

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN  
CRISTÓBAL DE HUAMANGA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



Genotipificación de Virus de Hepatitis B, de las muestras de la seroteca del Laboratorio de Referencia en Salud Pública de la Dirección Regional de Ayacucho - 2017.

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL  
DE BIÓLOGO**

Con mención en la especialidad de Microbiología

Presentado por el

**Bach. DELGADO BAUTISTA, Oscar Alberto.**

**Ayacucho – Perú**

**2018**

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**  
**Bach. OSCAR ALBERTO DELGADO BAUTISTA**  
**R. D. N° 070 - 2018 – UNSCH – FCB - D**

En la ciudad de Ayacucho, a las diez de la mañana del uno de junio del año dos mil dieciocho, se reunieron en el auditorio de la Facultad Ciencias Biológicas, los miembros del jurado evaluador integrado por el: Dr. Jesús De la Cruz Arango (Presidente), Mg. José Alarcón Guerrero (Miembro), Dr. Gilmar Peña Rojas(Miembro-Asesor), Dra. Roberta Brita Anaya Gonzalez (Miembro) y actuando como secretario docente al Blgo. Cesar Justo Rodolfo Vargas, para recepcionar la tesis titulada: Genotipificación de Virus de Hepatitis B, de las muestras de la seroteca del Laboratorio de Referencia en Salud Pública de la Dirección Regional de Ayacucho – 2017; presentado por el Bach. Oscar Alberto Delgado Bautista. El Presidente del jurado luego de verificar la documentación presentada ordenó al secretario docente la lectura de los mismos, luego de la cual dispuso el inicio del acta de sustentación, aclarando que el sustentante dispone de cuarenta cinco minutos de tiempo, como establece el Reglamento de Grados y Títulos. Concluida la sustentación, el Presidente invitó a los miembros del Jurado para que realicen las preguntas o solicitar las aclaraciones sobre la exposición del trabajo, igualmente invitó al asesor, quien se comprometió a realizar las subsanaciones de observaciones si lo hubieran. Seguidamente el Presidente invitó al sustentante y público asistente abandonar temporalmente el auditorio para proceder a la deliberación y calificación, quedando del siguiente modo:

Miembros del Jurado Evaluador

	Exposición	Rpta.Preg.	Promedio
Dr. Jesús De la Cruz Arango	-	-	-
Mg. José Alarcón Guerrero	16	17	17
Dr. Gilmar Peña Rojas	18	17	18
Dra. Roberta B. Anaya Gonzalez	17	16	17
	Promedio:		17

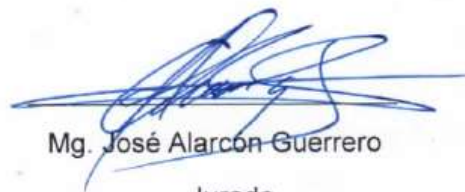
El sustentante alcanzó el promedio general aprobatorio de diecisiete (17), seguidamente el Presidente ordenó el reingreso del sustentante y público asistente al auditorio para dar a conocer el resultado de la evaluación, culminado el acto académico a las doce y treinta de la tarde.

En fe de lo cual firman.



Dr. Jesús De la Cruz Arango

Presidente



Mg. José Alarcón Guerrero

Jurado



Dr. Gimar Peña Rojas

Jurado - Asesor



Dra. Roberta B. Anaya Gonzalez

4<sup>to</sup> Jurado

*A mis padres Javier y  
Celestina por su enorme apoyo incondicional  
y entusiasmo que me brindaron para poder  
esforzarme y lograr ser un gran profesional.*

## **AGRADECIMIENTO**

- A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga y a la Facultad de Ciencias Biológicas a toda su plana de docentes, por haber sido los mentores de los conocimientos científicos para mi formación profesional.
- Al Blgo. Nyshon Rojas Palomino por su apoyo incondicional en la parte técnica, brindado en la colaboración y orientación permanente en el aspecto teórico-práctico durante el periodo de duración de la ejecución de la tesis.
- A la Blga. Johanna Balbuena Torres, responsable del laboratorio de hepatitis y enterovirus del Instituto Nacional de Salud por la gentil colaboración con cebadores para virus de hepatitis B.
- A Laboratorio de Referencia Regional en Salud Pública de la Dirección Regional de Salud Ayacucho al Blgo. Pavel Huaripuma en la recolección de las muestras y a los biólogos que laboran en dicho centro por su apoyo brindado.
- Al Dr. Gilmar, Peña Rojas, por su confianza en la elaboración, ejecución y redacción del presente trabajo de investigación.
- Blgo. Vidal Felices Aedo, por la revisión y orientación en la parte técnica del presente trabajo de tesis.

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Página.</b>
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. ANTECEDENTES	3
2.2. MARCO CONCEPTUAL	4
A. Virus de hepatitis B	4
1. Estructura del virus (VHB)	4
2. Organización genómica	6
2.1. Marco de lectura abierta p	6
2.2. Marco de lectura abierta c	7
2.3. Marco de lectura abierta s	7
2.4. Marco de lectura abierta x	7
2.5. Otros elementos del genoma viral	8
2.5.1. Secuencias repetidas directas o cortas (dr1 y dr2)	8
2.5.2. Promotores	8
2.5.3. Promotores del gen pre-Core y Core	8
2.5.4. Promotor básico del Core (pbc)	9
2.5.5. Región reguladora “upper regulatory region”	9
2.5.6. Potenciador (enhancer)	9
B. Ciclo de replicación	10
C. Epidemiología	12
1. Genotipos virales	13
2. Implicaciones clínicas de los genotipos del VHB	15
3. Genotipos de VHB y respuesta a tratamientos	16
4. Variantes genéticas de la polimerasa viral	16
D. Marcadores serológicos	17
1. Antígeno de superficie (HBsAg)	17
2. Anticuerpo de superficie (HBsAc)	17

3.	Antígeno del Core ( HBcAg)	17
4.	Anticuerpo del Core (HBcAc)	17
5.	Antígeno e (HBeAg)	18
6.	Anticuerpo e (hbeac)	18
E.	Historia natural del virus de hepatitis b	18
1.	Hepatitis aguda	18
2.	Hepatitis crónica	18
F.	Método para la detección del vhb	19
1.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	19
2.	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-RT)	19
2.1.	Genotipificación mediante curvas de disociación	19
G.	Importancia de la georreferenciación	21
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1.	Ubicación	24
3.2.	pre - analítica:	24
3.3.	Fase analítica	25
3.4.	Fase post analítica	29
IV.	RESULTADOS	31
V.	DISCUSIONES	43
VI.	CONCLUSIONES	49
VII.	RECOMENDACIONES	51
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
	ANEXOS	56

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página.</b>
Tabla 1. Descripción de los cebadores.	28
Tabla 2. Umbral de amplificación (Ct) de las muestras incluidas PCR en tiempo real y concentración de ADN total de todas mas muestras de suero obtenido por cuantificación en Nanodrop 2000c.	33
Tabla 3. Genotipado por curvas de disociación, (Melt Curve Genotyping) de PCR en tiempo real de muestras de suero de HBsAg positivos de la seroteca del Laboratorio de Referencia Regional de Ayacucho-2017.	34
Tabla 4. Grupo de genotipo F con (Tm=87.5 °C). Genotipado por curvas de disociación, VHB, de PCR en tiempo real de muestras de suero de HBsAg positivos de la seroteca del Laboratorio de Referencia Regional de Ayacucho-2017.	35
Tabla 5. Genotipado por curvas de disociación VHB, grupo 2 y 3 de genotipos con diferentes Tm, de PCR en tiempo real de muestras de suero de HBsAg positivos de la seroteca del Laboratorio de Referencia Regional de Ayacucho-2017.	36
Tabla 6. Coordenadas de la procedencia de pacientes con VHB, puntos N° 4;7;11;22;25 y 35 representan los sueros con diferentes temperaturas de fusión ( Tm ) , Ayacucho-2017.	40
Tabla 7. Número de pacientes con VHB, por provincias de la región de Ayacucho, enumerados en orden descendente, representa HBsAg positivos de la seroteca del Laboratorio de Referencia Regional de Ayacucho-2017.	41



## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página.</b>
Figura 1. Estructura de una partícula infecciosa del virus de la hepatitis B	6
Figura 2. Estructura genómica de hepatitis B	8
Figura 3. Promotor básico del core papel del genotipo y variantes precore/core del virus de la Hepatitis B en el curso clínico y el tratamiento.	9
Figura 4. Ciclo de replicación del virus de hepatitis B	11
Figura 5. Genotipos de VHB distribuidos en el mundo.	13
Figura 6. Pico de amplificación que corresponde a la curva de disociación o curva melting que indica la especificidad de la reacción, es decir, que los amplicones que se formaron son del tamaño esperado. La línea de abajo corresponde al control negativo, el cual no amplificó.	20
Figura 7. Curvas de Temperatura de fusión (melting curve) para VHC y VHB. Se observa la formación de dímeros de cebadores (primer dimers) para el control de reactivos.	21
Figura 8. Temperatura de fusión principal (fusión = de 87,5°C) del genotipo F, obtenido por el análisis de la curva de disociación. Análisis de la curva de disociación	37
Figura 9. Temperatura de fusión del genotipo F (color azul), del grupo 2 (color rojo) y grupo 3 (color verde).	38
Figura 10. Temperatura de fusión del genotipo F y del grupo 3 (color verde).	39
Figura 11. Mapa de georreferenciación de procedencia de pacientes con VHB crónicos de la seroteca del Laboratorio de Referencia Regional de Ayacucho – 2017.	42

## ÍNDICE DE ANEXOS

	<b>Página.</b>
Anexo 1: Figura 12. Curvas de amplificación de muestras de suero de la seroteca del Laboratorio de Referencia Regional Análisis de PCR real time de una placa de 40 pozos con muestras de suero de la seroteca del Laboratorio de Referencia de Ayacucho - 2017.	58
Anexo 2: Figura 13. Curvas de disociación resultado de análisis de la curva de disociación de PCR tiempo real donde la velocidad en que se pierde el Eva green es a medida que aumenta la temperatura.	59
Anexo 3: Figura 14. Histograma de edades de pacientes, análisis de 40 muestras de suero de la seroteca del Laboratorio de Referencia Regional de Ayacucho -2017.	60
Anexo 4: Figura 15. Histograma de sexo de pacientes, análisis de 40 muestras de suero de la seroteca del Laboratorio de Referencia Regional de Ayacucho - 2017.	61
Anexo 5: Figura 16. Histograma de procedencia de pacientes por distritos, análisis de 40 muestras de suero de la seroteca del Laboratorio de Referencia de Ayacucho - 2017.	62
Anexo 6: Figura 17. Histograma de pacientes con VHB, por provincias de la región de Ayacucho, representa HBsAg positivos de la seroteca del Laboratorio de Referencia Regional de Ayacucho - 2017.	63
Anexo 7: Figura 18. Histograma de genotipo F y grupos desconocidos de pacientes, en el análisis de 40 muestras de suero de la seroteca del Laboratorio de Referencia de Regional de Ayacucho - 2017.	64
Anexo 8: Figura 19. Resultados de amplificación de curvas de controles y 40 muestras de suero de la seroteca del Laboratorio de Referencia Regional de Ayacucho -2017.	65
Anexo 9: Figura 20. Resultados de curvas de disociación de control negativo, blanco y 40 muestras de suero de la seroteca del Laboratorio de Referencia Regional de Ayacucho -2017.	66

Anexo 10:	Figura 21. Resultados de picos de desnaturalización de controles y de 40 muestras de suero de la seroteca del Laboratorio de Referencia Regional de Ayacucho - 2017.	67
Anexo 11:	Figura 22. Rack con tubos eppendorf codificados para la extracción de ADN de VHB de 40 muestras de suero de la seroteca del Laboratorio de Referencia Regional de Ayacucho. Lima -2018.	68
Anexo12:	Figura 23. Preparación del master mix para la ejecución de la PCR tiempo real de 40 muestras de suero de la seroteca del Laboratorio de Referencia Regional de Ayacucho. Lima - 2018.	69
Anexo 13:	Figura 24. Programación de las etapas de PCR tiempo real en el software Ligth cycle™ 480.	70
Anexo 14:	Figura 25. Cuarto de equipos de termocicladores del Instituto Nacional de Salud.	71
Anexo 15:	Figura 26. Ambientes del Laboratorio de Leishmania del Instituto Nacional de Salud.	72
Anexo 16:	Figura 27. Cámara de vidrio cerrada y acondicionada con luz UV para suspender cebadores, ubicados en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Salud.	73
Anexo 17:	Figura 28. Protocolo de seguridad con papel adsorbente para el inicio de la extracción de ADN viral en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Salud.	74
Anexo 18:	Constancia de autorización emitido por el Laboratorio de Referencia Regional de Ayacucho.	75
Anexo 19:	Lista de Abreviaturas.	76
Anexo 20:	Matriz de consistencia	77

## RESUMEN

Hepatitis B, es una enfermedad causada por virus de Hepatitis B (VHB), según la Organización Mundial de la Salud, aproximadamente dos mil millones de personas se encuentran infectadas, de ellos más de 350 millones presentan una infección crónica y 780,000 personas fallecen al año. En el Perú se reportan que 1,7 millones de personas son portadores de VHB. En los estudios de seguimiento de pacientes crónicos por VHB, infectados con los genotipos A, D ó F han mostrado que la frecuencia de muerte relacionada a la enfermedad hepática fue mayor en pacientes con genotipo F que en infectados con genotipos A ó D. Por otro lado el PCR tiempo real es una herramienta muy importante en el diagnóstico del virus de VHB debido a su alta especificidad y sensibilidad. Se planteó como objetivo genotipificar el virus de la Hepatitis B a partir de muestras serológicas que ingresaron a la seroteca del Laboratorio Referencial de la Dirección de Salud Ayacucho durante el 2017. Proceso que se desarrolló en el Laboratorio de Biología Molecular de la Sede Central del Instituto Nacional de Salud, Lima - Perú. El presente trabajo, investigación de tipo descriptivo. La extracción de ADN total de las muestras fueron desarrolladas empleando el kit comercial Invitrogen - PureLink® Genomic DNA, mientras que el proceso de PCR tiempo real se desarrolló en termociclador LightCycler® 480, seguido de un análisis con la curva de disociación utilizando el kit comercial Thermo Fisher Luminare® Color HRM Master Mix. En los resultados obtenidos por PCR tiempo real, se muestran 3 grupos; el grupo I corresponde al genotipo F, estuvo constituido por 21 muestras de suero con una temperatura de fusión  $T_m = 87,5 \pm 0,15$  °C; se observó además 2 muestras de suero que presentaron un  $T_m = 80,5 \pm 0,36$  °C, (grupo II) y 6 muestras con  $T_m = 83,34 \pm 0,13$  °C, (grupo III). Todas las muestras fueron georreferenciadas siendo Huamanga como provincia donde se presentó mayor cantidad de muestras con serología positiva a HBsAg seguido de Huanta y La Mar respectivamente.

**Palabra clave:** Hepatitis B; PCR tiempo real; genotipo; curvas de disociación.

## I. INTRODUCCIÓN

El Virus de la Hepatitis B (VHB) es un virus hepatotrópico que afecta principalmente al ser humano, es una enfermedad necroinflamatoria del hígado, la que puede generar a cirrosis y carcinoma hepatocelular (CHC).

El VHB en su ciclo de replicación involucra una transcriptasa reversa que genera errores ocasionales en una variedad de por lo menos 8 genotipos, 9 subtipos con perfiles epidemiológicos claramente definidos. Espontáneamente en el curso natural de la enfermedad aparecen mutaciones asociadas a la presión selectiva como vacunas, gamaglobulinas y tratamientos antivirales.

Actualmente existen 2000 millones de personas infectadas en el mundo de las cuales 350 millones viven con hepatopatía crónica y 600,000 mueren cada año. Es causada por las distintas familias del virus. Actualmente se conocen cinco virus asociados a esta enfermedad designados como virus de la Hepatitis A (VHA), B (VHB), C (VHC), D (VHD) y E (VHE). En Perú los últimos datos informan que 1,7 millones de peruanos son portadores de VHB.

En la región Ayacucho la Hepatitis B entre el 2012 y 2013 tuvo similar comportamiento por que la tasa de incidencia (TI) se mantuvo incrementado ligeramente. Para el 2014 se tuvo una TI de 2,25 no obstante se observa que para el 2016 se tuvo un considerable incremento de 4 puntos en relación al 2015 poniendo a la región Ayacucho en riesgo potencial de enfermar con Hepatitis B. Durante el 2016 se ingresaron al sistema NOTISP (Sistema de Vigilancia Epidemiológica) un total de 459 casos. Del total de casos notificados se confirmaron por laboratorio 371 casos. Más del 80 % de casos confirmados se presentan entre edades de 20 a 40 años que pertenecen a la población económicamente activa y en una etapa reproductiva. Esta es una enfermedad inmunoprevenible de mayor incidencia. A diferencia del 2015 se identificó mayor cantidad de casos en la Red Huamanga, siendo este quien concentra la mayor cantidad de Población.

La genotipificación molecular de hepatitis B resulta acertado para la determinación de genotipos que podría tener implicancias para el tratamiento de la infección crónica, algunos genotipos de VHB están relacionados con diferentes pronósticos de la enfermedad. Pueden tener alguna implicancia en la respuesta a la vacuna cuando es elaborada utilizando otros genotipos como el A y D. por lo que es importante continuar realizando seguimientos y caracterizando genes de hepatitis B en el Perú.

La biología molecular nos ofrece técnicas sensibles que permite la detección de concentraciones de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el PCR en tiempo real gracias a su alta sensibilidad y especificidad, puede amplificar una región específica del genoma del virus cientos de veces a partir de muy poco ADN inicial. El desarrollo de técnicas moleculares como el PCR en tiempo real, entre otros, son utilizados en la detección, seguimiento de la infección como complemento para otras pruebas y respuesta a tratamientos antivirales.

**Objetivos:**

**Objetivo general**

- Genotipificar el virus de la Hepatitis B de las muestras de la seroteca del Laboratorio Referencial de la Dirección de Salud Ayacucho - 2017.

