvo ADN (ADN*p*) del cual se amplificó la región 5'-UTR por PCR utilizándose los iniciadores FIP y RIP, obteniéndose un producto de 214 pb el cual mostró ser eficiente como control positivo en la prueba del VHC por RT-PCR.

**Palabras clave:** Región no traducible 5' (5'-UTR), virus de la hepatitis C (VHC), transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), clonación.

## ABSTRACT

*Molecular assays for diagnosis tests are widespread and essential in these days. Cloning of the representative sequence of the hepatitis C virus (HCV) 5' untranslated region (5'-UTR) a highly conserved region, was carried out to be used as a positive control in the HCV detection by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). We selected a patient with anti-HCV antibodies by HCV EIA 3.0 and RIBA HCV 3.0 and a viral load > 90,000 copies of viral genome/mL. Standard recombinant DNA technologies were used for all cloning procedures. First, we obtained viral RNA (RNA*v*) from the patient infected plasma. The RNA*v* was used to obtain a DNA product (DNA*i*) of 214 pb by a reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) and nested PCR reactions, these assays were development using conserved primers (KY-80 and KY-78/FIP and RIP) deduced from the 5'-UTR region of the HCV. DNA*i* was used for the plasmid construction pGem-T-5'-UTR which was transformed into *E. coli* DH5 $\alpha$  cells to obtain the *E. coli* DH5 $\alpha$ -pGem-T-5'-UTR cellular lines. 5'-UTR fragment was amplified by PCR using the initiators FIP and RIP from stable cell clones to obtain the 5'-UTR product of 214 pb. This product appears to be a good positive control in the RT-PCR detection assay for HCV.*

**Key words:** 5' untranslated region (5'-UTR), hepatitis C virus (HCV), reverse transcriptase PCR (RT-PCR), cloning.

\* Químico Biólogo Parasitólogo. Universidad Autónoma de Guerrero. Unidad de Investigación en Inmunología e Infectología del Centro Médico Nacional “La Raza”. IMSS.

\*\* Maestra en Ciencias. Unidad de Investigación en Inmunología e Infectología del Centro Médico Nacional “La Raza”. IMSS.

\*\*\* Químico Farmacéutico Biólogo.

Únidad de Investigación en Inmunología e Infectología del Centro Médico Nacional “La Raza”. IMSS.

\*\*\*\* Doctora en Ciencias Biomédicas.

Únidad de Investigación en Inmunología e Infectología del Centro Médico Nacional “La Raza”. IMSS.

### Correspondencia:

Dra. Gloria Ma. Calderón Rodríguez

Unidad de Investigación en Inmunología e Infectología. 2º Piso Hospital de Infectología. Centro Médico Nacional “La Raza”, Av. Jacarandas s/n Col. La Raza, México, D.F. C.P. 02990. E-mail: gmcr@servidor.unam.mx

Recibido: 09-09-2003

Aceptado: 15-03-2004

## INTRODUCCIÓN

La hepatitis por virus C es un problema de salud pública de importancia global, se ha reportado que existen aproximadamente 170 millones de portadores en el mundo.<sup>1-4</sup> La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) se caracteriza por evolucionar hacia la cronicidad, con una progresión lenta que afecta principalmente al hígado con un curso subclínico-silencioso, que a partir de estados agudos evoluciona hacia cirrosis y carcinoma hepatocelular.<sup>5</sup> Uno de los principales problemas relacionados con esta patología es el diagnóstico, ya que aunque se cuenta con pruebas para su detección, existen controversias en cuanto a las pruebas confirmatorias, existiendo un difícil diagnóstico oportuno de la enfermedad.<sup>6,7</sup> Entre las pruebas diagnósticas utilizadas para la detección del VHC, tenemos: a) Las pruebas primarias: como los ensayos serológicos de escrutinio para la detección de anticuerpos del VHC mediante ensayos inmunoenzimáticos como el HCV EIA 3.0 y b) las pruebas complementarias o confirmatorias, como el RIBA HCV 3.0 SIA (Strip Immunoblot Assay) para la detección específica de ciertas proteínas virales por anticuerpos específicos, así como ensayos moleculares que detectan regiones genómicas específicas del VHC.<sup>6-11</sup> Entre los ensayos moleculares existen las pruebas cualitativas y cuantitativas, las primeras sirven principalmente como pruebas diagnósticas, mientras que las pruebas cuantitativas que detectan la carga viral, son utilizadas principalmente para monitorizar la evolución del enfermo y su respuesta al tratamiento.<sup>12,13</sup>

