

## BM-5

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

García López Eduardo Stanlin, Rocha Minerva Mata, Vázquez Oviedo Ramón Alberto, Carpermor, S.A. Alfonso Herrera No. 75, Col. San Rafael, C.P. 06470, México, D. F, E-mail: eduardo.garcia@carpermor.com.mx

**Palabras clave:** Genotipo, virus de la hepatitis C, Secuenciación.

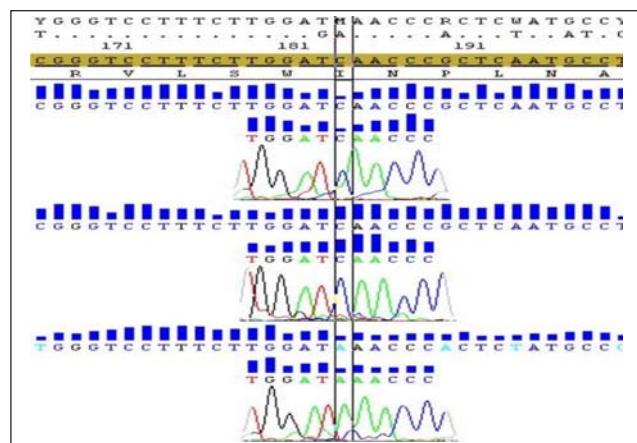
**Introducción:** La hepatitis C es la forma más común de hepatitis post-transfusional responsable de mayor al 70% de las enfermedades víricas del hígado, causada por el virus de la hepatitis C (VHC) que se transmite vía parenteral y productos contaminados por sangre.<sup>1</sup> El periodo de incubación oscila entre 2 y 26 semanas.<sup>2</sup> Pertenece a la familia *Flavivirus*, de un género separado: *Hepacivirus*. Es un virus envuelto con un tamaño de 30 a 60 nm de diámetro, su genoma es RNA de cadena sencilla con 9,600 nucleótidos, que codifica una proteína que oscila entre 3,037-3,8008 aminoácidos.<sup>3</sup> El VHC se ha estudiado genéticamente, siendo una de sus características la variabilidad genética: genotipos, subtipos y cuasiespecies. Esta variabilidad genética tiene importantes implicaciones tanto clínicas (patogenicidad, diagnóstico, resistencia al tratamiento) como epidemiológicas, de ahí la importancia de la determinación del genotipo. El método de referencia para la tipificación molecular del VHC es la secuenciación completa del genoma viral y su posterior análisis filogenético.

**Objetivo:** Determinar el genotipo del VHC empleando técnicas moleculares, así como el diseño de primers, estandarización y validación del método.

**Metodología:** *Diseños de primers:* Se realizó el alineamiento de las secuencias nucleotídicas de los diferentes genotipos del VHC específicamente de la región 5'UTR (Región no Traducible) con el software BioEdit y el diseño de los primers para la RT-PCR y la secuenciación empleando el programa Primer3Plus; su síntesis se solicitó con Applied Biosystems (AB). *Extracción de RNA viral:* Se realizó a partir del plasma de 10 pacientes, previamente genotipificadas en Specialty Laboratories y de los genotipos de ARMORED RNA® con el kit QIAamp UltraSens Virus (QIAGEN). *RT-PCR y secuenciación:* Se amplificó la región 5'UTR del VHC, se purificó el producto de amplificación a partir del gel de agarosa con el kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN) y se realizó la reacción de secuenciación con el kit BigDye® Terminator v1.1. Cycle Sequencing (AB). La secuenciación fue llevada a cabo por el equipo AB3130 Genetic Analyzer. Los resultados fueron alineados y analizados con el Software DNA Sequencing Analysis v5.1 y SeqScape® v2.5, tomando como secuencia de referencia la del genotipo 1a. *Validación de la prueba:* Se realizó la sensibilidad, especificidad analítica, linealidad de la prueba, precisión y exactitud.

**Resultados:** Con los primers diseñados se obtuvo un amplificado de 270 pb y una secuenciación de 240 pb. La especificidad encontrada fue solo para VHC. En cuanto a la sensibilidad del método, límite de detección y/o cuantificación fue de 500 UI/mL, y la linealidad encontrada fue mayor o igual a este valor. Con respecto a la precisión, fue repetible y reproducible en un 100%; en exactitud, las secuencias determinadas estándares de ARMORED RNA® correspondieron a las reportadas por el

mismo de acuerdo a cada genotipo, de igual manera las 10 muestras analizadas correspondieron con lo reportado por el laboratorio de referencia, es decir en un 100%. La figura 1 muestra algunas secuencias obtenidas junto con su genotipo, analizadas con SeqScape® v2.5.



**Figura 1.** Secuencias y electroferogramas que muestra uno de los cambios de bases en los diferentes genotipos. (1) Secuencia nucleotídica consenso; (2) Variantes de bases en cada genotipo; (3) Secuencia de Referencia; (4) Aminoácido codificado; 5) y (7) Secuencia correspondiente al genotipo 1a; (6) y (8) Electroferograma del genotipo 1a; (9) Secuencia correspondiente al genotipo 2b; (10) Electroferograma del genotipo 2b.

**Discusión:** Los resultados determinan que el método amplifica y secuencia específicamente VHC, de igual manera la sensibilidad, especificidad analítica, linealidad, precisión y exactitud son resultados aceptables, lo que nos indican un método específico y confiable para la determinación del genotipo del VHC. La figura 1 muestra la secuencia donde existe un cambio de base (C por A) con respecto a la de referencia, lo que corresponde a un genotipo 2b, sin embargo, cabe resaltar que este cambio es sólo uno de varios que son usados para tipificar un genotipo de otro.

**Conclusiones:** Se logró obtener un método confiable y específico para genotipificar el VHC por medio de secuenciación de ADN.

## REFERENCIAS

1. Gómez CI, Álvarez GM. Biología y métodos diagnósticos del virus de la hepatitis C. *Rev Biomed.* 2003; 14: 253-68.
2. Robbins S, Kumar V, Cotran R. Robbins. *Patología humana*. 7<sup>a</sup> ed. Madrid: Elsevier; 2004.
3. Herrerías JM, Diaz A, Jiménez M. *Tratado de hepatología*. Sevilla: Universidad de Sevilla; 1996.