**Objetivo específico**

- Estandarizar el PCR en tiempo real para la genotipificación de virus de la hepatitis B.
- Georreferenciar la procedencia del paciente crónico a quien corresponda la muestra.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. ANTECEDENTES

Becker y col, (2013). en su artículo de investigación “Análisis de la curvas de disociación - fusión para el cribado del virus de la hepatitis b genotipos a, d y f en pacientes de un Hospital General en el Sur de Brasil”, donde analizó 104 pacientes presumiblemente con infección crónica por VHB. Para el ADN viral utilizó plasma, genotipos virales y se determinaron diferentes mutaciones usando protocolos basados en PCR. Se estandarizó una metodología basada en PCR para el análisis de los genotipos A, D y F del VHB. La técnica se basó en una PCR anidada con el paso final consistente en una PCR multiplex en tiempo real, utilizando la curva de fusión como herramienta para la diferenciación de fragmentos. Reportaron mayor frecuencia de genotipo D (44,4%), seguido de genotipo A (22,2%) y genotipo F (3,7%).<sup>1</sup>

Rivas Y, (2008). en su tesis de investigación “Caracterización molecular de aislados del virus de la hepatitis B (VHB) en muestras de suero de pacientes de dos poblaciones Colombianas”. donde analizó 126 muestras de sueros positivos para el antígeno de superficie (AgSHB), mediante la técnica de PCR en dos rondas, utilizando iniciadores específicos para las regiones del AgSHB e iniciadores específicos para la amplificación de genomas completos en muestras selectas. Los productos amplificados fueron secuenciados y analizados filogenéticamente. Mencionaron un total de 47 (37%) amplificaron al menos para una región del AgSHB y solo en uno se amplificó el genoma completo. El análisis filogenético reveló que 41 aislados pertenecen al genotipo F, cuatro al genotipo D, uno al genotipo A y uno al genotipo C. La subgenotipificación de 23 secuencias, logró la asignación eficiente de los subgenotipos, resultando así 17F3, 3D2, 1D3, 1A2 y 1C2. Todas las secuencias genotipo F (subgenotipo F3) se encuentra estrechamente relacionada con la única secuencia del VHB colombiana reportada en la base de datos ([www.ncbi.nlm.gov/entrez](http://www.ncbi.nlm.gov/entrez)), lo que se corresponde con la distribución geográfica reportada para el genotipo F y el subgenotipo F3. La

presencia de los genotipos A, C y D en la población estudiada podría estar asociada a las diferentes olas migratorias que se han venido dando hacia esta parte del continente. Es evidente observar una alta predominancia del genotipo F sobre otros genotipos (A, C y D) en la población colombiana estudiada, lo cual concuerda con el fuerte acervo genético amerindio que mantiene la población. <sup>2</sup>

Colmenares y col, (2008). mencionan en el artículo de investigación “Detección y cuantificación del genoma del virus de hepatitis B mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.” Donde se incluyó 22 individuos con infección crónica por el VHB (IC), 11 individuos curados espontáneamente (IN) y 4 controles seronegativos (C). El ADN del suero fue extraído mediante columnas de sílica. El genoma viral fue amplificado utilizando cebadores de secuencias conservadas del virus y una mezcla de reacción que incluye todo para la amplificación y detección de los amplicones. Utilizaron, patrones con concentración de ADN viral conocida. Finalmente, la especificidad de la amplificación fue analizada mediante una curva de disociación (melting curve). Se evidenció que de 22 pacientes IC, 17 resultaron positivos (77,2%). El promedio de copias de ADN fue de 470.693 copias/ml, correlacionándose positivamente con el estadio clínico de la enfermedad ( $r=0,48$ ,  $p<0.05$ ). <sup>3</sup>

Hijar y col, (2007). en el artículo de investigación “Genotificación de la Hepatitis B en pacientes de áreas endémicas del Perú”. Analizó muestras serológicas de Ancash, Ayacucho, Lima, Loreto y Ucayali. El análisis de la secuencia de ADN parcial de la región S del genoma viral del HBV fue realizado a partir de doce sueros con antígeno e (HBeAg) positivos. El resultado del análisis indica la presencia del genotipo F (subtipo adw4) en todas las muestras analizadas. <sup>4</sup>

## **2.2. MARCO CONCEPTUAL**

### **A. Virus de Hepatitis B**

El virus de la hepatitis b pertenece a la familia Hepadnaviridae. La nomenclatura de la familia proviene de la unión de los términos hepatotrópico y ADN, se enfatizan dos de las propiedades más resaltantes de estos virus. El VHB constituye uno de los virus más importantes, presenta un hepatotropismo marcado pero no absoluto. El VHB causa una infección hepática con mayor proyección de manifestaciones clínicas, las cuales van desde un estado transitorio, hepatitis aguda o fulminante, a un estado crónico que incluye portadores asintomático. <sup>2</sup>



## 1. Estructura del virus (VHB)

La estructura común de todos estos virus presenta una morfología esférica con un diámetro de 42 nm, posee una envoltura externa de naturaleza proteica y polisacárida de 7 nm de grosor, donde se encuentra el antígeno de superficie (AgHBs), y una nucleocápside icosaédrica central de 28 nm de diámetro con una proteína principal. El Core posee material reactivo inmunológicamente específico denominado AgHBc (antígeno del core) y AgHBe (antígeno "e"). El AgHBc o partículas core no circulan libremente en pacientes infectados, aunque sí se encuentran en el núcleo y en el citoplasma de los hepatocitos infectados crónicamente.<sup>5</sup>

La partícula viral completa, también conocida como partícula dane, tiene un tamaño aproximado de 42 nm a 47 nm. El virus de la hepatitis B posee una nucleocápside icosaédrica conocida como "Core", que contiene el DNA viral y la enzima polimerasa viral multifuncional con actividad de transcriptasa reversa y de DNA polimerasa, a la cual se encuentra asociado el genoma, y este complejo es rodeado por los antígenos del Core y el antígeno e (HBeAg). Por su parte, el antígeno de superficie (HB - sAg) se encuentra en la parte exterior, embebido en la envoltura lipídica; este antígeno está formado por tres proteínas (L, M y S).<sup>6</sup>

Las glucoproteínas del HBsAg contienen un determinante grupo (a) y determinantes tipo específicos ("d" o "y", "w" o "r"), habiéndose identificado los subtipos: adw, adr, ayw y ayr, útiles como marcadores epidemiológicos. Estos subtipos están distribuidos geográficamente alrededor del mundo, siendo el subtipo adw el que predomina en las Américas. También se ha descrito heterogeneidad antigénica del determinante w y determinantes adicionales como j, k, q, etc. El determinante a puede generar inmunidad protectora contra virus de cualquier subtipo, y los determinantes de subtipo parecen generar protección específica de subtipo.<sup>7</sup>

La nucleocápside consiste en 180 monómeros de proteínas arreglados en forma icosaédrica. Están codificados por el gen C (central o de la nucleocápside). Cuando los polipéptidos se ensamblan formando el Core se manifiesta la especificidad de antígeno, HBcAg. Una forma truncada de esta proteína posee especificidad de "antígeno e" (HBeAg). El marco de lectura del gen C incluye una región pre-C. Cuando se inicia la traducción a partir de esta región se secreta el polipéptido truncado con especificidad HBeAg. Este, a diferencia del HBcAg se encuentra en forma soluble y es un indicador de replicación viral lo que lo convierte

en un marcador antigénico importante para determinar el estado del paciente crónico. <sup>7</sup>

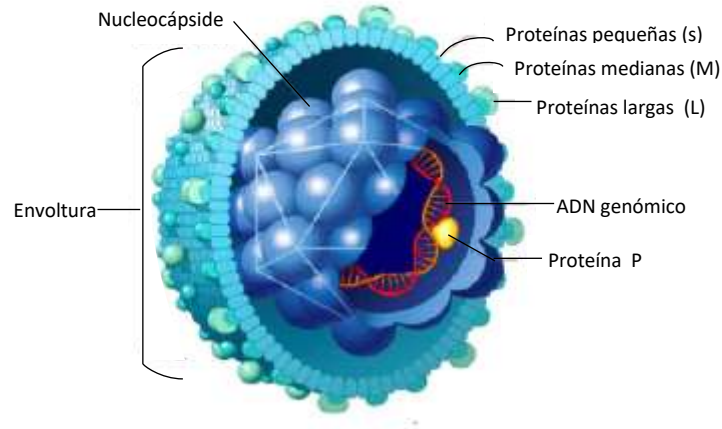


Figura 1. Estructura de una partícula infecciosa del virus de la hepatitis B (Fuente: Rivas S, 2008)

## 2. Organización genómica

El virus está conformado por una molécula de ADN circular, pequeña, laxo y parcialmente de doble hebra. La cadena larga, denominada L (-), tiene un tamaño aproximadamente de 3,2 Kb, con los extremos 5' y 3' fijos, formando un círculo casi continuo. La cadena corta, o S (+), tiene una longitud variable, pudiendo ser hasta un 50% más corta que la L (-), con un extremo 5' fijo y un extremo 3' libre. <sup>8</sup>

El genoma tiene cuatro promotores o marcos de lectura abierta (*open reading frame*, ORFs) superpuestos que dan origen a las siete proteínas virales: ORF P que codifica la polimerasa, ORF C que codifica la proteína Core (HBcAg) y el antígeno e (HBeAg), ORF X que codifica la proteína HBx y ORF S que codifica las tres formas del antígeno de superficie (HBsAg). <sup>9</sup>

El fragmento de lectura abierta S (FLA-S), conocido también como región S, contiene las regiones Pre-S1, Pre-S2 y el gen S que codifican para las proteínas de la envoltura viral. La proteína grande se forma mediante la codificación de las regiones Pre-S1, pre-S2 y S; la proteína mediana se deriva de la información genética de Pre-S2 y del gen S y la proteína pequeña conocida también como HBsAg se forma a partir del gen S. <sup>10</sup>

### 2.1. Marco de lectura abierta P

Codifica la polimerasa de ADN del virus, enzima básica de 92 kDa, situada en el interior de la nucleocápside del virus, La ADN polimerasa del VHB presenta en su secuencia de aminoácidos una homología parcial con la transcriptasa inversa de

varios retrovirus patógenos. Está implicada en los mecanismos de transcripción inversa del VHB y de encapsidación del ARN pregenómico.<sup>8</sup>

## **2.2. Marco de lectura abierta C**

El ORF Core está compuesto por las regiones pre-Core y Core (pre-C/C), esta región codifica el HBeAg y la proteína Core o proteína de la cápside. La transcripción de este gen está regulada por el promotor Core que posee un elemento denominado promotor basal de Core (BCP, del inglés: *Basal Core Promoter*) y un elemento conocido como secuencia reguladora corriente arriba de BCP (CURS, del inglés: *BCP upstream regulatory sequence*).<sup>11</sup>

El gen C está situado en las posiciones 1814 y 2458 con dos codones de iniciación (ATG) que le permiten codificar dos proteínas diferentes HBcAg y HBeAg. La proteína Core (HBcAg) consta de 183 aminoácidos, codificada por el gen core y da lugar a la estructura de cápside la cual tiene como función empaquetar el ARN pregenómico y a la polimerasa viral que se requieren para la replicación viral. En esta proteína se encuentran los principales determinantes antigénicos de la respuesta inmune citotóxica.<sup>12</sup>

## **2.3. Marco de lectura abierta S**

Región S que codifica tres tipos de proteínas de superficie: una proteína de 222 aminoácidos, HBsAg, proteína de superficie o mayor, denominada así por ser la que se encuentra en mayor concentración en el suero; Pre S2, de 55 aminoácidos cuya expresión, junto con el HBsAg, da lugar a una proteína mediana (HBsAg Pre S2) y Pre S1, cuya expresión junto con las dos anteriores da lugar a una proteína larga (HBsAg + Pre S2Ag + Pre S1Ag). Esta proteína larga parece ser la responsable de la interacción de la superficie del virus con la membrana de la célula del hepatocito, por lo que podría jugar un importante papel en la patogenia del proceso, es desconocido el receptor de membrana.<sup>13</sup> El HBsAg tiene la capacidad de inducir una fuerte respuesta inmune específica de anticuerpos y de células T auxiliaoras en personas sanas. Esta propiedad permite al HBsAg no adyuvado inducir una respuesta citotóxica (CTL) específica para epítopes generados por vías alternativas de procesamiento, posibilitando la expansión del repertorio de células citotóxicas específicas para el HBsAg.<sup>14</sup>

## **2.4. Marco de lectura abierta X**

El gen X codifica un polipéptido de 145 - 154 aminoácidos (HBx) con actividad multirreguladora, tanto del ciclo viral como de la célula huésped.<sup>27</sup> En relación con

la actividad viral, en estudios in vitro se ha mostrado que el HBx incrementa la replicación del VHB. <sup>15</sup>

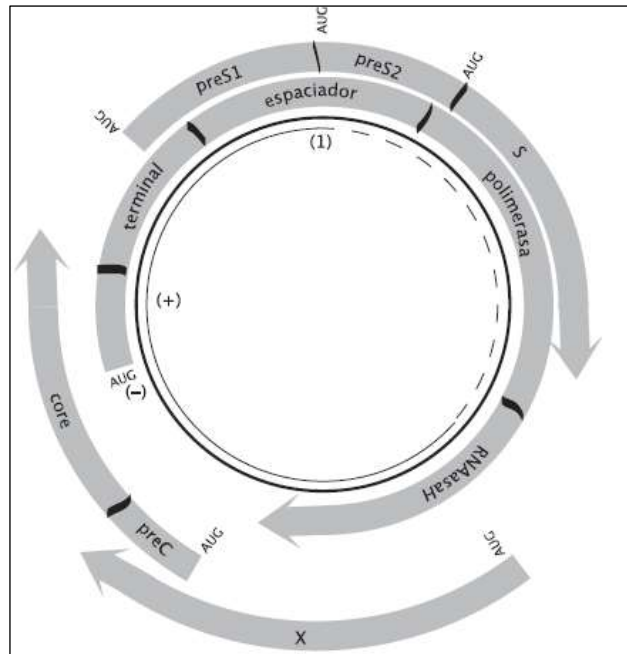


Figura 2. Estructura genómica de hepatitis B (Fuente: Sánchez L, et al, 2013)

## 2.5. Otros elementos del genoma viral

### 2.5.1. Secuencias repetidas directas o cortas (DR1 y DR2)

Son secuencias de 11 pares de bases, DR1 ubicadas en el extremo 5' de la cadena negativa de ARN y DR2 el extremo 3' de la cadena positiva, que participan en la replicación viral, son secuencias muy conservadas en los VHB. <sup>12</sup>

### 2.5.2. Promotores

Son elementos integrales del genoma cuya función es promover, mediar y controlar el inicio de la transcripción. El VHB tiene cuatro promotores S1p, S2p, Cp y Xp que dirigen la síntesis de los ARNm. <sup>12</sup>

### 2.5.3. Promotores del gen pre-Core y Core

Está ubicado inmediatamente antes del gen y consta de 232 nucleótidos entre las posiciones 1613 y 1849, está conformado por dos regiones, el promotor básico del Core (PBC) y *upper regulatory region* (región reguladora en 5' respecto al PBC). <sup>16</sup>

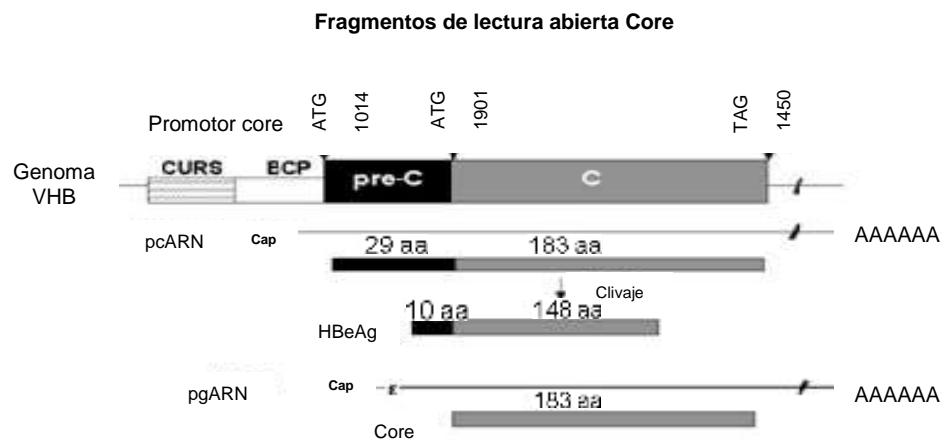


Figura 3. Promotor básico del core papel del genotipo y variantes pre-Core/Core del virus de la Hepatitis B en el curso clínico y el tratamiento. (Fuente: Cortes F, et al, 2008)

#### 2.5.4. Promotor básico del Core (PBC)

Es un fragmento del genoma ubicado entre los nucleótidos 1742 y 1849. El PBC contiene elementos *cis-acting* que están independientemente y que dirigen la transcripción de ambos ARN pre-Core y Core, estos elementos se solapan parcialmente dando origen a varios sitios de inicio de la transcripción, tres cajas TATA (ricas en AT-TA1, TA2, TA3) para la transcripción del ARN precore y TA4 la cual posee doble función, región de inicio para el ARN pregenómico y algunos ARN precore. <sup>16</sup>

#### 2.5.5. Región reguladora “upper regulatory region”

Se divide en dos dominios (A y B) y a su vez en motivos alfa, delta y gama que regulan positivamente la actividad del PBC y beta que lo hace negativamente y su acción no está mediada por el enhancer II. <sup>12</sup>

#### 2.5.6. Potenciador (Enhancer)

La actividad de estos promotores está controlada a su vez por los elementos potenciadores o enhancer I y II. Es un elemento activador de la transcripción, en el VHB encontramos dos potenciadores, el I está localizado en el gen X, participa a nivel nucleótido incrementado la expresión de genes virales, dado por la unión de proteínas del virus o del huésped, también favorece la codificación de aminoácidos de la polimerasa viral. El potenciador II se encuentra dentro del promotor del pre-Core y Core, cumpliendo una función reguladora que activa el promotor del Core y estimula los promotores del genes S y X. <sup>16</sup>

## **B. Ciclo de replicación**

Los eventos de su ciclo replicativo son poco entendidos. Esto incluye la entrada a la célula, la descapsidación y liberación del genoma viral en el núcleo celular.<sup>2</sup> El virus de la Hepatitis B infecta especialmente a los hepatocitos, aunque también se ha encontrado en leucocitos, se une a través de moléculas que se cree podrían ser receptores específicos del virus como la endonexina, carboxipeptidasa, apolipoproteínas.<sup>5</sup> Los viroides se unen a la superficie del hepatocito, la partícula viral se rompe y libera la nucleocápside en el citoplasma, que se dirige al núcleo por medio de señales de localización nuclear, en el interior el ADN parcialmente bicatenario, se convierte en un ADN circular covalente cerrado por acción de la polimerasa viral.<sup>12</sup>

La transcripción la realiza la ARN polimerasa II del huésped que produce dos clases de ARN virales: los ARN subgenómicos que codifican para las proteínas virales de envoltura y los ARN genómicos, que tienen dos funciones: sirven como mensajeros para las proteínas del Core y de la polimerasa viral; y además son el templado de la transcripción reversa. Estos ARN son transportados luego al citoplasma donde serán traducidos. El ARN genómico es encapsidado en partículas de nucleocápside viral junto con la polimerasa. Esta encapsidación es altamente específica, siendo el ARN genómico únicamente encapsidado. Esta reacción, no solo requiere las proteínas del Core, sino también los productos del gen P. Esto se ha comprobado con virus mutantes que al perder el gen P, producen nucleocápsides vacías.<sup>7</sup> La infección de la célula hepática se inicia con la interacción del VHB con un receptor, todavía desconocido, de la membrana del hepatocito. La interacción depende del dominio pre S. Posteriormente, la envoltura viral se rompe, libera la nucleocápside al citoplasma y ésta se dirige al núcleo conducida por la señal de localización nuclear presente en la proteína del Core. La nucleocápside interacciona con los poros nucleares y se disocia liberando el ADNrc en el interior del núcleo celular, donde se convierte en un cccADN por acción de la polimerasa viral y otras enzimas de la propia célula huésped. La cadena negativa del cccADN sirve de molde para la transcripción de los distintos ARN virales mediante la ARN polimerasa II del hepatocito dirigida por los promotores y los enhancer.<sup>15</sup> Estos ARN se transportan al citoplasma donde funcionan como ARNm para su traducción en las diferentes proteínas del VHB. Sin embargo, uno de ellos, el ARNcore, tiene además la función de ARN pregenómico al servir de molde para la retrotranscripción por la acción de la

proteína C, formándose las cápsidas. Además. Este pequeño oligonucleótido, que está unido covalentemente a la PT, actuará de cebador en la síntesis de la cadena complementaria de ADN. Luego se sintetiza la cadena complementaria a esta primera cadena de ADN. El proceso completo de replicación del ADN viral requiere varios cambios de posición de las cadenas cebadoras.<sup>15</sup>