Debido a la carencia de controles positivos se decidió realizar la clonación de la región altamente conservada 5'-UTR del VHC utilizando las técnicas convencionalmente descritas para ello;<sup>14-18</sup> ya que esta región resulta representativa y muestra muy poca variación génica. La utilidad de estas regiones es importante, ya que por sus características pueden ser usadas como un control positivo en pruebas diagnósticas, como la prueba para la detección por transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) del VHC.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Extracción de ARN viral del VHC

El ARN viral (ARNv) se extrajo de una muestra de plasma obtenida a partir de 10 mL de sangre total obtenida de un paciente positivo al VHC del Hospital de Infectología del Centro Médico Nacional “La

Raza”, diagnosticado por la prueba HCV EIA 3.0 (Abbott, Inc.) y confirmado por RIBA HCV 3.0 SIA (Chiron Co.), con una carga viral reportada de 91,569 copias/mL y genotipo 1a. Se guardó en alícuotas congelando a -70°C, utilizándose el miniequipo RNA viral de QIAamp (Quiagen, Co.) de acuerdo a las indicaciones del proveedor. El ARNv obtenido también se almacenó a -70°C.

### Transcripción inversa (RT)

A partir del ARNv se realizó una reacción de transcripción inversa en un volumen total de mezcla de reacción de 20 μL, con 7.5 μL de ARN extraído, 1 mM de desoxirribonucleótidos (dNTPs), 1X de amortiguador transcriptasa inversa AMV (Roche), 1X de hexámeros (Roche), 2 U de inhibidor de ARNsas, 1.25 U de enzima transcriptasa inversa AMV (Roche). Las reacciones se procesaron en un termociclador (Amplitron II Thermoline) bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo de 70°C por 10 min, seguido de otro a 42°C durante 90 min y por último, uno a 92°C por 5 min obteniéndose el ADN complementario (ADNc).

### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) inicial

Para la síntesis del producto de 244 pb de la región 5'-UTR del VHC se utilizó el ADNc obtenido con la RT y se corrió una PCR inicial con los iniciadores KY80-5'-GCAGAACGCTCTAGCCATGG-3' y KY78'-5'CTCG-CAAGCACCTATCAGGC-3' ya reportados.<sup>15</sup> Para esta amplificación se utilizó un volumen total de mezcla de reacción de 50 μL, con 10 μL de ADNc, 1X de amortiguador de Taq polimerasa, 1.92 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de dNTPs, 1 pmol de cada iniciador, 1 U de Taq polimerasa (Roche) y se procesaron bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo a 95°C por 3 min, 35 ciclos de 95°C por 15 seg, 55°C por 1 min, 72°C por 1 min y por último 1 ciclo a 72°C por 8 min. El producto de PCR se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%.

### PCR anidada

El producto obtenido en la primera PCR (244 pb) se utilizó para obtener, mediante una PCR anidada, un ADN inserto (ADNi) de 214 pb. Los iniciadores utilizados en la reacción fueron el FIP-5'-TCTAGCCATGGCG-TTAGTA-3' y RIP-5' CAGTACCACAAGGCCTTC -3'.<sup>14</sup> Para esta amplificación se utilizó un volumen total de mezcla de reacción de 50 μL; empleando 2 μL de muestra de la PCR inicial, 0.8X de amortiguador para

Taq polimerasa, 1mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de dNTPs, 2.5 U de Taq polimerasa, (Roche), 2 pmol de iniciadores FIP y RIP; y se procesaron bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo de 95°C por 3 min, 35 ciclos de 95°C por 15 seg, 55°C por 1 min, 72°C por 1 min, y por último 1 ciclo a 72°C por 8 min. El producto de PCR obtenido, ADNi de 214 pb, se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% y posteriormente se purificó el fragmento de ADN obtenido del gel de agarosa mediante el equipo comercial QIAquick Gel Extraction (Quiagen Co).

