



Hepatitis C Virus (HCV) detection and quantitation by real-time RT-PCR (SYBR green format).

Created: Aug 28, 2008; Last modified: Mar 23, 2021, Version: 2.0

El virus de la hepatitis C (HCV) es un pircornavirus pequeño entre 30 a 38 nm de tamaño con envoltura y una sola cadena de RNA de sentido positivo. Pertenece a la familia Flaviviridae y se replica principalmente en los hepatocitos causando la hepatitis C. Existe controversia sobre su capacidad para infectar a linfocitos o monocitos. Existen cinco genotipos distintos con variaciones geográficas. En Norte América predomina el genotipo 1a, seguido de 1b, 2a, 2b y 3a. En Europa predomina el genotipo 1b seguido de 2a, 2b, 2c y 3a. Los genotipos 4 y 5 se dan casi exclusivamente en África. El genotipo tiene importancia clínica ya que determina la respuesta potencial de la terapia basada en el interferón y la duración que va a requerir la misma. Los genotipos 1 y 4 responden menos a dicho tratamiento que los otros (genotipos 2, 3, 5 y 6).³ La duración de la terapia estándar basada en el interferón para los genotipos 1 y 4 es de 48 semanas, mientras que para los genotipos 2 y 3 es solo de 24 semanas. El HCV tiene una alta tasa de replicación produciendo aproximadamente un billón de nuevos virus al día en un individuo infectado. La carga viral plasmática de portadores asintomáticos con elevación de alanina transaminasa oscila entre 100/mL y 50'000,000/mL.

Oligonucleótidos

Nombre	Target	Secuencia	bp	%GC	Tm ^b	Posición	Amplicón	Ref
HCVrt-F	HCV	5'-gTC-TAg-CCA-Tgg-CgT-TAg-TAT-gAg-3'	24		56.9	77-100	226	1
HCVrt-R	HCV	5'-ACC-CTA-TCA-ggC-AgT-ACC-ACA-Ag-3'	23		58.4	280-302		

Componentes de RT

Componentes	Cf	1 rx (µl)	Programa
dH ₂ O	---	4.85	RT-1
10 mM dNTP's	250 µM	0.5	
10 µM oligos HCVrt	1.125 µM	2.25	
RNA	---	10	
Buffer 10x	1x	2	RT-2
Enzima RT		0.4	
	Vf	20	





Condiciones de RT

		Tiempo: 5 min		Desnaturalización	
		Temperatura	95°	4°	
RT-1	Tiempo	2 min	2 min		

		Tiempo: 1:10 hrs		Transcripción inversa		Enfriamiento	
		Temperatura	42°	95°	4°		
RT-2	Tiempo	60 min	5 min	5 min			

Componentes de PCR

Componentes	Cf	1 rx (µl)
dH ₂ O	---	6.2
2x iTaq SYBR green	1x	7.5
10 µM oligos HCVrt	200 nM	0.3
cDNA (dilución 1/10)	---	1
	Vf	15

Condiciones de PCR

		Tiempo: 2:10 hrs		Desnaturalización		Hibridización		Curva de disociación		
		Temperatura	95°	94°	62°	95°	60°	Set Ram time	95°	
ABI 7700	Tiempo	3 min	30 seg	30 seg	15 seg	20 min	19:59 min	15 seg		
	Colección de datos			✓			✓			
	X45 ciclos									

Notas

1. Limpíese el área de trabajo con NaOCl 0.1% y Etanol al 70% antes y después de preparar las PCR y preparanse las PCRs en charola de hielo o haciendo uso de los portatubos refrigerados.
2. Mezcle en vortex todos los reactivos excepto el DNA antes de preparar la mezcla madre (master mix) y nuevamente al terminar de preparar el master mix. Haga uso de la micropipeta más apropiada para cada rango de volumen a dispensar ¡Emplear las Rainin!





3. La preparación de la síntesis de cDNA debe realizarse en el cuarto de RNA. Cuando termina la síntesis de cDNA los tubos deben guardarse a -80°C hasta preparar la PCR tiempo real.
4. Es importante respetar la segregación de espacios para la preparación de la PCR tiempo real. La preparación de la mezcla madre debe realizarse en el gabinete de seguridad biológica ubicado en el cuarto de cultivo, las muestras se deben agregar en la mesa de PCR's y finalmente tanto los controles positivos como los estándares se deben añadir en el laboratorio 1 con el aire acondicionado apagado.
5. Para la PCR tiempo real distribuya $14\ \mu\text{l}$ de la mezcla madre a cada tubo y agregue $1\ \mu\text{l}$ de cDNA diluido 1/10. Para la dilución 1/10 del cDNA se deben agregar $180\ \mu\text{l}$ de dH_2O al tubo de PCR que contiene los $20\ \mu\text{l}$ del producto de la síntesis de cDNA.
6. Después de agregar los dNTP's, oligonucleótidos y RNA durante la síntesis de cDNA estos deben ser sometidos al programa de RT-1 para una desnaturalización del RNA y posteriormente agregar el buffer y la enzima RT.
7. La colección de datos durante la PCR tiempo real se realiza durante el paso de hibridación y durante el "set ram time". Para observar la curva de disociación es necesario exportar los datos llamados "multicomponent" y abrirlos con el programa "ABI 7700 dissociation curve".
8. Mientras el termociclador ABI 7700 este funcionando debe estar encendido el aire acondicionado del laboratorio 1.

Referencias

1. Gibellini, D. et al., Simultaneous detection of HCV and HIV-1 by SYBR Green real time multiplex RT-PCR technique in plasma samples. *Mol Cell Probes* 20 (3-4), 223 (2006).

Revision history

- 1.0 Original document.
- 2.0 Changes to document format only.