El cccADN es muy estable y luego se transporta todo el RNA viral al citoplasma donde se realiza la traducción de proteínas del VHB, luego las proteínas de la nucleocápside se ensamblan en el citoplasma, encerrando en su interior una partícula de RNA pre-genómico y el complejo de la polimerasa. El siguiente paso es la transcripción reversa. A partir del RNA pre-genómico se sintetiza una nueva cadena de ADN. La nueva partícula viral Core puede volver a entrar en el núcleo para formar más viroides.<sup>17</sup>

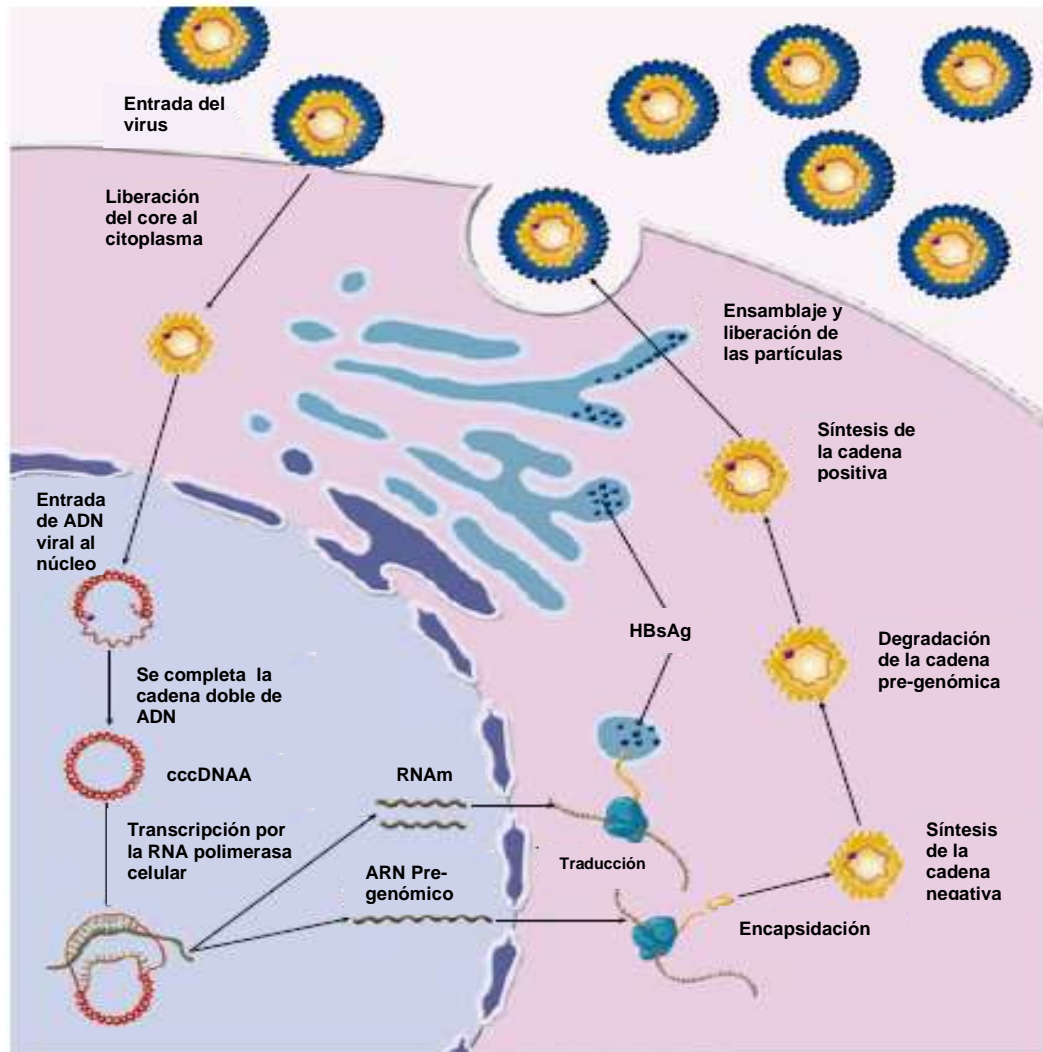


Figura 4. Ciclo de replicación del virus de hepatitis B (Fuente: Toro M, et al, 2011).

### **C. Epidemiología**

La OMS, informa que dos mil millones de personas, en lo que se estima como un tercio de la población mundial, han sido infectadas por el VHB y, de ellos, 350-400 millones presentan una infección crónica y 780.000 personas fallecen al año. <sup>16</sup> La prevalencia varía con mucha significancia según las regiones del mundo, siendo alta en África subsahariana, Asia-Pacífico y cuenca del Amazonas (Bolivia, Brasil, Colombia, Venezuela, Perú y Ecuador) donde más del 8 % de la población son portadores crónicos del VHB y entre 70-98% muestra evidencia serológica de haber estado expuesto al virus. En la zona de Asia-Pacífico se encuentran aproximadamente el 75 % de todos los portadores de VHB. Aproximadamente, el 45 % de la población mundial vive en regiones endémicas para el VHB. <sup>16</sup>

Los datos reportados son que la OMS estima que unos 170 millones son portadores crónicos en riesgo dramático de desarrollar cirrosis hepática y/o cáncer de hígado. La prevalencia de anti-VHC es mayor en usuarios de drogas inyectables y en pacientes hemofílicos hasta el 98%; muy variable en pacientes en hemodiálisis. <sup>18</sup>

Entre los años 2000 al 2015: la tasa de incidencia nacional de hepatitis B ha sido variable, de 7,48 en el 2000 disminuyó a 1 x 100 000 hab. En el 2009 se ha ido incrementando hasta 3,8 x 100 000 hab. En el 2015 y el 80% de los casos notificados proceden de los departamentos de: Lima, Loreto, Cusco, Ayacucho, Huánuco, Arequipa, Junín, Lambayeque, Pasco y Apurímac. En los últimos 5 años: las Tasas de Incidencia se han ido incrementando de 1,6 en el 2011 a 3,8 x 100 000 hab. En el 2015 y los departamentos que tienen el 82.6% de los casos de hepatitis B entre los años 2011 al 2015 son: Lima, Arequipa, Ayacucho, Loreto, Cusco, Junín y Huánuco. <sup>19</sup>

En la Región de Ayacucho se reportó de la semana 1 hasta la semana 52 del 2016 se notificó 459 casos, de los cuales (371) fueron confirmados por laboratorio, 68 descartados y 20 continúan como probables. Del total de casos confirmados de Hepatitis B en la región, el 80 % de casos se presentaron en edades de 20 a 40 años considerando que ambos grupos poblacionales lo conforman adultos sexualmente activos y económicamente activos. <sup>20</sup>

Esta enfermedad es prevenible por vacuna con mayor incidencia, durante el 2012;2013 se tuvo similar comportamiento ya que la TI se mantuvo incrementado ligeramente para el 2014 se tuvo una TI ( tasa de incidencia) de 2,25 se observa que para el 2016 se tuvo un considerable incremento de 4 puntos en relación al



2015 poniendo a la Región Ayacucho en Riesgo potencial de Enfermar con Hepatitis B, ya que se estima que hay 240 millones de personas que padecen infección crónica por el virus de hepatitis B definidas como positivas al antígeno superficial del virus de la hepatitis B durante al menos seis meses. <sup>20</sup>

Los mecanismos de transmisión más frecuentes en los países en desarrollo son:

- Perinatal: transmisión durante el parto de la madre HBsAg al recién nacido. El virus B es incapaz de atravesar la placenta, a menos que esté dañada, por lo que la infección intrauterina es poco frecuente.
- Infecciones asintomáticas en la primera infancia por contacto directo con infectados
- Inyecciones no seguras  
Transfusiones de sangre
- Contacto sexual

### 1. Genotipos virales

En las secuencias del genoma completo, el VHB ha sido clasificado en ocho genotipos diferentes, estas por la composición de nucleótidos basadas en diferencias superiores al 8%, los cuales han sido denominados con letras de la A hasta H (A-H). <sup>13</sup>

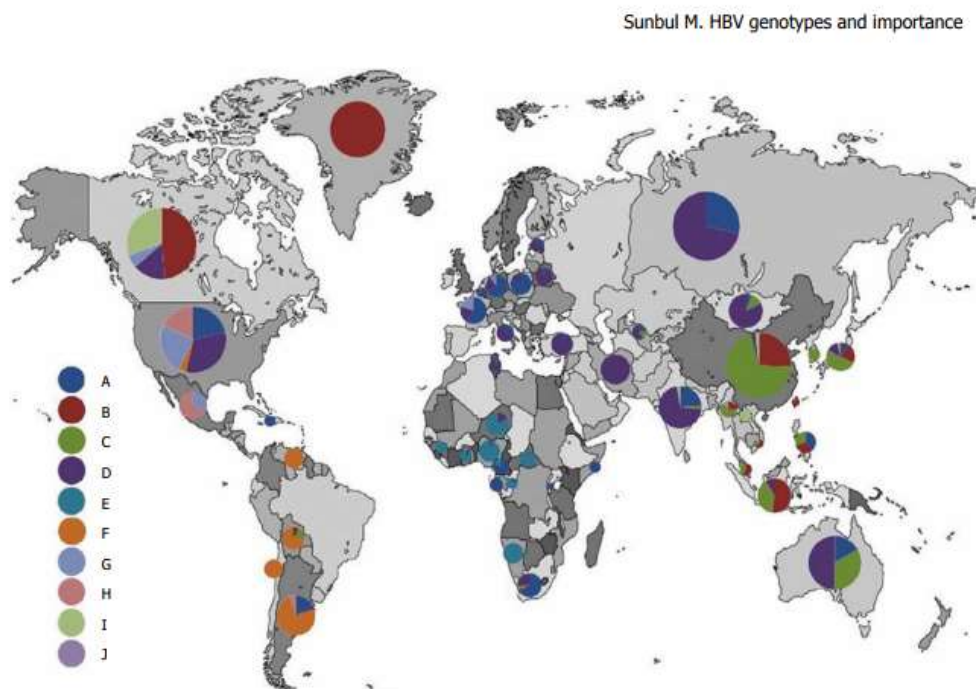


Figura 5. Genotipos de VHB distribuidos en el mundo. (Fuente: Sunbul M, 2014.)

Muchos estudios han informado que diferentes genotipos y subgenotipos muestran una distribución geográfica diferente y están asociados con la progresión de la enfermedad, la progresión clínica, la respuesta al tratamiento antiviral y el pronóstico. Los genotipos A-D y F se dividen en varios subgenotipos.<sup>21</sup> El genotipo A está muy extendido en el África subsahariana, el norte de Europa y África occidental; los genotipos B y C son muy comunes en Asia; el genotipo C se observa principalmente en el sudeste de Asia; el genotipo D es dominante en África, Europa, países mediterráneos e India; el genotipo G se informa en Francia, Alemania y los Estados Unidos; y el genotipo H se encuentra comúnmente en América Central y del Sur. El genotipo I ha sido reportado recientemente en Vietnam y Laos. El más reciente genotipo VHB, genotipo J, ha sido identificado en las Islas Ryukyu en Japón. La distribución geográfica de los genotipos del VHB puede estar relacionada con la vía de exposición.<sup>21</sup>

Por ejemplo, los genotipos B y C son más comunes en regiones con alta endemicidad de exposición perinatal o vertical, que desempeña un papel importante en la transmisión viral. La figura 2 muestra la distribución de genotipos en todo el mundo.<sup>21</sup> El genotipo H es predominante en México, mientras que el genotipo F prevalece en América Central y del Sur.<sup>22</sup> Las pruebas de filogenia realizadas por los métodos Neighbor-Joining y Maximum Likelihood agrupan estos genotipos como "hermanas, cerca de la raíz de muchos árboles filogenéticos debido a sus fuertes similitudes genéticas. Por lo tanto, según esta metodología, los genotipos F y H pertenecen a un clado monofilético y pueden considerarse descendientes directos del ancestro de todos los genotipos de hepatitis B humana. Debido a que comparten rutas epidemiológicas y de transmisión común, estas características pueden ser de importancia médica para el resultado clínico y la respuesta al tratamiento entre poblaciones humanas en México y América Central y del Sur.<sup>22</sup>

Estudios moleculares están afirmando que como resultado de una infección por VHB pueden ocurrir alteraciones genéticas en el genoma viral en replicación, vale decir, mutaciones puntuales, deleciones e inserciones. Estas alteraciones se generan durante el curso natural de la infección crónica y en respuesta a la presión seleccionadora que el sistema inmune, o bien, a otras presiones tales como la vacunación, el tratamiento con inmunoglobulina anti-HBs o la terapia con agentes antivirales.<sup>23</sup>

Muchas mutaciones han sido descritas en los ORF S y Core que pueden llevar a modificaciones antigénicas y alteraciones en el nivel de síntesis de las proteínas del VHB y del pgARN; esto se podría asociar con la no detección de antígenos virales mediante la prueba de ELISA, como se describe en casos de OBI y a una baja tasa de replicación. <sup>24</sup> En la región pre-Core, la variante más frecuente es la mutación puntual G1896A, que produce un codón de término en el marco de lectura, con la consiguiente pérdida de la expresión del HBeAg. Esta mutación parece ser un genotipo dependiente y es más probable que ocurra en cepas que contienen una timina en la posición 1858 (T1858), como son los genotipos B, D, E, G, y subgenotipo C1 respectivamente. <sup>23</sup>

## **2. Implicaciones clínicas de los genotipos del VHB**

En el genotipo del virus de la hepatitis B está relacionado con el riesgo de desarrollo de carcinoma hepatocelular por ello es importante su análisis. En lugares donde circulan los genotipos B y C, las personas infectadas con el genotipo C tienden a desarrollar mayor carcinoma hepatocelular e, igualmente, una menor supervivencia. <sup>25</sup> En América Central los datos sobre la distribución del genotipo del VHB en países como Costa Rica, Nicaragua, Honduras, El Salvador y Guatemala fueron reportados a fines de los años noventa. F con infección aguda y crónica se asoció con la seropositividad para HBsAg y anti-HBc, así como pre-núcleo detener las mutaciones. <sup>22</sup>

Los países de esta región como Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú, Brasil, Bolivia, Chile y Argentina han definido correctamente la circulación predominante Genotipos de VHB, aunque el número de cepas circulantes de VHB en algunas regiones son limitadas. <sup>22</sup> En Colombia existe una relación de país entre América Central y América del Sur, El genotipo VHB F (específicamente, F1a y F3) es más frecuente 77% y 86% respectivamente) que los genotipos A y G (15% y 2%). <sup>26</sup>

En los estudios de seguimiento a largo plazo de pacientes con infección crónica por VHB, infectados con los genotipos A, D o F han mostrado importantes diferencias. Por lo tanto la tasa de remisión bioquímica sostenida y la desaparición del HBsAg y del DNA viral fueron significativamente más altas en los pacientes infectados con el genotipo A que aquéllos infectados con los genotipos D o F. En este mismo estudio, se encontró además que la frecuencia de muerte relacionada a la enfermedad hepática fue mayor en pacientes con genotipo F que en aquéllos infectados con genotipos A o D. <sup>27</sup>

Existen pocos trabajos en los que se ha dispuesto estudiar simultáneamente un mayor número de genotipos. Al respecto se ha descrito que la erradicación del HBeAg desde suero de pacientes con infección crónica, es menos frecuente en el genotipo C que para los genotipos A, B, D y F.<sup>26</sup> Otro estudio realizado por el mismo grupo, asoció al genotipo F con una mayor frecuencia de desarrollo de hepatocarcinoma cuando se comparó con los genotipos A, B, C y D.<sup>28</sup>

### **3. Genotipos de VHB y respuesta a tratamientos**

La importancia clínica de los diferentes genotipos del VHB también se ha estudiado en el ámbito del tratamiento antiviral. Cuando se realiza la terapia está desarrollada en interferón- $\alpha$ , los estudios comparativos entre los genotipos A v/s D o B v/s C muestran una mayor respuesta sostenida en pacientes infectados con los genotipos A y B relacionándose respectivamente.<sup>23</sup> En una evaluación con el tratamiento con Peg-interferón  $\alpha$ -2b, en que se consideró la eliminación del HBsAg, la respuesta del genotipo A fue mayor (14%) que los genotipos B (9%), C (3%) y D (2%).<sup>23</sup>

Por los resultados de la investigación se espera que los pacientes con genotipo C experimenten con mayor intensidad a la respuesta al tratamiento y un peor pronóstico en comparación con aquellos infectados con genotipo B. Los pacientes con genotipo A experimentan con mayor frecuencia normalización de los niveles de alanina aminotransferasa (ALT), eliminación de ADN viral, y eliminación de HBsAg que los pacientes con genotipo D.<sup>29</sup> Entonces debido a la importancia clínica del genotipo infeccioso, es probable que el genotipado de la hepatitis B se solicite cada vez más en la evaluación clínica y antes del tratamiento de las personas infectadas.<sup>26</sup>

### **4. Variantes genéticas de la polimerasa viral**

La hepatitis B crónica han aumentado en los últimos años, pero la incertidumbre en los tratamientos antivirales se debe fundamentalmente a la presencia de mutaciones en la P, que son las responsables de la resistencia de dicha enzima. Las mutantes de VHB resistentes al tratamiento antiviral presentan mutaciones puntuales en los subdominios A, B o C del gen P.<sup>30</sup> En análisis in vitro se ha demostrado que las mutaciones en la región YMDD (tirosina, metionina, aspartato, aspartato) de la transcriptasa reversa en las posiciones 204(rtM204V/I) y 180 (rtL180M) confieren resistencia a lamivudina (LAM). La mutación rtM204I por sí sola es capaz de causar resistencia a LA, mientras que rtM204V suele acompañarse de rtL180V.<sup>31</sup>

En un estudio de 181 pacientes expuestos a LAM (87% con mutaciones de resistencia), en la semana 90 se identificaron sólo 2 pacientes con mutaciones de resistencia a entecavir (ETV) son portadores de las mutaciones rtL180M; rtM204V; rtM250V y rtL180M; rtM204V; rtT184G; rtS202I, respectivamente. <sup>31</sup>

La resistencia a VHD se asocia con la presencia de las mutaciones rtN236T y/o rtA181V/T. La primera esta compartida con el tenofovir (TDF) y cambia la configuración del bolsillo de unión a las drogas. Además pueden aparecer otras mutaciones secundarias como rt181T; rtV214A y rtQ215S. <sup>30</sup>