### **Construcción del plásmido recombinante pGem-T+ 5'-UTR.**

Para la construcción del plásmido recombinante pGem-T+ 5'-UTR, se utilizó el vector pGem-T (Promega) con un tamaño de 3,000 pb y la secuencia 5'-UTR (ADNi) con un tamaño de 214 pb obteniéndose un producto de 3,214 pb mediante ligación, en la cual se utilizó una mezcla de reacción con el ADNi, pGem-T, amortiguador, 10X de enzima T4 ADN ligasa.

### **Preparación de células electrocompetentes y competentes de *E. coli* DH 5α.**

Las células electrocompetentes y competentes fueron preparadas de acuerdo al método descrito por Hanahan (1983),<sup>18</sup> se hicieron alícuotas de 200 μL de las células competentes y se preservaron a -70°C.

### **Transformación**

La transformación se realizó mediante dos técnicas electroporación (electrotransformación) y transformación por choque térmico.

La electrotransformación se efectuó con un volumen de 10 μL de ADN del producto de PCR para un volumen de 200 μL de células electrocompetentes. La mezcla se sometió a un alto voltaje durante 5 min, adicionándose posteriormente 1 mL de medio SOC (Bacto triptone, Bacto extracto de levadura, NaCl, Glucosa) (Difco) y se incubó a 37°C, en agitación a 225 rpm por 1 h 30 min, al mismo tiempo se prepararon placas de Petri de agar infusión cerebro-corazón (BHI) (BHI/amp./X-Gal/IPTG) con ampicilina a una concentración de 2 μg/mL, al que se le añadieron 40 μL de un cromógeno acoplado a Gal (X-Gal) en una concentración de 20 mg/mL y 4 μL del inductor IPTG a una concentración de 200 mg/mL. Posteriormente se adicionaron 100 μL de células sometidas a electroporación en una placa y se espatuló en toda la super-

ficie del agar. Simultáneamente, las bacterias electroporadas se centrifugaron a 3,000 rpm por 1 min y se sembraron en las condiciones antes mencionadas, incubando las placas a 37°C por 20 h. Las células transformantes presentaron una coloración blanca y las no transformantes una coloración azul.<sup>18</sup>

La transformación por choque térmico se realizó añadiendo un volumen de 10 μL del producto de PCR de 214 pb puro con 200 μL de células competentes, se mezclaron suavemente e incubaron en un baño de hielo durante 30 min. Inmediatamente se colocaron en un baño María a 42°C por 50 seg, seguido de un cambio inmediato a un baño de hielo durante 5 min. Posteriormente se adicionó 1 mL de medio SOC, se mezcló suavemente e incubó a 37°C con una agitación de 225 rpm durante 1 hora 30 min y se sembraron en las mismas condiciones que en el caso de la electroporación.

El aislamiento del ADN plasmídico (ADNp) se realizó a partir de un cultivo de bacterias transformantes en medio líquido BHI-ampicilina mediante el equipo comercial Midi/Maxi/ Plasmid/Cosmid Purification de QIAmp (Quiagen), siguiendo el protocolo descrito por el proveedor, obteniéndose el ADNp recombinante, el cual fue analizado mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%.

### **Digestión del ADNp recombinante con la enzima de restricción NheI**

Para la confirmación de las clonas *E. coli* DH5α + pGem-T+ UTR 5'-VHC, se realizó una digestión con la enzima de restricción NheI, enzima que reconoce un sitio de restricción específico de la secuencia representativa de la UTR 5'-VHC. El plásmido recombinante quedó linearizado (digerido) y verificamos el tamaño molecular esperado de 3,214 pb. La digestión se efectuó en un volumen de mezcla de reacción total de 10 μL, conteniendo: 5 μL del ADNp recombinante, 1X de amortiguador para la enzima HheI (M), 1X de albúmina sérica bovina (BSA), 10 U de enzima NheI, se incubó a 37°C por 2 h. El ADNp recombinante digerido fue analizado por electroforesis en geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio.

### **Comprobación de la obtención de la línea celular *E. coli* DH5α + pGem-T + UTR5'-VHC**

Se amplificó por PCR la secuencia clonada UTR 5'-VHC utilizando los iniciadores FIP y RIP y como plantilla el ADNp recombinante extraído de las células clonas. Esta amplificación se realizó en un volu-

men total de mezcla de reacción de 50  $\mu$ L; utilizando 5  $\mu$ L de muestra de ADNp recombinante extraído, 0.8X de amortiguador 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de dNTPs, 2.5 U de enzima Taq polimerasa, 2 pmol de iniciadores FIP y RIP con el programa descrito para la PCR anidada. Posteriormente el producto de PCR fue analizado mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% con bromuro de etidio.

#### **Verificación del producto clonado UTR 5'-VHC como control positivo en la RT-PCR cualitativa para el diagnóstico del VHC**

Para verificar que la secuencia clonada de ADN de 214 pb de la 5'-UTR del VHC funciona como control positivo en la prueba de RT-PCR cualitativa para el diagnóstico de VHC, se seleccionaron dos muestras de pacientes positivos al VHC diagnosticados y confirmados mediante las pruebas de EIA y RIBA III y una muestra de un paciente sano no infectado con HCV que funcionó como testigo negativo. Se realizó el aislamiento del ARNv, la RT-PCR y PCR anidada utilizando los iniciadores KY80 y KY78 y FIP y RIP,

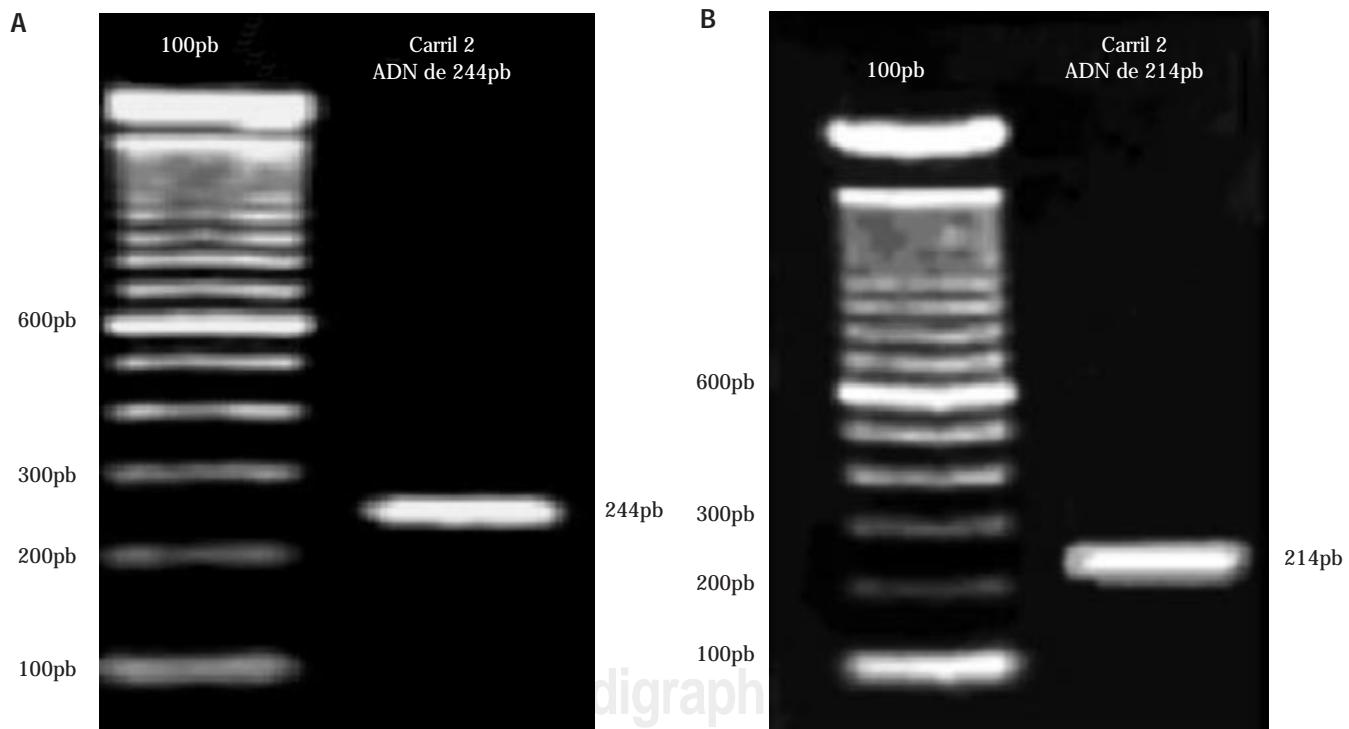
respectivamente. Los productos de ADN de 214 pb obtenidos de las muestras positivas y negativa junto con el testigo negativo al VHC fueron analizadas mediante un corrimiento de electroforesis en geles de agarosa al 2%.