## **D. Marcadores Serológicos**

### **1. Antígeno de superficie (HBsAg)**

El HBsAg, inicialmente denominado antígeno que expresa el virus de la hepatitis B, aparece 6-8 semanas tras la exposición al virus y puede encontrarse en el periodo de incubación. Es el marcador serológico más importante para diagnosticar tanto la infección aguda como crónica y de hecho, la duración de su periodo de detección determina el criterio de cronicidad. Su presencia indica producción de la envuelta vírica; si la evolución es favorable, desaparecerá paulatinamente y si persiste a los 6 meses, se considera que se trata de una infección crónica. <sup>16</sup>

La existencia de casos con producción prácticamente indetectable de HBsAg, pero en los cuales se detecta ADN vírico circulante, por lo cual en concentraciones bajas, detectables sólo por las técnicas más sensibles, como la PCR en tiempo real. En estos casos sí se suele detectar, en cambio, la presencia de anticuerpos anti-HBc. Constituirían las que se han venido denominando “hepatitis B ocultas”, ya que no son detectadas por el método convencional de diagnóstico, que es la positividad del HBsAg. <sup>16</sup>

### **2. Anticuerpo de superficie (HBsAc)**

El Anticuerpo de superficie, aparece semanas después de la normalización analítica y de la desaparición del HBsAg. Hay una fase en la que no se detecta “periodo ventana”. Su positividad indica inmunocompetencia e inmunoprotección frente VHB. <sup>32</sup>

### **3. Antígeno del core (HBcAg)**

El HBcAg es un antígeno intracelular que no se detecta en suero. <sup>13</sup>

### **4. Anticuerpo del core (HBcAc)**

El HBcAc es el primer anticuerpo que va dirigido contra los epítomos del antígeno core. Aparece con los primeros síntomas clínicos y permanecerá positivo

independientemente de la evolución de la infección. Se trata de una proteína más sensible de contacto con el VHB, pero también del menos específico. <sup>13</sup> Puede detectarse de manera aislada en el periodo de recuperación de una hepatitis B, en el periodo de seroconversión de HBsAg a HBsAc, aunque no se trata de un hallazgo frecuente porque la duración de esta fase suele ser muy corta. También puede detectarse aislado en pacientes donde la infección se ha resuelto pero no existe seroconversión. Su detección significa contacto previo o actual con VHB. El HBcAc IgM indica infección aguda, persiste 12-18 meses y puede positivizarse en algunas hepatitis B crónicas con replicación vírica. <sup>32</sup>

### **5. Antígeno e (HBeAg)**

El HBeAg se produce en los hepatocitos durante la replicación vírica. Es detectado en la fase aguda y en algunas hepatitis B crónicas activas. Es un marcador de replicación vírica, y su desaparición junto con la aparición de HBeAc indica buen pronóstico. Puede no aparecer en algunas hepatitis crónicas replicativas debidas a mutantes pre-Core que tienen peor pronóstico. <sup>32</sup>

### **6. Anticuerpo e (HBeAc)**

El HBeAc aparece en el curso de una infección aguda, generalmente, buen pronóstico y disminución de la infectividad. Encuentra su principal utilidad clínica como índice del grado de infecciosidad. Su determinación está indicada sobre todo en el seguimiento de la infección crónica. <sup>33</sup>

## **E. Historia natural de virus de hepatitis B**

### **1. Hepatitis aguda**

Los rangos de la infección aguda son entre 6 -10 semana comienza la aparición de los marcadores HBsAg y HBeAg, mientras que el ADN viral puede ser detectado con mayor sensibilidad en suero a partir de los 21 días antes de la aparición de los antígenos mencionados. Posteriormente, el individuo infectado exhibe un incremento de los niveles séricos de las transaminasas hepáticas y alrededor de la semana 10 pueden aparecer síntomas inespecíficos (Fatiga, náuseas, ictericia, etc). En esta etapa comienzan a detectarse en suero los anticuerpos tipo IgM anti-HBc. <sup>34</sup>

### **2. Hepatitis crónica**

Es una patología que se caracteriza por su grado de cronicidad y estado terminal según los criterios de la (Asociación Americana para el Estudio del Hígado). <sup>13</sup>

- HBsAg positivo superior a los 6 meses.
- DNA VHB > 10<sup>5</sup> copias/ml.

- Elevación de transaminasas de forma persistente o intermitente.
- Biopsia hepática demostrado actividad necroinflamatoria.

En un 5% de los pacientes persistirá el HBsAg circulante y el ADN vírico, por lo que se establece una infección crónica en cuya patogenia influyen 3 factores: el sistema inmune, el tejido hepático y el virus.<sup>16</sup>

## **F. Método para la detección del VHB**

### **1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es ampliamente empleada en la detección y en la cuantificación de virus, siendo un avance importante para el manejo de infecciones crónicas por virus, en especial, para infecciones por VHI, VHB y VHC<sup>7</sup>. Debido a que mediante la técnica de PCR es posible amplificar un segmento de ADN viral de manera exponencial, donde después de cada ciclo la cantidad de ADN se duplica.<sup>7</sup>

Dado que la reacción de PCR en sus inicios amplifica el ADN de manera eficiente, existe una correlación entre el ADN de partida y el ADN formado durante la fase exponencial, mediante el cual es posible cuantificar la cantidad de ADN.<sup>35</sup>

### **2. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR - RT)**

Por otro lado, el avance tecnológico ha permitido mejorar el proceso de adquisición de datos. Su objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de una única copia, la adquisición de datos es mediante el empleo de una variedad de fluoróforos como los intercalantes y sondas.<sup>36, 37</sup>

#### **2.1. Genotipificación mediante curvas de disociación**

La curva de disociación permite conocer si la señal obtenida en el gráfico de amplificación corresponde al patógeno. En las muestras negativas sólo aparece el pico correspondiente al control interno de amplificación.<sup>38</sup>

El método denominado de curvas de disociación es un método simple, rápido y de bajo coste que se usa para la identificación de variaciones en secuencias de ácidos nucleicos (por ej. SNP, mutaciones, metilación).<sup>39</sup> El método se basa en la caracterización de los productos de la PCR de acuerdo al comportamiento de disociación de hebras, o dicho de otra manera, se basa en las características de desnaturalización térmica de los amplicones. Las variaciones en las secuencias son detectadas tanto por un cambio en la Tm como por un cambio en la forma de la curva de disociación.<sup>40</sup> Esto es posible gracias a la introducción de fluorocromos de unión a doble cadena de DNA de tercera generación y a la incorporación de instrumentos de PCR a tiempo real con un sistema de control de temperatura

preciso y una capacidad de captura de datos avanzada. Los datos son analizados y manipulados con programas diseñados específicamente para el análisis. <sup>41</sup> Los aspectos más importantes a considerar en un análisis son:

- **Química.** El análisis utiliza fluorocromos de tercera generación. Son fluorocromos que presentan una baja toxicidad en las reacciones de amplificación y por tanto pueden ser usados a mayores concentraciones que los convencionales para conseguir una mayor saturación de las muestras de ADN de doble cadena. No interfieren con la reacción de la PCR.
- **Instrumentos.** El análisis requiere instrumentos que recolecten datos de fluorescencia a una resolución de temperatura muy fina.
- **Software.** El análisis requiere un programa más sofisticado que use nuevos algoritmos. <sup>41</sup>

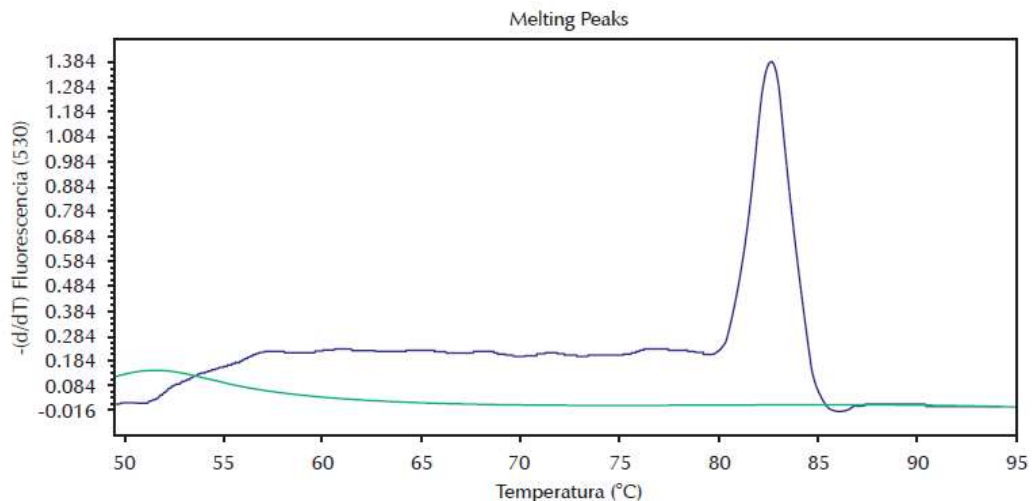


Figura 6. Pico de amplificación que corresponde a la curva de disociación o curva melting que indica la especificidad de la reacción, es decir, que los amplicones que se formaron son del tamaño esperado. La línea de abajo corresponde al control negativo, el cual no amplificó. (Fuente: Tamay de Dios L, et al, 2013)

En el análisis es elegir el tipo de cuantificación que se usará para determinar la amplificación precisa del blanco génico; este procedimiento depende de los intereses del investigador. Para ello existen dos tipos de cuantificación: la absoluta y la relativa. <sup>37</sup> La cuantificación relativa se aplica cuando se desean evaluar los cambios en la expresión de genes en distintos estados fisiológicos. Los datos son expresados como relativos al gen de referencia y generalmente son referidos como el número de veces en el que aumentaron o disminuyeron los niveles de ARNm o en su caso, si no hubo cambios. <sup>37,42</sup> Cualquiera que sea el tipo de cuantificación que se elija, casi todo el software de los equipos están posibilitados



para llevar a cabo los análisis matemáticos y estadísticos que se requieren en cada tipo de cuantificación.<sup>43</sup>

El análisis de la curva de fusión puede llevarse a cabo en la mayoría de plataformas disponibles para la PCR en tiempo real, por lo general al final de la reacción de amplificación.<sup>38</sup> La medida de la fluorescencia dependiente de la temperatura se realiza mientras la temperatura en el termociclador aumenta de alrededor de 50°C a 95°C, siendo la fluorescencia detectada dependiente de la presencia de secuencias de doble cadena de ADN o ADNc. Cuando las dobles cadenas de ADN o ADNc se separan por efectos de la temperatura, la fluorescencia disminuye porque el colorante deja de estar unido al producto de la PCR.<sup>38,44</sup>

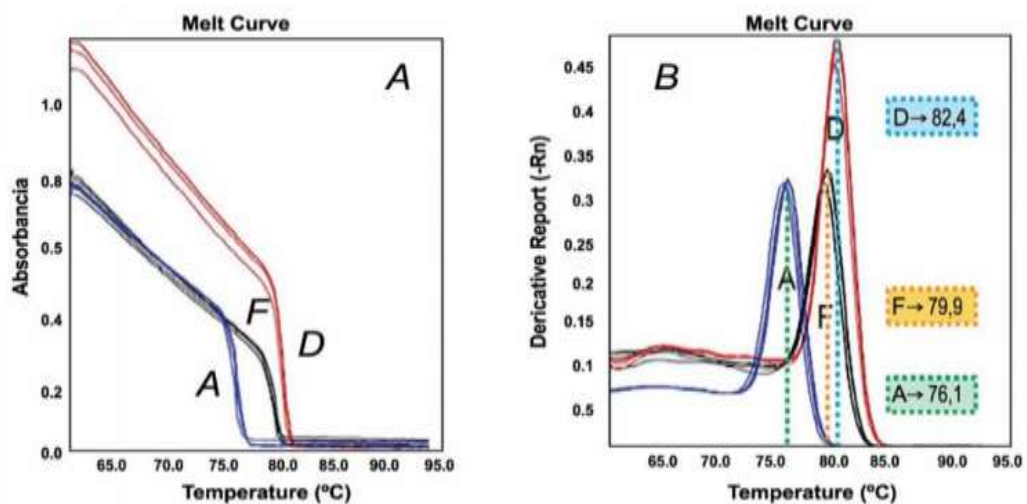


Figura 7. Curvas de Temperatura de fusión (melting curve) para VHC y VHB. Se observa la formación de dímeros de cebadores (primer dimers) para el control de reactivos. (Fuente: Becker C, et al, 2010)

### G. Importancia de la georreferenciación

La georreferenciación es una herramienta importante que está en los desarrollos tecnológicos de los Sistemas de Geoposicionamiento Global (GPS) y de los Sistemas de Información Geográfica (SIG), Para georreferenciar los datos de un área, es necesario tener un mapa en las mismas unidades de esos datos.<sup>51</sup>

En los estudios en salud es frecuente tener información registrada con direcciones (de residencia, lugar de trabajo o escuela) provenientes de los estudios de tipo cohortes de participantes o de una lista de pacientes de una clínica.<sup>51</sup> Las direcciones son la información más difícil de ser georreferenciada y para hacerlo es necesario tener un mapa detallado de las calles y los números de las casas en

cada segmento de calle. Un problema adicional en la georreferenciación de direcciones es que el acceso a mapas detallados de las calles puede ser muy costoso y desactualizada fácilmente. La importancia del mapeo de enfermedades, cuya meta es producir mapas con la distribución más confiable de la enfermedad. Problemas de grupos de enfermedades con un enfoque en la identificación de áreas de elevado riesgo de enfermedad. <sup>51</sup>

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1. Ubicación**

El presente trabajo de investigación se ejecutó en los Laboratorios de Biología Celular y Molecular de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga (preparación y codificación para el transporte de las muestras de suero) y en el Laboratorio de Biología Molecular de la Sede central del Instituto Nacional de Salud Lima - Perú.

### **3.2. Fase pre – analítica**

#### **3.2.1. Recolección de información de la base de datos del laboratorio**

- Se recolectó información epidemiológica de pacientes crónicas con resultado positivo a HBsAg a partir de las fichas clínico - epidemiológicas del Laboratorio de Referencia Regional de Ayacucho.
- Se ubicó los sueros en la seroteca por código representado por doce dígitos en números de cada muestra proporcionado por el Laboratorio de Referencia Regional en la base de datos de la computadora.

#### **3.2.2. Recolección de muestras de suero**

- La obtención y selección de muestra fue por conveniencia, siendo las muestras consideradas de entre enero hasta diciembre del 2016 registrados en la base de datos de la seroteca del Laboratorio de Referencia Regional de Ayacucho. El trabajo de recolección de datos se realizó previa constancia de autorización (Ver anexo) del Laboratorio de Referencia Regional, lográndose el mes de marzo del 2017 la mencionada documentación, luego las muestras fueron conservadas a - 20°C entre marzo a julio del 2017 para su posterior análisis.
- Los criterios de inclusión: Sueros correspondientes a pacientes crónicos de hepatitis B con mayor de 6 meses de infección que acudieron al servicio del Laboratorio de Referencia Regional en Salud Pública (DIRESA) para su respectivo análisis y que resultaron con serología positiva a HBsAg por las técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas e IgM negativos.
- Los criterios de exclusión: Suero de pacientes con serología negativa o indeterminado a HBsAg y/o carga viral indetectable.
- La muestra seleccionada fue descongelada y alicuotada en volumen de 500 µl conservando sus códigos respectivos.

### **3.2.3. Preparación de las muestras para su transporte**

Una vez realizado la obtención de muestras se llevaron a un criovox respectivo a 4°C.

## **3.3. Fase analítica**

### **3.3.1. Metodología**

- Para el desarrollo de la investigación de tipo descriptivo. Se realizó la extracción utilizando el kit comercial de extracción de ADN Invitrogen - PureLink® Genomic DNA así mismo el PCR tiempo real se realizó en el termociclador LightCycler® 480 empleando los cebadores u oligonucleótidos (tabla 1) seguido de un análisis con la curva de disociación para el cual se empleó el kit comercial Thermo Fisher Luminare® Thermo Fisher Luminare Color HRM Master Mix #k1031. El presente trabajo de investigación se ejecutó en el Laboratorio de Biología Molecular (Sede central) del Instituto Nacional de Salud Lima - Perú.

### **3.3.2. Instructivo de georreferenciación con google earth.**

- Se inició el software Google Earth® e identificando el área donde está localizado el proyecto de la base de datos de procedencia de la muestra de suero de pacientes por distrito.
- Luego se creó una carpeta con el nombre del proyecto “georreferenciación de procedencia de pacientes” en el directorio (Mis Lugares de Google Earth®).
- Se aseguró que las coordenadas ingresadas de posición de Google Earth® estén en UTM (huso 19): Para predeterminedar que las coordenadas de posición se muestren en el sistema UTM se ingresó al menú de “Herramientas” y se seleccionó el comando “Opciones”. En el cuadro de diálogo dentro de la pestaña de vista 3D, se ingresó la sección de “Mostar lat./long.” y se seleccionó “Universal Transversal de Mercator”. y en “Mostrar elevación” se seleccionó “Metros, kilómetros”.
- Se añadió a la carpeta del proyecto las marcas de posición que corresponden al centro equidistante de los vértices del proyecto total: se dirigió a la barra lateral y se seleccionó la carpeta del proyecto recién creada. Luego se activó la herramienta de “Marca de Posición” para crear los puntos uno por uno. Se abrió el cuadro de diálogo de nueva marca de posición. En la casilla de nombre se digitó el identificador del proyecto.

- Importante: con las acciones descritas se logró auto completar los casilleros destinados a alojar las coordenadas georreferenciadas de los proyectos con el sistema de información geográfica del Instituto Nacional de Estadística e Informática.
- Se guardó la carpeta del proyecto como archivo KML de Google Earth®: se dirigió a la “Barra lateral”. Se buscó dentro del contenido de “Mis Lugares” la carpeta con el nombre del proyecto. Se Seleccionó con un clic luego, con el segundo botón del ratón se activó el menú contextual. Se seleccionó el comando “Guardar lugar como”. Se activó un cuadro de diálogo que nos permitió guardar todo el contenido de la carpeta del proyecto como documento KML.
- Se agregó las coordenadas obtenidas por Google Earth® en el software ArcGIS® en donde se elaboró el mapa de georreferenciación de procedencias de pacientes con HBsAg positivos.

### **3.3.3. Extracción de ADN**

- Se realizó la extracción de ADN viral utilizando el kit comercial Invitrogen - PureLink® Genomic DNA - Thermo Fisher. A continuación se detalla la extracción de ADN viral:
- Se colocó en un baño de agua o un bloque de calor a 55 °C.
- A un tubo de microcentrífuga estéril, se agregó 200 µl de muestra de suero.
- Se agregó 20 µl de proteinasa K a la muestra.
- Se adicionó 20 µl de RNasa A a la muestra, luego se homogenizó con vortex e incubó a temperatura ambiente por 2 minutos.
- Se agregó 200 µl de la solución de ligación se mezcló el homogenizado con el vortex.
- Se incubó a 55 °C durante 10 minutos para promover la digestión de proteínas.
- Se agregó 200 µl de etanol al 96% al lisado. Mezcle bien mediante agitación vertical durante 5 segundos para producir una solución homogénea.
- Se procedió inmediatamente con la unión del ADN
- Se colocó la columna de sílica de centrifugación PureLink® en un tubo de recogida.
- Se agregó el lisado 640 µl preparado con solución de ligación y etanol a la columna de centrifugación.