## **RESULTADOS**

El vector plasmídico pGem-T tiene un tamaño de 3,000 pb al cual se le insertó un fragmento de 214 pb para construir el plásmido recombinante con un tamaño de 3,214 pb; obteniéndose bacterias recombinantes que contienen ADN plasmídico-recombinante de la región 5'-UTR del VHC.

#### **PCR inicial y anidada**

Se obtuvo un producto de 244 pb de la RT-PCR inicial, utilizando los iniciadores KY80 y KY78, posteriormente con los iniciadores FIP y RIP se obtuvo el producto correspondiente al ADN inserto de 214 pb (*Figura 1*), que se purificó y utilizó para la construcción del plásmido recombinante *pGem-T+ 5'-UTR*.



**Figura 1.** PCR Inicial y PCR anidada. **A:** Análisis electroforético del producto de 244 pb de la PCR inicial, en el carril 1 el marcador de pesos moleculares de 100 pb; el carril 2 el producto amplificado. **B:** Electroforesis del producto amplificado de 214 pb resultado de que corresponde al ADN inserto utilizado en la clonación. El carril 1 muestra el marcador de 100 pb y en el carril 2 se muestra el producto amplificado del ADN inserto.

## Aislamiento de ADN plasmídico a partir de las células clonas

De las células transformantes se aisló el ADN plasmídico con un tamaño de 3,214 pb que se digirió con la enzima de restricción NheI (*Figura 2*). La clonación del ADN inserto se comprobó al amplificar la secuencia representativa 5'-UTR del VHC por PCR utilizando como molde el ADN plasmídico y los iniciadores FIP y RIP a partir de las células clonas.

## Confirmación del producto de la clonación como control positivo

Se verificó que el producto de la clonación funcionara como control positivo en la detección del VHC mediante RT-PCR utilizando los iniciadores KY80 y KY78, el FIP y RIP analizándose el ARNv obtenido de tres plasmas positivos al VHC, de un plasma negativo y el producto clonado como control positivo (*Figura 3*).

## DISCUSIÓN

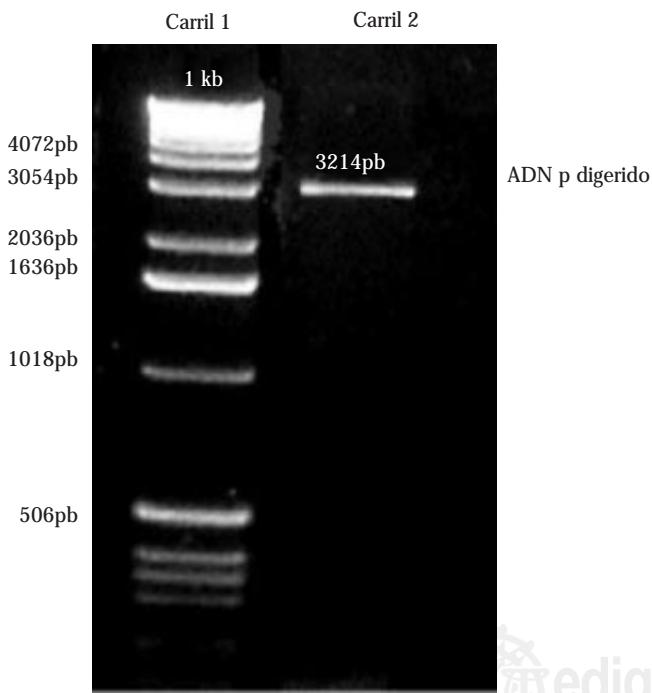
El análisis y estudio del virus de la hepatitis C es muy importante debido al incremento del número de