- Se centrifugó la columna a 10,000 × rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente.
- Se desechó el tubo de recolección y se colocó nuevamente la columna de sílica en un tubo limpio PureLink® de recogida.
- Se continuó con el lavado de ADN.
- Se agregó 500 µl de tampón de lavado 1 preparado con etanol a la columna.
- Se centrifugó la columna de sílica a temperatura ambiente a 10,000 × rpm por 1 minuto.
- Se desechó el tubo de recolección y se colocó la columna giratoria en un PureLink® limpio tubo de recolección.
- Se agregó 500 µl de tampón de lavado 2 preparado con etanol a la columna.
- Se centrifugó la columna a velocidad máxima durante 3 minutos a temperatura ambiente y se desechó el tubo de recolección.
- Proceda a ADN de elución.
- Se colocó la columna giratoria en un tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 ml.
- Se agregó 30 µl de tampón de elución Genomic PureLink® a la columna.
- Se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto. Luego se centrifugó la columna a velocidad de 13,000 x rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente. El tubo contiene purificado ADN genómico.
- Se realizó el mismo paso anterior para recuperar más ADN, utilizando la misma elución centrifugue la columna a velocidad de 13,000 x rpm durante 1 minutos.
- El tubo contiene ADN purificado. Se desechó la columna de sílica.
- Se almacenó el ADN purificado a - 20 °C.

#### **3.3.4. Determinación de la calidad y concentración de ADN**

La cuantificación y evaluación de la calidad de ADN se realizó en los laboratorios de Leishmaniosis (Sede central) del Instituto Nacional de Salud Lima - Perú. Para ello se empleó el agua de PCR y la solución tampón de elución como muestra blanco, completado el proceso de baqueado se tomó 2 µl de la muestra de ADN total de las muestras serológicas, la densidad óptica empleada fue 230, 260, 280 nm. La concentración de ADN fue determinado mediante 260nm mientras que la

calidad de ADN fue determinado por la relación 260/280 nm y 230/260 Si ésta es aproximadamente 2 (de 1,6 a 2) la absorción es mayoritariamente debida a ácidos nucleicos. Si es menor a 1,6 hay proteínas u otras moléculas que absorben a la misma longitud de onda en la muestra y es recomendable repetir la extracción con fenol/cloroformo y precipitación con etanol.

### 3.3.5. PCR en tiempo real

Se procedió en el Laboratorio de Biología Molecular (Sede central - sección de PCR) del Instituto Nacional de Salud Lima - Perú.

Se desarrolló según las recomendaciones manual disponible en el kit comercial Thermo Fisher Luminare® Thermo Fisher Luminare Color HRM Master Mix #k1031 y los cebadores para la amplificación correspondiente al gen P viral (tabla 1). El proceso de PCR se realizó en un volumen de reacción de 10µl y estuvo constituido por 1X Thermo Fisher Luminare Color HRM Master Mix, 4µl de ADN viral, 10µM de cada cebador y 0,5 µl de agua de PCR libre de RNAsas, las reacciones fueron llevadas al termociclador donde se generó para el control de la temperatura con una denaturación inicial a 95 °C por 10 min. Se Estableció 45 ciclos y se programó: denaturación a 95 °C por 10 s, alineamiento a 53°C por 30 s, extensión a 72 °C por 30 s y la extensión final a 72 °C por 1 min.

Tabla 1. Descripción de los cebadores. (Fuente: Yang H, et al, 2008).

Cebador	Secuencias	Tm	Use
Para el PCR tiempo real			
Primer RT-VHB-F	5'-CCG ATC CAT ACT GCG GAA C-3'	57.5 °C	F-genotyping
Primer RT-VHB-R	5'-GCA GAG GTG AAG CGA AGT GCA -3'	57.5°C	R-genotyping

### 3.3.6. Obtención de las curvas de disociación

El progreso de pos PCR para la obtención de las curvas disociación que se realizó solo a las muestras que amplificaron en el PCR tiempo real y consistió en el incremento controlado de temperatura y con la finalidad de obtener las curvas de disociación.

Estas curvas de disociación fueron generadas de manera dependiente a la proporción A-T y G-C propio de cada secuencia de nucleótidos del gen P de un genotipo específico. Estas curvas de disociación fueron generadas



mediante el incremento progresivo de temperatura desde 53 hasta 95 °C con una tasa de transición de 0,1 °C/s.

#### **3.4. Fase Post Analítica**

El análisis estadístico de la población en estudio se consideró las variables edad, sexo y procedencia, empleando el programa de Excel. La curva de disociación y el análisis cuantitativo se realizó utilizando el software de análisis LightCycler® 480 se siguió las instrucciones del fabricante (Roche Diagnostics Applied Science).

#### **IV. RESULTADOS**

Tabla 2. Umbral de amplificación (Ct) de las muestras incluidas en el estudio obtenidos por PCR en tiempo real y concentración de ADN total de todas las muestras de suero obtenidos por cuantificación en Nanodrop 2000c.

Posición de la muestra en la placa de PCR.	Código de las muestras	Umbral de amplificación (ct)	Concentración de ADN ng/μl
A1	1	34,68	15,8
B1	2	32,57	7,4
C1	3	40,5	8,4
D1	4	34,67	6,9
E1	5	31,09	10
F1	6	31,3	14,3
G1	7	36,49	9,2
H1	8	31,57	18,7
A2	9	28,71	17,1
B2	10	30,49	12
C2	11	36,54	8,8
D2	12	34,13	8,9
E2	13	-	11,4
F2	14	-	19
G2	15	-	14,7
A3	16	-	21,5
B3	17	30,18	10,7
C3	18	30,54	12,6
D3	19	-	16,4
E3	20	28,5	13,3
F3	21	33,54	12,8
G3	22	37,21	5,4
H3	23	34,28	2,3
A4	24	33,26	2,1
B4	25	37,6	2
C4	26	32,6	8,4
D4	27	30,03	11
E4	28	31,31	10
F4	29	-	-
G4	30	41,17	6,8
A5	31	39,14	13,4
B5	32	31,28	12,3
C5	33	31,63	12,7
D5	34	31,33	15,3
E5	35	27,33	16,2
F5	36	37,63	7,5
G5	37	41,42	4,6
H5	38	33,59	3,3
A6	39	-	-
B6	40	26,75	12,9
H2	41	-	-
H4	42	-	-
C6	43	-	-
D6	44	-	-

Tabla 3. Genotipado por curvas de disociación (Melt Curve Genotyping) de PCR en tiempo real de muestras de suero de HBsAg positivos de la seroteca del Laboratorio de Referencia Regional de Ayacucho - 2017.

<b>Posición de la muestra en la placa de PCR</b>	<b>Código de las muestras</b>	<b>Grupos</b>	<b>Índice de similitud</b>	<b>Resolución</b>
A1	1	F	1,00	1,00
B1	2	F	1,00	0,96
D1	4	2	0,15	0,15
E1	5	F	0,74	0,62
F1	6	F	1,00	1,00
G1	7	2	0,46	0,46
H1	8	F	1,00	1,00
A2	9	F	1,00	0,96
B2	10	F	1,00	1,00
C2	11	2	0,45	0,45
D2	12	F	1,00	1,00
B3	17	F	1,00	1,00
C3	18	F	1,00	1,00
E3	20	F	1,00	1,00
F3	21	3	1,00	1,00
G3	22	2	1,00	0,99
H3	23	F	1,00	1,00
A4	24	3	1,00	1,00
B4	25	2	0,34	0,34
C4	26	F	1,00	1,00
D4	27	F	1,00	1,00
E4	28	F	1,00	1,00
B5	32	F	1,00	1,00
C5	33	F	1,00	1,00
D5	34	F	1,00	1,00
E5	35	F	1,00	1,00
F5	36	2	0,63	0,63
H5	38	F	1,00	1,00
B6	40	F	1,00	1,00

Tabla 4. Grupo de genotipo F de VHB determinado por PCR tiempo real de las muestras de suero de HBsAg positivos de la seroteca del Laboratorio de Referencia Regional de Ayacucho - 2017.

<b>Posición de la muestra en la placa de PCR</b>	<b>Código de las muestras</b>	<b>Genotipos F</b>	<b>Índice de similitud</b>	<b>Resolución</b>
A1	1	F	1,00	1,00
B1	2	F	1,00	0,96
E1	5	F	0,74	0,62
F1	6	F	1,00	1,00
H1	8	F	1,00	1,00
A2	9	F	1,00	0,96
B2	10	F	1,00	1,00
D2	12	F	1,00	1,00
B3	17	F	1,00	1,00
C3	18	F	1,00	1,00
E3	20	F	1,00	1,00
H3	23	F	1,00	1,00
C4	26	F	1,00	1,00
D4	27	F	1,00	1,00
E4	28	F	1,00	1,00
B5	32	F	1,00	1,00
C5	33	F	1,00	1,00
D5	34	F	1,00	1,00
E5	35	F	1,00	1,00
H5	38	F	1,00	1,00
B6	40	F	1,00	1,00

Tabla 5. Genotipado por curvas de disociación VHB grupo 2 y 3 con diferentes Tm de PCR en tiempo real de muestras de suero de HBsAg positivos de la seroteca del Laboratorio de Referencia Regional de Ayacucho - 2017.

<b>Posición de la muestra en la placa de PCR</b>	<b>Código de las muestras</b>	<b>Grupos</b>	<b>Índice de similitud</b>	<b>Resolución</b>
D1	4	2	0,15	0,15
G1	7	2	0,46	0,46
C2	11	2	0,45	0,45
F3	21	3	1,00	1,00
G3	22	2	1,00	0,99
A4	24	3	1,00	1,00
B4	25	2	0,34	0,34
F5	36	2	0,63	0,63

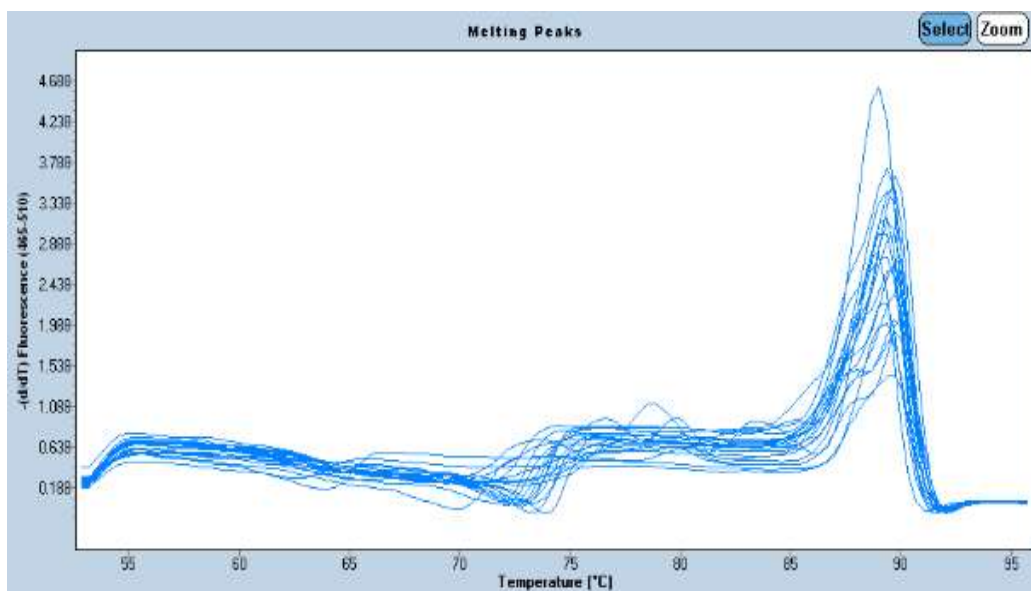


Figura 8. Temperatura de fusión principal ( $T_m = 87,5^{\circ}\text{C}$ ) del genotipo F, obtenido por el análisis de la curva de disociación.

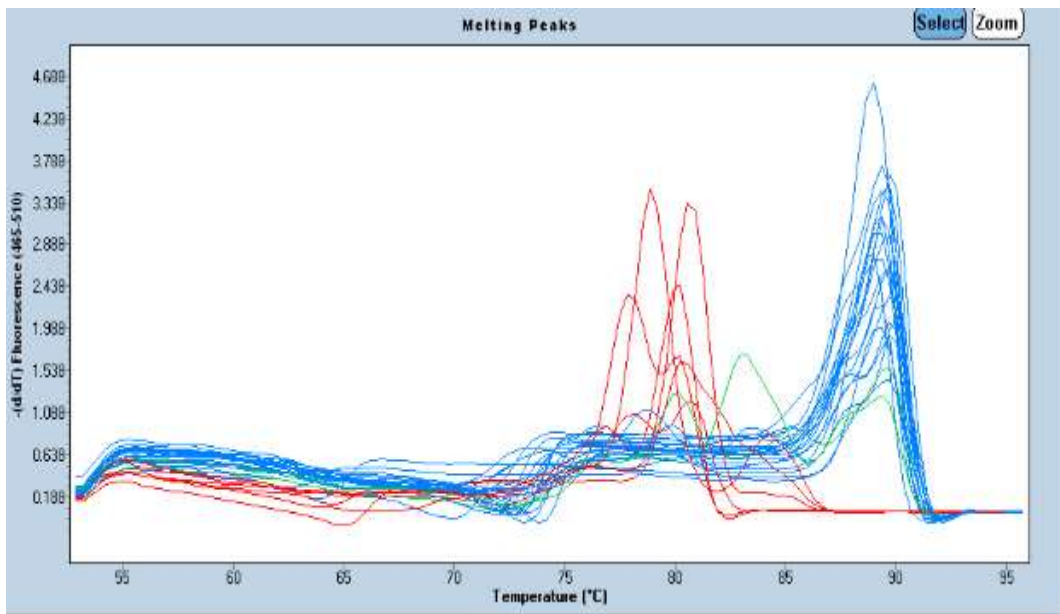


Figura 9. Temperatura de fusión del genotipo F (color azul), del grupo 2 (color rojo), y grupo 3 (color verde).



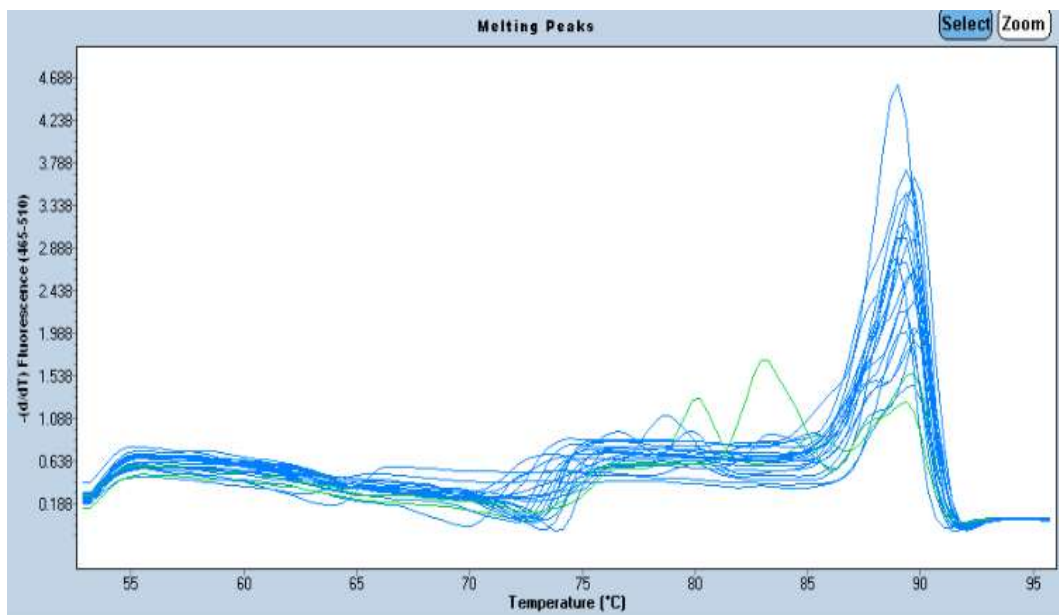


Figura 10. Temperatura de fusión del genotipo F (color azul) y del grupo 3 (color verde)

Tabla 6. Coordenadas de la procedencia de pacientes con VHB, puntos N° 4; 7; 11; 21; 22; 24; 25 y 36 representan los sueros con diferentes temperaturas de fusión (Tm), Ayacucho, 2017.

Coordenadas de la procedencia de pacientes				
N° de Código	Provincia	Procedencia/Distrito	Coordenadas UTM	
			X	Y
1	Ocros	Ocros	603,802	8,538 492
2	Huamanga	Ayacucho	584,120	8,544 539
3	Huamanga	Ayacucho	584,120	8,544 539
4	Huamanga	Ayacucho	584,120	8,544 539
5	Huamanga	S.J.Bautista - Olivos	585,678	8,543 151
6	Huanta	Santillana	587,519	8,604 158
7	La Mar	Ayna-S. Francisco	587,519	8,544 091
8	Huamanga	Tambillo -Sta. Ines	587,062	8,544 091
9	La Mar	Ayna	587,519	8,544 091
10	Cangallo	Cangallo	587,076	8,501 034
11	La Mar	Santa Rosa	637,171	8,597 027
12	Huamanga	Jesus Nazareno	584,738	8,545 631
13	Huanta	Huanta	581,269	8,569 683
14	Ocros	Ocros	603,802	8,538 492
15	Huanta	Huanta-Quintara	581,269	8,569 683
16	Huanta	Huamanguilla	589,614	8,561 450
17	La Mar	Samugari	643,527	8,587 670
18	Huamanga	Acosvinchos	596,811	8,549 844
19	Huancasancos	Pampas	571,888	8,460 994
20	Cangallo	Cangallo	587,076	8,501 034
21	La Convencion	Kimbiri	631,461	8,604 996
22	Huanta	Luricocha - Intay	578,688	8,572 480
23	Huanta	Llochegua - Villa virgen	618,866	8,627 617
24	Huamanga	A.A.Cáceres	586,782	8,545 562
25	Cangallo	Cangallo	587,076	8,501 034
26	Huanta	Uchuruccay	596,410	8,582 020
27	Huamanga	Acosvinchos - Huaychao	604,209	8,543 866
28	Huanta	Huanta	581,269	8,569 683
29	Huamanga	Acosvinchos	596,811	8,549 844
30	Huamanga	Pacaicasa - Huayllapampa	584,400	8,553 968
31	La Mar	Anco - Iran	641,974	8,549 472
32	Huamanga	Chiara-Bella Vista	585,071	8,531 548
33	Huamanga	Ayacucho	584,120	8,544 539
34	Huamanga	Carmen Alto	584,808	8,542 906
35	Huamanga	S.J.Bautista - Olivos	585,616	8,543 535
36	Huamanga	S.J.Bautista - Olivos	585,616	8,543 535
37	La Mar	Tambo	605,983	8,567 382
38	La Mar	San Miguel	610,499	8,561 215
39	Huanta	Llochegua	618,866	8,627 617
40	Huamanga	Tambillo	587,062	8,501 034

Tabla 7. Número de pacientes con VHB, por provincias de la región de Ayacucho, enumerados en orden descendente, representa HBsAg positivos de la seroteca del Laboratorio de Referencial Regional de Ayacucho - 2017.

<b>N° de orden</b>	<b>Provincias</b>	<b>Cantidad</b>
1	Huamanga	17
2	Huanta	9
3	La Mar	7
4	Cangallo	3
5	Ocros	2
6	Huancasancos	1
7	La Convención ( Cusco)	1



Figura 11. Mapa de georreferenciación de procedencia de pacientes con VHB crónicos de la seroteca del Laboratorio de Referencia Regional de Ayacucho - 2017.

## V. DISCUSIONES

### 5.1. Extracción de ADN

La edad promedio de los pacientes fue de 29,5 años, las mujeres representaron el 92,5% de la muestra.

De acuerdo a la tabla 2, se muestra el umbral de amplificación (Ct) de las muestras incluidas en el estudio obtenido por PCR en tiempo real y concentración de ADN total de todas las muestras de suero obtenidos por cuantificación en Nanodrop® 2000c. En la extracción de ADN de la seroteca del Laboratorio de Referencia Regional de Ayacucho se lograron extraer 38 muestras. Se observó diferentes concentraciones de ADN de las muestras en estudio. El fundamento de extracción de ADN según el kit comercial Invitrogen - PureLink® Genomic DNA - Thermo Fisher se basa en la capacidad de adsorción de los ácidos nucleicos en una columna de sílice ante la presencia de altas concentraciones de sales caotrópicas. Los contaminantes del ADN extraído fueron removidos por lavados en la columna de sílice y por último el ADN fue eluído con agua de PCR.

Soto, et al (2015) en el estudio de variantes de escape del virus de Hepatitis B señala que en su trabajo la variación en la extracción de ADN está determinado por dos factores temperatura y tiempo de preservación. <sup>9</sup> De igual forma en un trabajo de investigación de Spin (2008) sobre estandarización de la reacción en cadena de la polimerasa para detección del virus de hepatitis B observó curvas de amplificación positivas para aquellas muestras que se mantuvieron a -20 °C. <sup>53</sup>

### 5.2. PCR tiempo real

El análisis de los datos se traduce en la evaluación de las curvas de amplificación que representan la fluorescencia detectada versus el número de ciclos de PCR (anexo - figura 12). El PCR tiempo real está determinado por la identificación del número de ciclo al cual la intensidad de emisión del fluoróforo aumenta con respecto al ruido de fondo (*background*). <sup>44</sup>

En la tabla 2 también se observó las muestras que fueron amplificadas por el PCR en tiempo real utilizando el fluoróforo “Eva Green” y se colectaron los datos en la fase exponencial con un Ct promedio de 27 para el primer amplicón. Las muestras de ADN en estudio resultaron que el 82,5 % amplificaron y el 17,5% no amplificaron, probablemente por una baja concentración de ADN u otros factores en el proceso de extracción.

De acuerdo a (anexo - figura 19) en las muestras NTCs (sin control de ADN) la ausencia de amplificación es determinante en el control de calidad y en la veracidad del experimento. Con los resultados obtenidos anteriormente se descartó la contaminación por diferentes factores en el proceso de PCR donde se tomaron las precauciones correspondientes.

Los resultados obtenidos concuerdan con el instructivo de Applied Biosystems StepOne® donde el producto amplificado detectado en muestras NTCs no se observan de manera significativa su amplificación. Sin embargo la presencia de dímeros de cebadores en sólo las muestras NTCs y no en las muestras de estudio indica que la amplificación del ADN problema por la polimerasa se ve favorecida frente a los dímeros de cebadores, evitando así el uso de los mismos con los que interactúa en ausencia de ADN de la muestra. <sup>43</sup>

### **5.3. Curvas de disociación**

Según Gallego, et al (2012) en el estudio de análisis de variación genética mediante el método de HRM (High Resolution Melting) el análisis de la curva de disociación se basa en una temperatura de fusión en la cual la mitad de las moléculas de ADN están en forma de cadena simple y la otra mitad en forma de doble hélice. <sup>41</sup>

De acuerdo a la tabla 3, genotipado por curvas de disociación de PCR en tiempo real de muestras de suero de HBsAg positivos, estos fragmentos se analizaron mediante curvas de disociación con detección de amplificaciones con un patrón idéntico en la reacción. Los criterios de inclusión para el análisis de curvas de disociación fueron tomar valores de Ct menores a 40, por tanto para el grupo I, 21 muestras resultaron con un sólo patrón idéntico en el análisis de la curva de disociación, con una temperatura de fusión específica ( $T_m = 87,5 \pm 0,15$  °C) para cada fragmento amplificado (figura 8). Para el grupo II, se encontró 8 muestras con diferente patrón de curvas de disociación ( $T_m = 80,5 \pm 0,36$  °C) donde se observó claramente la presencia de dímeros de cebadores (figura 9) y para el grupo III, un amplicón diferente al resto de las muestras de suero analizadas con un

( $T_m = 83,34 \pm 0,13^\circ\text{C}$ ) este mostró a un grupo desconocido diferente al virus de Hepatitis B circulante en Ayacucho (figura 10).

En la tabla 4, se determinó el grupo de genotipo F ( $T_m = 87,5^\circ\text{C}$ ), se analizó con las curvas de disociación de muestras de suero de HBsAg positivos donde se observó las curvas de disociación con un índice de similitud y resolución del 100% para el grupo I, confirmándose que corresponde al genotipo F.

Los resultados obtenidos concuerdan con el trabajo de Becker, et al (2013), en el estudio de genotipificación por curvas melting de genotipos A, D y F en pacientes del Complejo Hospitalar Santa de Misericórdia de Porto Alegre (Brasil) donde utilizaron el análisis de la curva de disociación para la identificación de fragmentos genotipo específicos, fueron analizados por el amplicón perteneciente al gen S, presentando una mayor frecuencia de genotipo D (44,4%), seguido de genotipo A (22,2%) y genotipo F (3,7%).<sup>1</sup>

Según Cortes, et al (2008), el virus de hepatitis B se clasificó en 8 genotipos, el genotipo F se describió como el más divergente que los demás genotipos y se divide en subgenotipos desde (F1 al F4) con divergencia de 4,3% y 6,1%.<sup>25</sup> Con respecto al trabajo de genotipificación de las curvas de disociación con muestras de la seroteca del Laboratorio de Referencia Regional de Ayacucho, se determinó que 21 muestras corresponden al genotipo F y para el grupo III se evaluó cierta variación del patrón principal de las curvas de disociación, esta variación puede referirse a subgenotipos del genotipo F. Como menciona Cortes, et al (2008), existe una variación de secuencia de nucleótidos en un 4,3% de diferencia entre subgenotipos. En un trabajo realizado por Alvarado, et al (2011) caracterizaron genotipos de VHB con fragmentos de 1306 pb que comprende parcialmente HBsAg y las regiones codificantes de la ADN polimerasa, utilizaron el método de PCR tiempo real y luego secuenciaron los fragmentos de ADN respectivos. De todas las muestras, 68 fueron positivas y 52 fueron secuenciadas con éxito. De las cuales el genotipo F fue el más prevalente.<sup>52</sup>

En un estudio realizado por Hajar, et al (2008), genotipificación de virus de hepatitis B, determinaron genotipos presentes en el Perú de VHB en muestras serológicas de Ancash, Ayacucho, Lima, Loreto y Ucayali. Analizaron la región parcial del gen S del genoma viral a partir de doce sueros con antígeno e (HBeAg) positivos. El resultado de estudio indicó la presencia del genotipo F (subtipo adw4).<sup>4</sup>

Roman, et al (2014), reportaron los estudios de filogenia para el genotipo F realizados por los métodos Neighbor-Joining y Maximum Likelihood agrupan estos

genotipos como “hermanas”, cerca de la raíz de muchos árboles filogenéticos debido a sus fuertes similitudes genéticas. Por lo tanto, según esta metodología los genotipos F y H pertenecen a un clado monofilético y pueden ser considerados los ancestros de los demás genotipos de VHB. Demostraron características de importancia médica para el resultado clínico y la respuesta al tratamiento antiviral entre poblaciones humanas tanto en México como en América Central y del Sur.<sup>22</sup> Sheldon, et al (2008) en el análisis in vitro de las muestras de suero se demostró que las mutaciones en la región YMDD (tirosina, metionina, aspartato, aspartato) de la transcriptasa reversa en las posiciones 204(rtM204V/I) y 180 (rtL180M) confieren resistencia a lamivudina (LAM). La mutación rtM204I por sí sola es capaz de causar resistencia a LAM.<sup>31</sup> La variación que se detecta en los amplicones para el grupo III puede deberse a alguna variabilidad en el gen P que generan resistencias genotípicas. Para el grupo II no tiene el nivel de confianza para asegurar que es otro genotipo.

De acuerdo a la tabla 5, genotipado por curvas de disociación VHB del grupo II y III con diferentes temperatura de fusión en muestras de suero de HBsAg positivos de la seroteca del Laboratorio de Referencia Regional de Ayacucho, se determinó para el grupo II muestras con índice de similitud de 0,34 y para el grupo III se presentó una diferencia con un índice de similitud del 100% que tiene una mayor confiabilidad, no obstante para el grupo II no tiene el nivel de confianza para asegurar que es otro genotipo desconocido. La formación de las curvas de disociación fueron lejanas del patrón principal de las curvas. Sin embargo según Sean, et al (2010) las diferentes temperaturas de fusión de las curvas de disociación diferente al amplicón control son producto de una inespecificidad de los cebadores formándose dímeros.<sup>40</sup>

En la tabla 6 se identificó las coordenadas de la procedencia de pacientes con VHB, en los puntos N° 4; 7; 11; 21; 22; 24; 25 y 36 que representaron los sueros con diferentes temperaturas de fusión (Tm). En la región de Ayacucho la procedencia más representativa de los sueros por distrito, fueron en el orden siguiente: Ayacucho, Cangallo y Huanta (anexo - figura 16),

En la tabla 7, se reportó la procedencia de las muestras por provincias. La provincia de Huamanga Huanta y La Mar son de mayor número de muestras analizadas. (anexo - Figura 17). Según Hajar, et al (2008) en el Perú los lugares donde existe endemicidad de virus de VHB son las regiones de Ucayali, Loreto, Lima, Ayacucho.<sup>4</sup>



Yang, et al (2008) en el genotipo y mutantes y el riesgo de Hepatocarcinoma celular, la variación de la curvas de disociación resulta de someter una cierta temperatura a la secuencia del amplicón, por lo tanto el cambio puede estar relacionado a contaminación de ADN, concentración o desnaturalización de la doble hebra de ADN. Además mencionaron la temperatura y el tiempo de almacenamiento juega un papel determinante.<sup>45</sup> En la genotipificación de VHB en Ayacucho se observó un amplicón característico (tabla 4), que corresponde al genotipo F. Para poder evidenciar los cambios de VHB se optó primero observar algunas de las diferencias con el segmento pequeño del gen P y determinar mejor la variación genética del VHB.

Briones (2013) en secuenciación del genoma completo del virus de la hepatitis B en México, logró la amplificación y secuenciación del genoma completo del VHB y detectaron los genotipos F, G y H. Estandarizó la PCR para la amplificación y construyó un árbol filogenético con las muestras de los pacientes, encontrándose el genotipo F con mayor precisión.<sup>49</sup>

En un estudio de Rivas (2008) en caracterización molecular en Colombia de aislados del virus de la hepatitis B (VHB) en muestras de suero de pacientes de dos poblaciones Colombianas, determinaron que de 126 muestras de sueros positivos para el antígeno de superficie, el análisis filogenético reveló que 41 aislados pertenecen al genotipo F, cuatro al genotipo D, uno al genotipo A y uno al genotipo C.<sup>2</sup> De acuerdo a los resultados obtenidos en estudio tanto Colombia como Perú pertenecen a países sudamericanos donde las muestras de suero resultaron similares en su análisis con prevalencia mayor de genotipo F.

Un estudio de Kumar, et al (2008) demostraron la importancia de una coinfección de genotipos del VHB, lo que aumenta la carga viral y mayor riesgo para el desarrollo de hepatocarcinoma celular en el genotipo F tiene mayor riesgo para producir cáncer.<sup>27</sup> Además por las consideraciones señaladas el genotipo F tiene importancia clínica en el trabajo de investigación en genotipificación realizado en el Laboratorio de Referencia Regional de Ayacucho con motivo de investigación por su alta peligrosidad en países sudamericanos donde se relacionó con mayores manifestaciones clínicas y rápida progresión a cáncer de hígado.

## **VI. CONCLUSIONES**

- Se logró la genotipificación de virus de hepatitis B de las cuales 21 muestras analizadas de suero son del genotipo F procedentes de las muestras de la seroteca del Laboratorio de Referencia Regional de la Dirección de Salud Ayacucho -2017.
- Se estandarizó la genotipificación del virus de la hepatitis B genotipo F mediante la obtención de curvas de disociación utilizando la técnica de PCR en tiempo real.
- Se georreferenció la procedencia de pacientes crónicos de Ayacucho, cuyo suero ingreso en el presente estudio siendo Huamanga como provincia donde se presentó mayor cantidad de muestras seguido de Huanta y La Mar, respectivamente.

## **VII. RECOMENDACIONES**

- Se recomienda evaluar la concordancia de los resultados de la genotipificación del VHB mediante el análisis de curvas melting, con métodos moleculares de secuenciación con la finalidad de confirmar el genotipo de VHB por análisis de la secuencia nucleotídica. Es necesario estudios de tipo cohortes para su determinación más exacta en la búsqueda de nuevos genotipos debido a la alta tasa de mutación del VHB en consecuencia con la respuesta a tratamientos antivirales.
- Secuenciar los productos de PCR empleados para la genotipificación del VHB a fin de establecer la presencia de variaciones nucleotídicas o SNP que influyen en la genotipificación del patógeno.
- Diseñar estudios de genotipificación con un mayor número de muestras y con menor tiempo de conservación, con la finalidad de extrapolar los resultados a la región.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Becker C, Kretzmann N, Mattos Â, Veiga A. Melting Curve Analysis For The Screening Of Hepatitis B Virus Genotype A, D and F in Patients from a General Hospital in Southern Brazil. *Arq Gastroenterol.* 2013;50(3):219-25.
2. Rivas Salazar Y. Caracterización molecular de aislados del virus de la hepatitis B (VHB) en muestras de pacientes de dos poblaciones Colombianas [tesis de master]. Colombia: Publicaciones científicas, Universidad de Oriente Nucleo de Sucre; 2008.
3. Colmenares M, Lugo C, Salmen S, Barboza L, Montes H, Berrueta L. Detección y cuantificación del genoma del virus de hepatitis B mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. *Rev. Clin. de la Extensión Portuguesa*; 2008, 2(1):1-5.
4. Hijar G, Suárez M, Padilla C, Cabezas C. Genotipificación de Hepatitis B en pacientes de áreas endémicas del Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública (Peru-INS).* 2007;24(4):427-30.
5. Guardiola Arévalo A. Análisis de las características clínico analíticas, histológicas y evolutivas de la infección crónica por el virus de la hepatitis b, antígeno hbe negativo, según los niveles de gpt al diagnóstico y en la evolución [tesis doctoral]. España: Publicaciones científicas Universidad Autónoma de Madrid; 2013.
6. Restrepo J, Montoya A. Hepatitis B. Editora Med. Colombiana. 2011, 7(1):1-10
7. Cordeiro N, Taroco R, Chiparelli H. Cuantificación del Virus de las hepatitis por la técnica PCR en tiempo real. *Act Med.* 2008; 50:477-514.
8. Alcazar M. Virus de la hepatitis B: estructura y marcadores clínicos. Vol.1. Editora servicio de microbiología, Hospital Doctor Peset España Valencia 2008.
9. Navas C, Jaramillo M. Variantes de escape del virus de la hepatitis B. *SciELO (Col).* 2015;32(2):190-7.
10. Sanchez V, Panduro A. Genómica y proteómica del VHB. 2007; 7(1): 3-7.
11. Ríos W, Restrepo J, Cortés F, Gonzalo M. Infección oculta por el virus de la hepatitis B Aspectos clínicos epidemiológicos y moleculares *SciELO.* 2013;38(1):1-11.
12. Martínez de Rodríguez L. Mutantes Pre core antígeno e negativo del virus de hepatitis B (HBeAg) por pruebas serológicas en donantes de sangre de Bogotá Colombia, 2009-2010 [tesis de master]. Colombia. En: Publicaciones científicas, Pontificia Universidad Javeriana; 2012.
13. Rojas L. Estudio de la protección frente al virus de la hepatitis B en los estudiantes de la Facultad de Odontología de la Universidad de Granada [tesis doctoral]. España. En: Publicaciones científicas, Universidad de Granada. 2015.
14. Aguilar Rubio J. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología [tesis doctoral]. Cuba. En: Publicaciones científicas, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología División de Vacunas Efecto; 2007.
15. Francisco R, Rosendo J. Virología molecular del virus de la hepatitis B. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* 2008;26:2-10.
16. Blazquez de Castro A. Caracterización Molecular de virus de la Hepatitis B. [tesis doctoral]. España: Publicaciones Departament. Universidad de Salamanca; 2015.
17. Cano Molma I. Detección de portadores del Virus de Hepatitis B mediante la determinación de marcadores serológicos en los Bancos de Sangre y ADN de VLIB en una muestra de donantes Anti Hile de la República de Panamá, 2005 - 2007 [tesis de master]. Panamá: Publicaciones científicas, Universidad de Panamá; 2008.
18. Grupo técnico interinstitucional del Comité Nacional Para la Vigilancia

- Epidemiológico (CONAVE). Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de las Hepatitis Virales, 1er Ed. México: IEPSA. 2012.
19. Ministerio de Salud, Boletín Epidemiológico (Lima - Perú). 2016;25(4):2-15.
  20. Dirección Regional de salud, Dirección de Epidemiología Emergencias y Desastres. Situación Epidemiológica de Hepatitis B, Ayacucho - Perú. 2016.
  21. Sunbul M. Hepatitis B virus genotypes: Global distribution and clinical importance. *World Journal of Gastroenterology*. 2014;20(18):5427-34.
  22. Roman S, Escobedo G, Roman S, Abrego A, Fierro A, Escobedo G, et al. Hepatitis B virus infection in Latin America: A genomic medicine approach. *World Journal of Gastroenterology*. 2014;20:170-185.
  23. Mauricio A, Rodrigo V, Brahm J. Variabilidad genética del virus hepatitis B y su significado clínico. *Hospital Clínico Universidad de Chile*. 2010;21(1):154-61.
  24. Rios W, Restrepo J, Cortes F, Gonzalo C, Navas M. Infección oculta por el virus de la hepatitis B aspectos clínicos epidemiológicos y moleculares Occult hepatitis B virus infection Clinical epidemiological and molecular aspects. *Acta Médica Colombiana*. 2013;38:143-8.
  25. Cortes F, Navas C. Papel del genotipo y variantes precore/core del virus de la hepatitis B en el curso clínico y el tratamiento *Revista Colombiana de Medicina*. 2008;12(3):2-5.
  26. Lin L, Kao H, *BiomedSci* 2008, 15:139-137. <https://doi.org/10.1007/s11373-007-9225>.
  27. Kumar K, Kumar M, Rahaman H, Singh B, Patel K. Distribution of Hepatitis B virus genotypes among healthy blood donors in eastern part of North India. 2008;2:16-7.
  28. Livingston S, Simonetti J, Bulkow L, Homan C, Snowball M, Cagle H. et al Clearance of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis. B and genotypes A, B, C, D, and F. *Gastroenterology* 2007; 133:1452-7.
  29. Malmström S, Berglin I. Novel Method for Genotyping Hepatitis B Virus on the Basis of TaqMan Real Time PCR. Department of infectious Diseases, Section for Clinical Virology, University of Gothenburg. 2010;1:120-5.
  30. Delfino Cecilia M. Virus del Hepatitis B (HVB) y virus de Hepatitis D (VHD) en Argentina: Epidemiología molecular y variabilidad viral [tesis de doctorado]. Argentina: Publicaciones científicas, biblioteca digital de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires; 2013.
  31. Sheldon J, Sarmiento R, Soriano V. Resistencias en el virus de la Hepatitis B. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008;26 supl7:49-55.
  32. Gregori J. Como interpretar las pruebas de serología hepática. *Sociedad Valencina de Medicina Familiar*. 2008;1:1-5.
  33. Coaquira M. Factores de Riesgo Relacionados por el virus de Hepatitis B y C en los pacientes del servicio de Hemodiálisis del Hospital Honorio Delgado Ezpinoza y Clínica Sermedial Arequipa. [tesis pregrado]. Perú publicaciones : biblioteca Universidad Nacional de San Agustín; 2015.
  34. Delfino M, Berini C, Eirin E, et al. New natural variants Molecular and hepatitis B virus among Amerindians from Argentina with serological characterization of occult. Hepatitis B infection in mainly occult infections. *J Clin Virol* 2012; 54:174-179.
  35. Cortazar A, Silva EP. Métodos físico químicos en biotecnología: PCR. *PCR en Tiempo Real [Internet]*. 2006; 40. Available from: <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/pcr.pdf>.
  36. Hernández R, Fernández C, Baptista M. Metodología de la investigación [Internet]. *Metodología de la investigación*. 2010. 656 p. Available from: <http://www.casadellibro.com/libro-metodologia-de-la-5-ed-investigacion-incluye-cd-rom/9786071502919/1960006>.

37. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013;22(5):299-305.
38. Microbial S. A. Sistema de Detección de Patógenos Por PCR en Tiempo Real: Guía de Interpretación de Resultados. 1ª ed. México: Parc Cientific; 2009.
39. High resolution melt.com, Beginners Guide to High Resolution Melt (HRM) analysis [sede Web]. Uk: high resolution melt.com.uk; 2012 [actualizada el 3 de enero de 2015; acceso 12 de octubre de 2017]. Disponible en: <http://www.highresolutionmelt.co.uk>.
40. Sean T, Rachel S, Richard K, Carl F, Viresh P, Frank B. A Practical Guide to Hight Resolution Melt Analysis Genotyping. *Rv A [revista en Internet]* 2010 septiembre-diciembre. [Acceso 19 de octubre de 2017]; 6 (6004). Disponible en: <http://www.bio-rad.com>.
41. Gallego F, Arjona R. HRM: Análisis de Variación génica mediante el método HRM (High Resolution Melting). 1ª ed. Barcelona: Rv Intitud de Recerca; 2012.
42. Bioqu MPDE, CI M, Jim J. Universidad de Valencia Facultad de Ciencias Biológicas. 2015;1:197.
43. Biosystems A. Applied Biosystems StepOne® Real-Time PCR System. 2010;1:164.
44. Chirinos C. Guía de PCR en tiempo real Guía de PCR en tiempo real. 2015; 1(1):1-22.
45. Yang H, Yeh S, Chen P, Iloeje UH, Jen C, Su J, et al. Associations Between Hepatitis B Virus Genotype and Mutants and the Risk of Hepatocellular Carcinoma. 2008;100(16):10-5.
46. Becker C, Mattos A, Bogo M, Branco F, Sitnik R, Kretzmann N. Genotyping of hepatitis B virus in a cohort of patients evaluated in a hospital of Porto Alegre, South of Brazil. *Arq Gastroenterol*. 2010; 47:13-7.
47. Paudel D, Jarman R, Limkittikul K, Klungthong C, Chamnanchanunt S, Nisalak A, Gibbons R, Chokejindachai W. Comparison of real-time SYBR green dengue assay with real-time taqman RT-PCR dengue assay and the conventional nested PCR for diagnosis of primary and secondary dengue infection. *N Am J Med Sci*. 2011;3:478-85.
48. PubMed [base de datos en Internet]. Ghouri A, Mian I, Rowe H: Review of hepatocellular carcinoma: Epidemiology etiology and carcinogénesis. *Journal of Carcinogenesis*; 2017-[fecha de acceso 28 de diciembre de 2017]. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC5490340/>.
49. Briones Peña J. Secuenciación del genoma completo del virus de la hepatitis B en México [tesis de pregrado]. México: Publicaciones científicas, Universidad Autónoma de México; 2013.
50. Rahman A, Hakim F, Ahmed M, Ahsan R, Nessa J, Yasmin M. Prevalence of genotypes and subtypes of hepatitis B viruses in Bangladeshi population. *Springer Plus*. 2016;5:278-80.
51. Pina F, Ferreira S, Correia S, Castro A. Epidemiología espacial: nuevos enfoques para viejas preguntas. *Univ. Odontol*. 2010 Jul-Dic; 29(63): 47 - 65.
52. Alvarado V, Malta C, Gomes M, Gutierrez F, Botelho L, Carrilho F, et al. Molecular characterization of the Hepatitis B virus genotypes in Colombia: A Bayesian inference on the genotype F. *Infect Genet Evol (Colombia)*. 2011 Jan; 11(1):103-8.
53. Spin Jamarillo E. Estandarización de la reacción en cadena de la polimerasa para detección del virus de hepatitis b. [tesis de pregrado]. Ecuador, Universidad Tecnológica Equinoccial; 2008.
54. Toro M, Restrepo J. Hepatitis B. *Medicina y Laboratorio*, 2011(col),17:7-8.

## **ANEXOS**

## Anexo 1

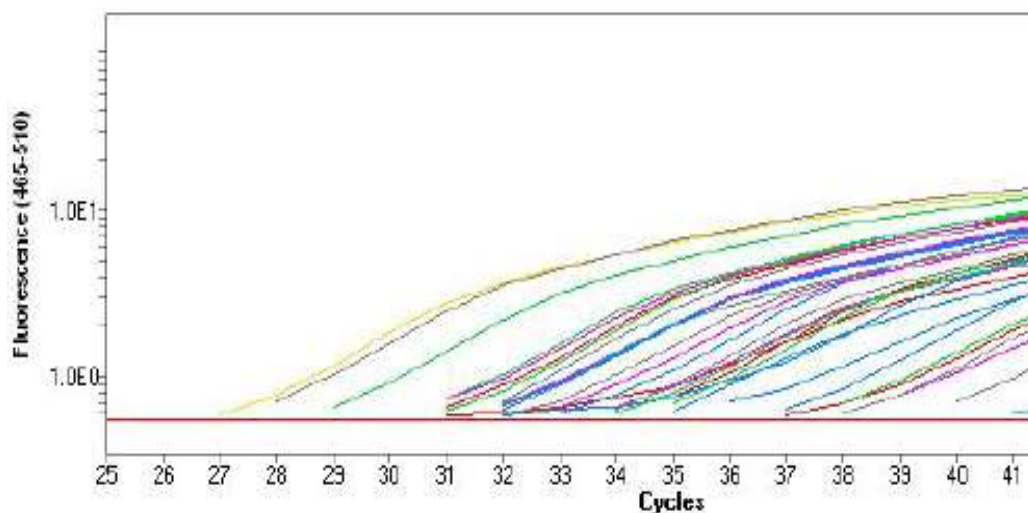


Figura 12. Curvas de amplificación de muestras de suero de la seroteca del Laboratorio de Referencia Regional Análisis de PCR real time de una placa de 40 pozos con muestras de suero de la seroteca del Laboratorio de Referencia de Ayacucho, 2017.



## Anexo 2

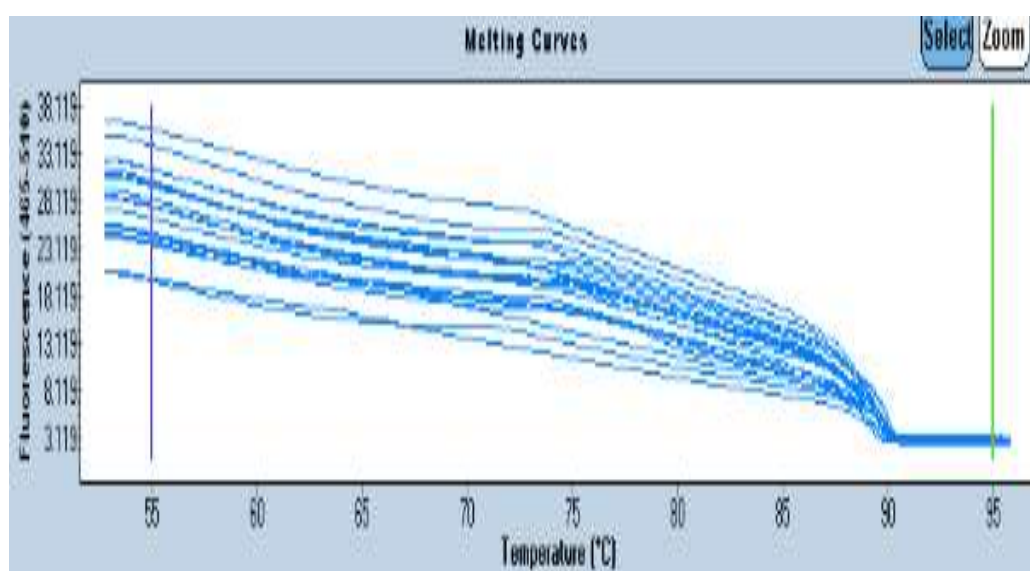


Figura 13. Resultado de análisis de la curva de disociación de PCR tiempo real donde la velocidad en que se pierde el Evan green es a medida que aumenta la temperatura.

### Anexo 3

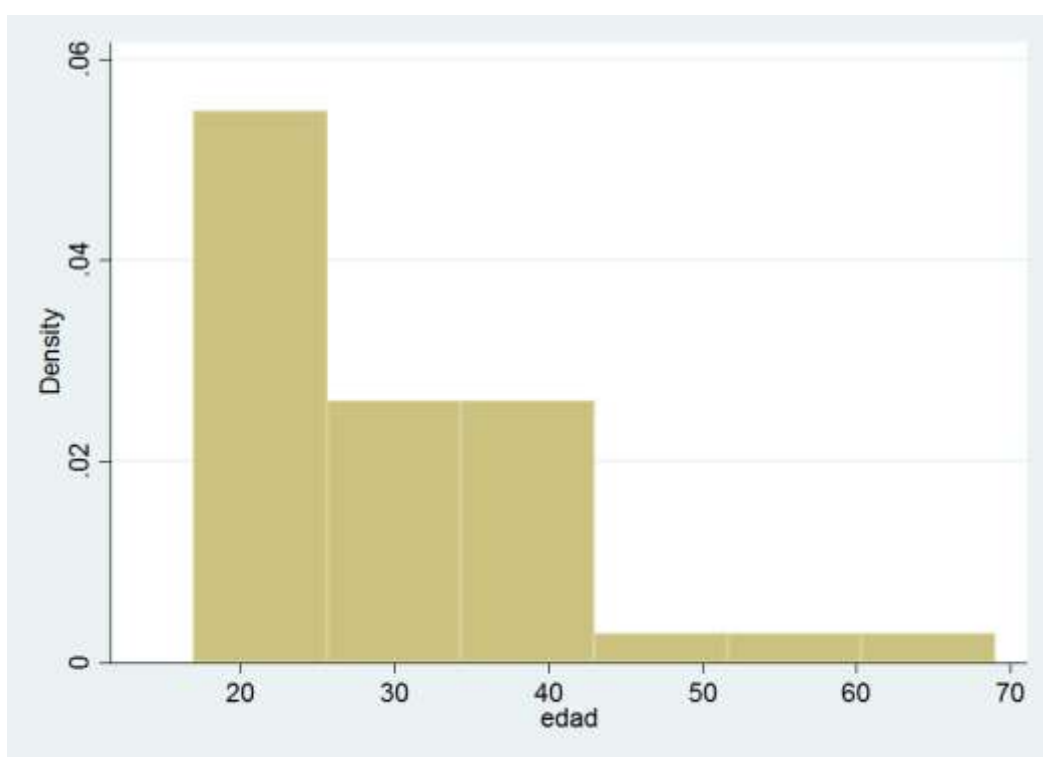


Figura14. Histograma de edades de pacientes, análisis de 40 muestras de suero de la seroteca del Laboratorio de Referencia Regional de Ayacucho - 2017

#### Anexo 4

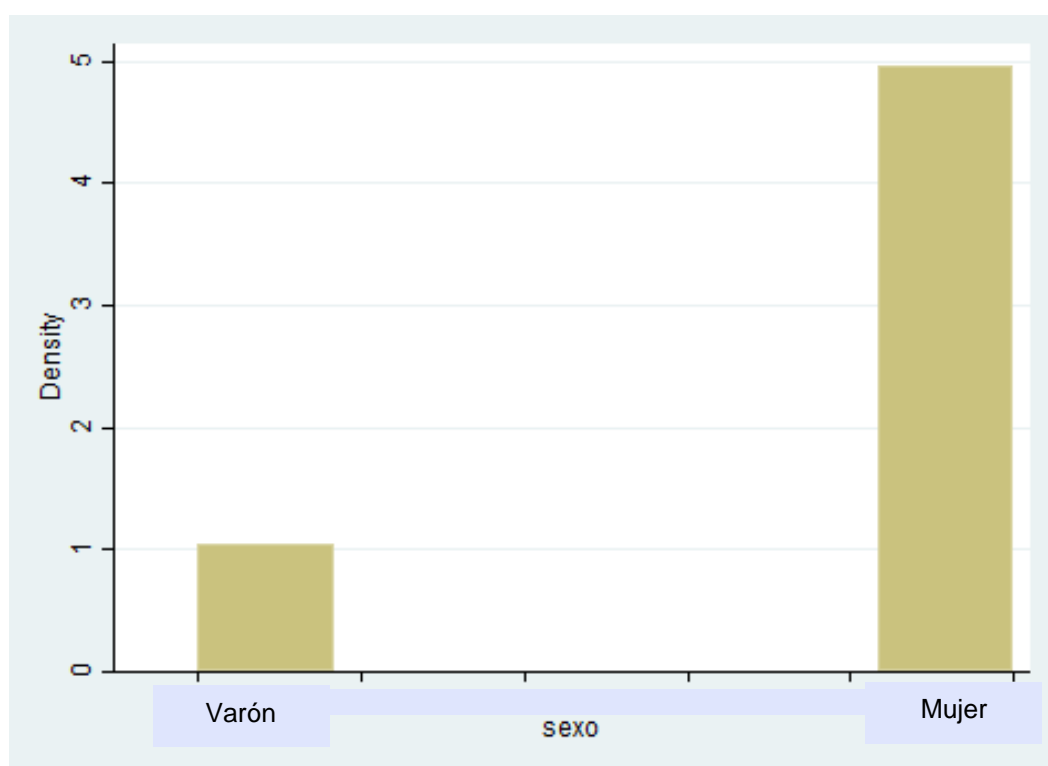


Figura 15. Histograma de sexo de pacientes, análisis de 40 muestras de suero de la seroteca del Laboratorio de Referencia Regional de Ayacucho - 2017.

Anexo 5

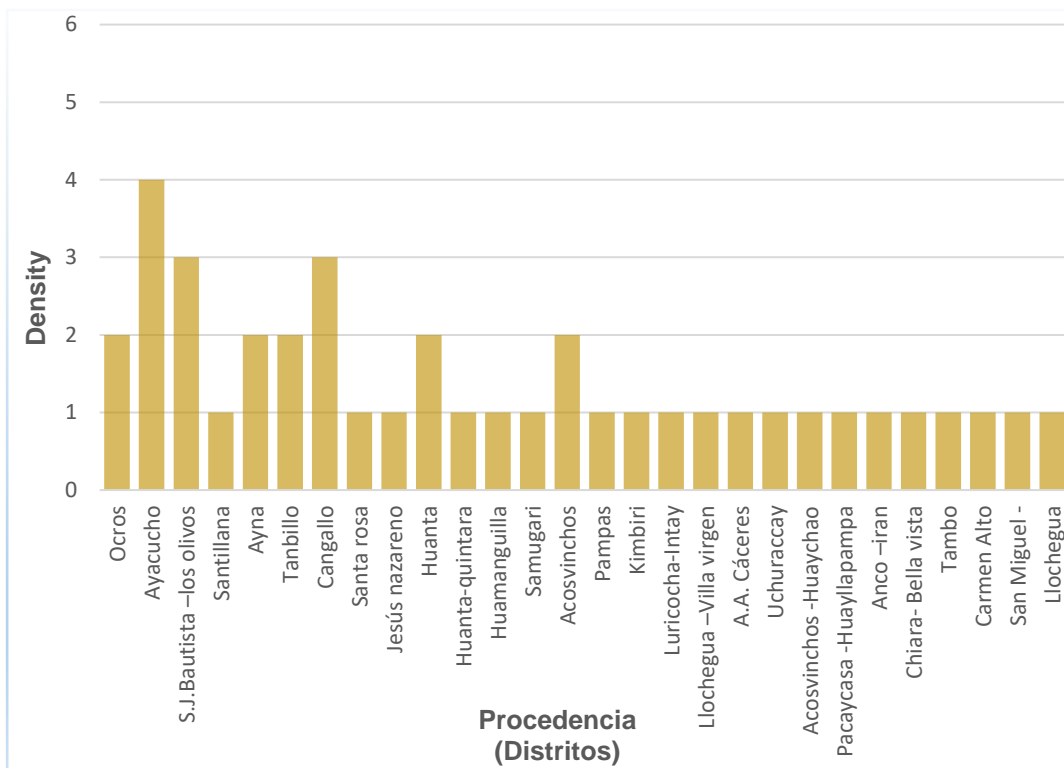


Figura 16. Histograma de procedencia de pacientes, por distritos, análisis de 40 muestras de suero de la seroteca del Laboratorio de Referencia Regional de Ayacucho - 2017

## Anexo 6

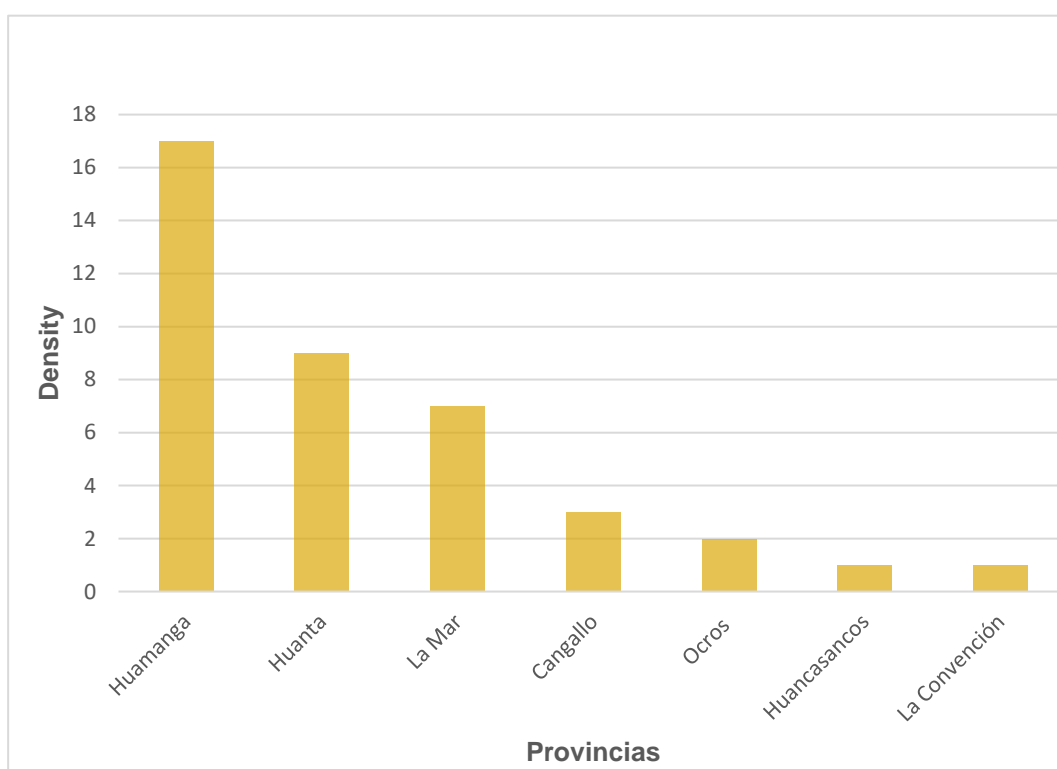


Figura 17. Histograma de pacientes con VHB, por provincias de la región de Ayacucho, representa HBsAg positivos de la seroteca del Laboratorio de Referencia Regional de Ayacucho - 2017.