casos en el mundo. Actualmente, los métodos diagnósticos principalmente inmunológicos utilizados para la detección del VHC no son del todo confiables, debido principalmente a la variabilidad de la respuesta inmune del paciente, a la carga viral de cada paciente o al mismo virus, por lo que es necesario tener un método de detección que nos permita reconocerlo.<sup>7,19,20</sup> Actualmente, existe una clara ventaja al poder utilizarse métodos moleculares que permiten un diagnóstico más acertado.<sup>21,22</sup>

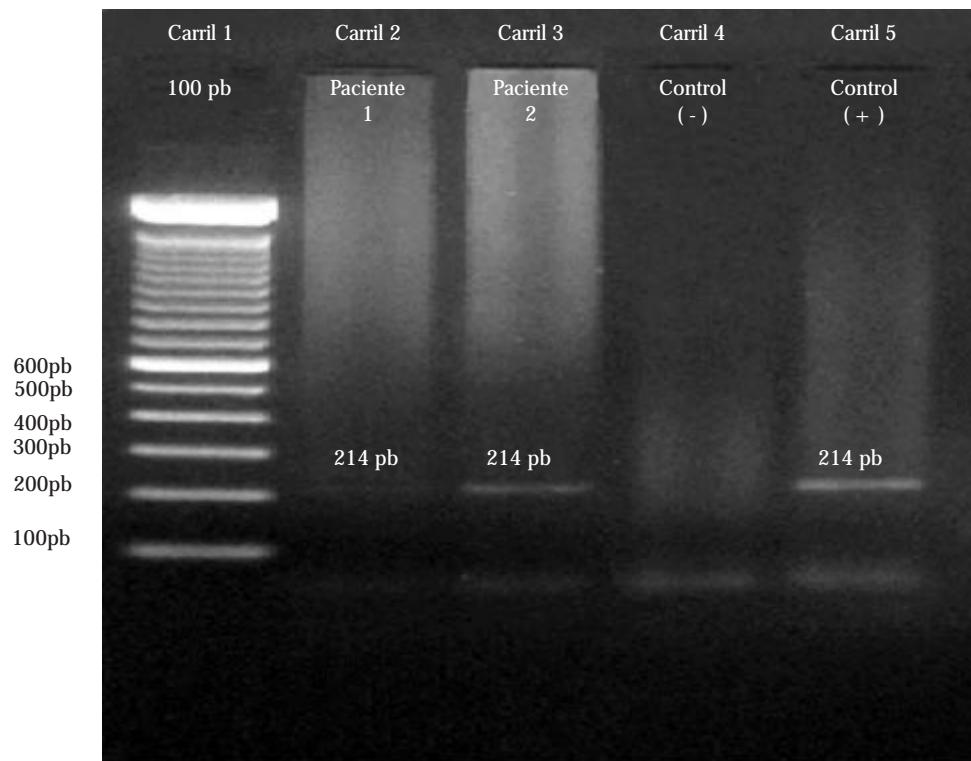
Debido a que el VHC es un virus no cultivable, es conveniente utilizar métodos como la RT-PCR para su detección (PCR cualitativa) y en el caso del desarrollo de pruebas caseras es muy importante además contar con los respectivos controles. Debido a que en nuestro laboratorio se desarrolló una prueba de detección casera para el diagnóstico del VHC, se escogió el método de clonación para obtener un fragmento de la región altamente conservada 5'-UTR del VHC que nos sirviera como control positivo en la prueba cualitativa. Por lo tanto, para la selección de la muestra utilizada para la clonación, se escogió un paciente positivo por las pruebas serológicas convencionales, con una carga viral alta conocida y con genotipo 1a, (utilizándose en estas dos detecciones pruebas moleculares) lo que nos garantizó la positividad de la muestra.

El VHC, cuenta con regiones altamente conservadas, regiones variables y regiones hipervariables,<sup>23</sup> por lo que nosotros escogimos a las altamente conservadas para la clonación debido principalmente a su poca variabilidad genética. Como se ha detallado, se utilizaron las secuencias de los iniciadores específicos de la región 5'-UTR del VHC, el KY80 y KY78, el FIP y RIP que amplifican un producto final de 214 pb dentro de la 5'-UTR del VHC y que son utilizados en los ensayos moleculares de Amplicor Roche para la detección cualitativa del VHC de forma comercial y los resultados que obtuvimos fueron concordantes con lo anteriormente reportado.<sup>21,24</sup>

Para lograr la amplificación de la secuencia representativa de 214 pb de la 5'-UTR del VHC, es muy importante la optimización de las condiciones de amplificación como son: temperatura de alineamiento de entre 55°C a 62°C y la concentración de reactivos. Para la construcción del plásmido recombinante utilizamos el plásmido vector *pGem-T* (*pGem-T+5'UTR*) por presentar ventajas que facilitan la especificidad en la clonación, principalmente la linearidad del plásmido con extremos cohesivos de timina terminales, la presencia del gen "amp" que induce resistencia a la ampicilina en las células transformantes y el gen "lac Z" al interactuar por  $\alpha$ -complementación con el in-



**Figura 2.** Digestión del ADNp con Nhe I. Confirmación del ADNp de las células clonas que contiene la secuencia representativa de la región conservada 5'-UTR del VHC. Carril 1 marcador de 1 kb; carril 2 producto de 3,214 pb de la digestión del ADNp con Nhe I.



**Figura 3.** Ensayo confirmatorio de RT-PCR. Para detectar VHC. Carril 1 muestra el marcador de pesos moleculares de 100p; carril 2 y 3 muestras positivas al VHC, carril 4 se observa el control negativo y en el carril 5 se observa el control positivo producto de 214 pb (resultado de la clonación) amplificado a partir del ADN plasmídico de las células clonas.

ductor X-gal y el cromógeno IPTG, lo cual nos permite diferenciar las clonas transformadas de las no transformadas mediante la coloración desarrollada; así mismo, presenta una gran variedad de sitios de acción para diversas enzimas de restricción que flanquean el sitio policlonal facilitando de esta forma el poder desinsertar el producto clonado, en este caso la 5'-UTR del VHC.

Gracias al desarrollo de técnicas moleculares se puede detectar de forma directa al agente patógeno, en este caso al VHC, lo que incrementa la posibilidad de tener un diagnóstico correcto. El método de RT-PCR para la detección del VHC, hace posible, por ejemplo, la detección del virus en pacientes con problemas concomitantes como la inmunosupresión, durante los períodos de ventana que preceden a la seroconversión, algo que no permiten los métodos serológicos comunes. Otras ventajas es que no se requieren grandes cantidades de muestra y su bajo costo comparada con algunas técnicas serológicas. Sin embargo, a pesar de sus ventajas también pueden encontrarse desventajas con los métodos de biología molecular, ya que se deben tomar en cuenta ciertos puntos como son: una adecuada toma de muestra y su procesamiento inmediato, para la obtención de suero o plasma, evitando la manipulación excesiva para no

activar las ARNsas que pueden degradar el ARN de la muestra, así como su conservación a -70°C. De esta manera se pueden evitar los resultados falsos negativos. Por otro lado también es conveniente el uso cuidadoso del material y equipo de laboratorio, ya que se deben evitar las contaminaciones que pueden dar resultados falsos positivos.

Finalmente, consideramos que el desarrollo de pruebas para el diagnóstico molecular de patologías infecciosas es muy importante, ya que como en el caso del VHC que llega a presentar dificultades en su diagnóstico, con los controles adecuados se puede contar con una prueba casera que a bajo precio apoya de forma satisfactoria al diagnóstico de esta patología.

## AGRADECIMIENTOS

La realización del presente estudio fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), apoyo 13508M.

## REFERENCIAS

- Pourcell R. The hepatitis C virus. Overview. *Hepatology* 1997; 26(Suppl 1):115-145.
- Stephen DR. *Virol hepatitis. Infectious diseases*. London: Mosby; 2000. p. 39.1-39.12.

3. Consenso Latinoamericano de hepatitis viral por virus C. Octubre 2000.
4. Ebeling F. Epidemiology of the hepatitis C virus. *Vox Sang* 1998; 74: 143-146.
5. Seeff LB. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36(Suppl 1): S35-46.
6. Richter SS. Laboratory assays for diagnosis and management of hepatitis C virus infection. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4407-12.
7. David RG. Diagnostic tests for hepatitis C. *Hepatology* 1997; 26(Suppl 1):43S-47S.
8. Hernández PRF, Frías SJA, Del Ángel GO. Seroprevalencia de anticuerpos contra el virus de la hepatitis C en donadores de sangre del Hospital Central Militar. *Salud Pública Mex* 1994; 36: 538-540.
9. Ramírez MJ, Cervantes BR, Zárate MF, et al. Hepatitis C virus antibodies in a Mexican population. *Pediat Infect J Dis* 1998; 17: 169-170.
10. Garson JA. The polymerase chain reaction and hepatitis C virus diagnosis. *FEMS Microbiol Rev* 1994; 14: 229-239.
11. Negro F, Giostra E, Krawczynki K, et al. Detection of intrahepatic hepatitis C virus replication by strand-specific semi-quantitative RT-PCR: preliminary application to the liver transplantation model. *J Hepatol* 1998; 29: 1-11.
12. Davis GL. Monitoring of viral levels during therapy of hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36(Suppl 1): S145-S151.
13. Berger A, Preiser W. Viral genome quantification as a tool for improving patient management: the example of HIV, HBV, HCV and CMV. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49: 713-721.
14. Major ME, Feinstone SM. The molecular virology of hepatitis C. *Hepatology* 1997; 25: 1527-1538.
15. Holland J, Bastian I, Ratcliff RM, Beers MY, Hahesy P, Harley H, Shaw DR, Higgins GD. Hepatitis C genotyping by direct sequencing of the product from the Roche AmpliCor test: methodology and application to a South Australian population. *Pathol* 1998; 30: 192-195.
16. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2a Ed. New York, USA: Cold Spring Harbor; 1989. p. 1.2-1.20.
17. Marcus L, Harnett J, Douglas R. The pGEM-T vector systems. Promega Corporation. *Promega Notes Magazine* 1996; 58: 36.
18. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 1983; 166: 557-580.
19. Muñoz ELE. Diagnosis of hepatitis C virus infection. *Rev Gastroenterol Mex* 2002; 67(Suppl 2): S29-35.
20. Wilber JC, Polito A. Serological and virological diagnostic tests for hepatitis C virus infection. *Semin Gastrointest Dis* 1995; 6(1): 13-19.
21. Nolte FS, Fried MW, Schiffman ML, Ferreira-Gonzalez A, Garrett CT, Schiff ER, Polyak SJ, Gretch DR. Prospective multicenter clinical evaluation of AMPLICOR and COBAS AMPLICOR hepatitis C virus tests. *J Clin Microbiol* 2001; 39(11): 4005-4012.
22. Schiff ER, de Medina M, Kahn RS. New perspectives in the diagnosis of hepatitis C. *Semin Liver Dis* 1999; 19(Suppl 1): 3-15.
23. Simmonds P. Viral heterogeneity of the hepatitis C virus. *J Hepatol* 1999; 31(Suppl 1): 54-60.
24. Young KK, Resnick RM, Myers TW. Detection of hepatitis C virus RNA by a combined reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *J Clin Microbiol* 1993; 31(4): 882-886.