Anexo 7

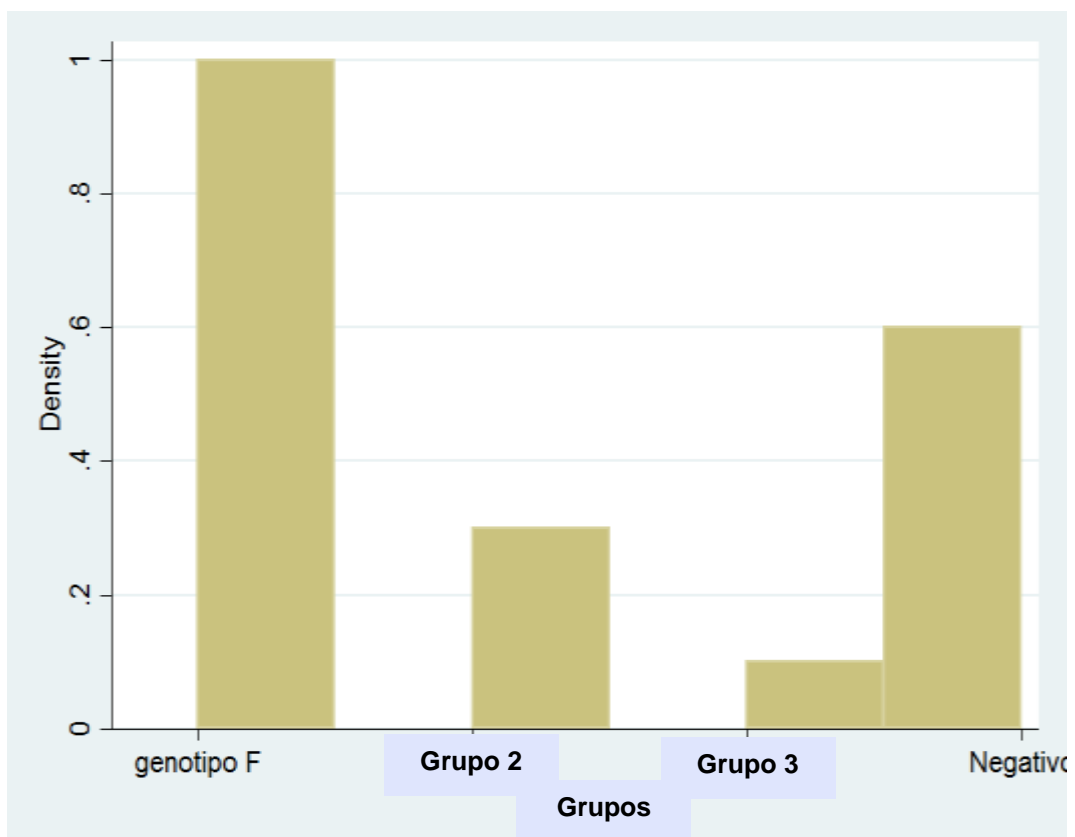


Figura 18. Histograma de genotipo F y grupos desconocidos de pacientes, en el análisis de 40 muestras de suero de la seroteca del Laboratorio de Referencia Regional de Ayacucho - 2017.

## Anexo 8

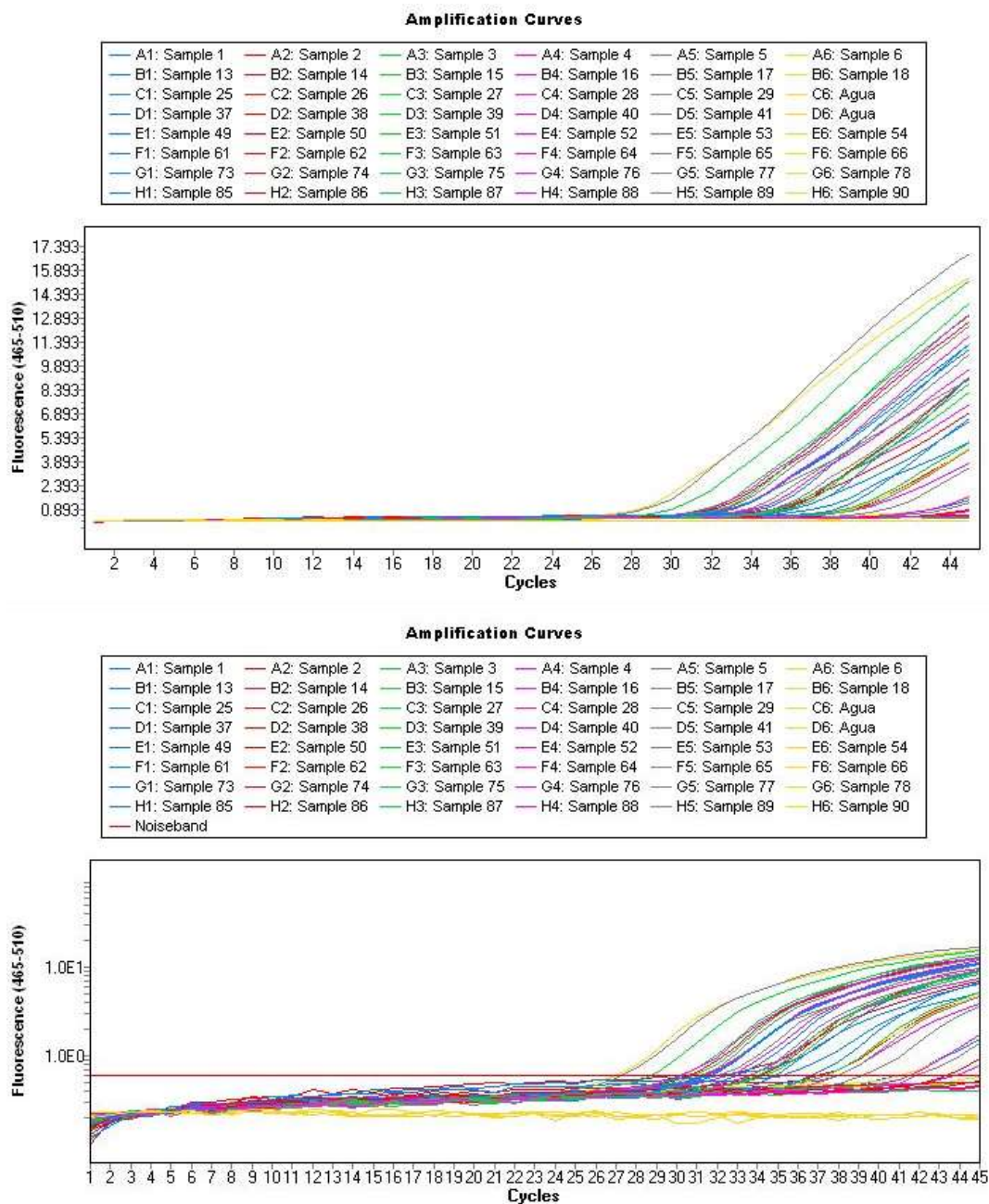


Figura 19. Resultados de amplificación de curvas de controles y 40 muestras de suero de la seroteca del Laboratorio de Referencia Regional de Ayacucho - 2017.

## Anexo 9

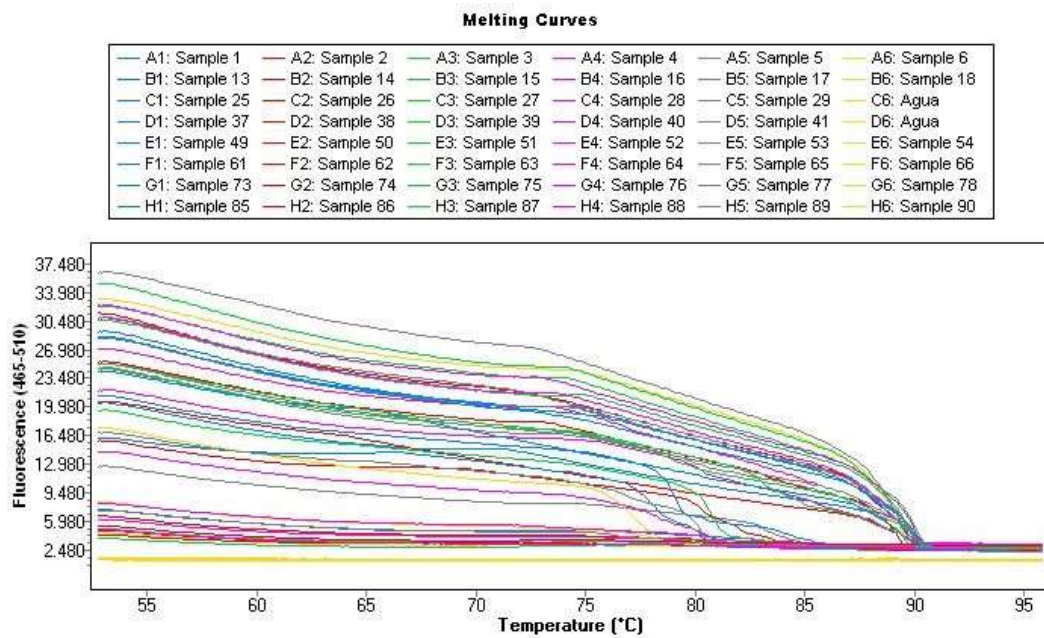


Figura 20. Resultados de curvas de disociación de control negativos, blancos y 40 muestras de suero de la seroteca del Laboratorio de Referencia Regional de Ayacucho - 2017



## Anexo 10

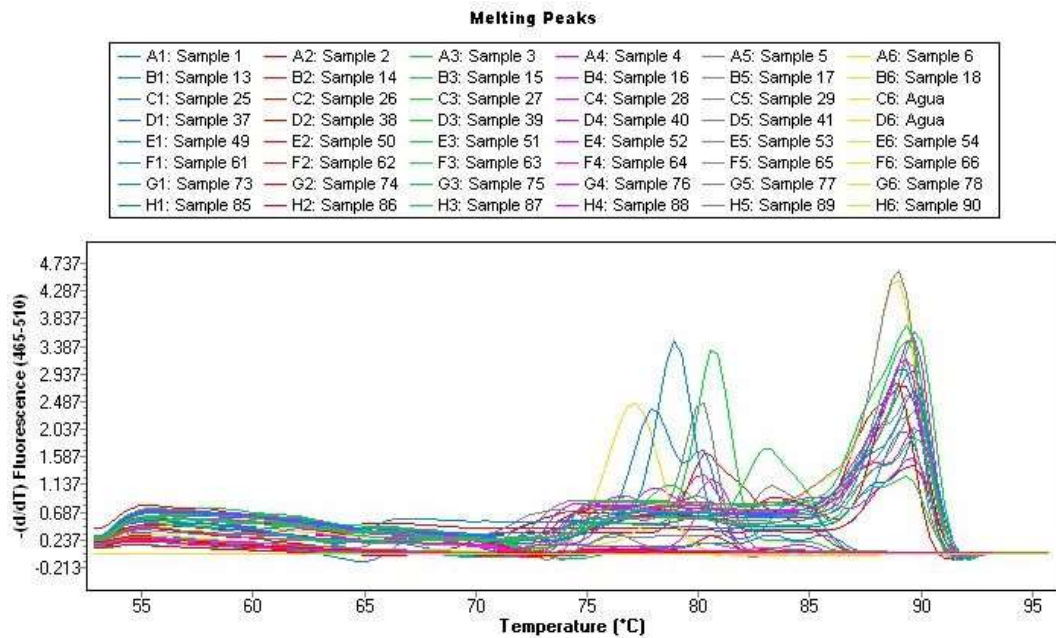


Figura 21. Resultados de picos de desnaturalización de controles y de 40 muestras de suero de la seroteca del Laboratorio de Referencia Regional de Ayacucho - 2017

Anexo 11



Figura 22. Rack con tubos eppendorf codificados para extracción de ADN de VHB de 40 muestras de suero de la seroteca del Laboratorio de Referencia Regional. Lima - 2018

## Anexo 12



Figura 23. Preparación del master mix para la ejecución de la PCR real time de 40 muestras de suero de la seroteca del Laboratorio de Referencia Regional. Lima - 2018

## Anexo 13

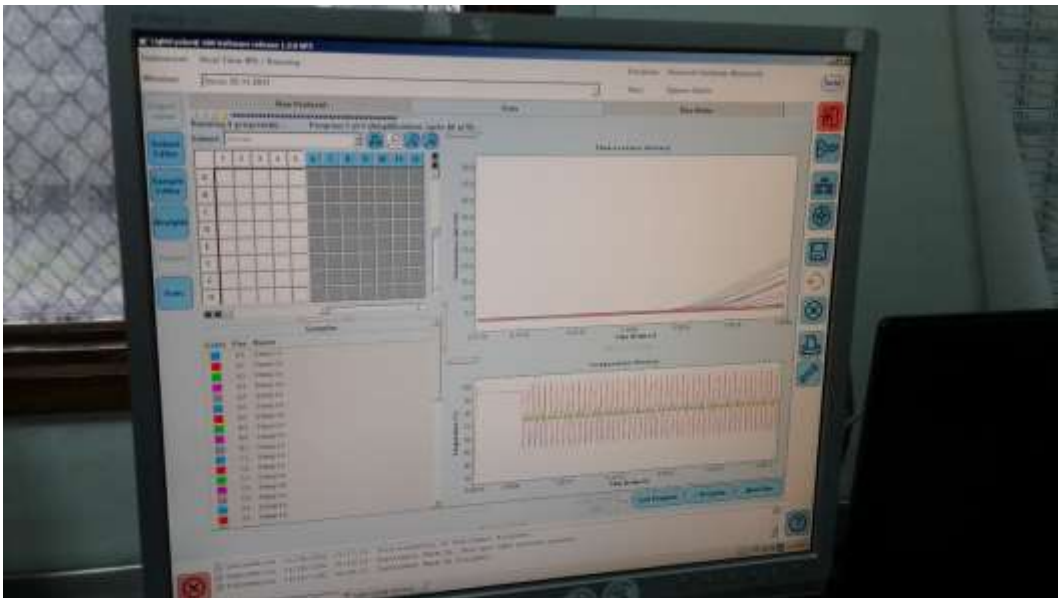


Figura 24. Programación de las etapas de PCR real time en el software Light cycle 480.

Anexo 14



Figura 25. Cuarto de equipos de termocicladores del Instituto Nacional de Salud.



Figura 26. Ambientes del Laboratorio de Leishmania del Instituto Nacional de Salud

## Anexo 16



Figura 27. Cámara de vidrio cerrada y acondicionada con luz UV para suspender cebadores, ubicados en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Salud.

## Anexo 17



Figura 28. Protocolo de seguridad con papel adsorbente para el inicio de la extracción de ADN viral en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Salud.



Anexo 18

Constancia de autorización emitido por el Laboratorio de Referencia Regional de Ayacucho.



GOBIERNO REGIONAL DE AYACUCHO  
GERENCIA REGIONAL DE DESARROLLO SOCIAL  
DIRECCION REGIONAL DE SALUD

**EL DIRECTOR DEL LABORATORIO DE REFERENCIA REGIONAL DE SALUD PUBLICA, DE LA DIRECCIÓN REGIONAL DE SALUD AYACUCHO, OTORGA LA PRESENTE CONSTANCIA;**

**C O N S T A N C I A**

Conste, por el presente documento que, el Señor **OSCAR ALBERTO DELGADO BAUTISTA**, con DNI N° 70422729, Bachiller de la Escuela Profesional de "BIOLOGÍA" de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, ha utilizado 40 muestras de suero (500 ul), de pacientes con **Hepatitis B POSITIVOS**, para la ejecución del proyecto de Tesis "Genotipificación de Virus de Hepatitis B de los sueros de la Seroteca del Laboratorio de Referencia Regional, realizado a partir del mes de marzo a diciembre del 2017".

Se le expide el presente documento, a solicitud del interesado para los fines que crea por conveniente.

Ayacucho, 14 de Febrero del 2017.

  
Bgd. **Rubén Tenorio Lagos**  
DIRECTOR

---

DIRECCION REGIONAL DE SALUD AYACUCHO  
LABORATORIO REGIONAL DE SALUD PÚBLICA  
Jr. Palmeras S/N – Telf. 315577 – Anexo 190 - 265

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>aa</b>	Aminoácido (s)
<b>AcM</b>	Anticuerpo monoclonal
<b>Acs</b>	Anticuerpos
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ALT</b>	Alanina-amino transferasa
<b>ARN</b>	ARN mensajero
<b>pgARN</b>	ARN pre genómico
<b>ADNc</b>	ADN copia
<b>ADN rc</b>	ADN de doble cadena circular sin cerrar o relajada
<b>ADNccc</b>	ADN circular y covalentemente cerrado
<b>Anti-HBc</b>	anticuerpos contra el antígeno del core
<b>Anti-HBs</b>	anticuerpos contra el antígeno de superficie
<b>BCP</b>	promotor basal del core ( <i>Basal Core Promotor</i> )
<b>CV</b>	Carga viral
<b>CT</b>	Umbral de amplificación
<b>Cp</b>	Promotor core
<b>dNTPs</b>	desoxirribonucleotidos trifosfato
<b>HBcAg</b>	antígeno del Core
<b>HBeAg</b>	antígeno e
<b>HBsAg</b>	antígeno de superficie de hepatitis B
<b>HBx</b>	proteína X de hepatitis B
<b>HCC ó CHC</b>	hepatocarcinoma celular
<b>HFN-3</b>	Factores nucleares de los hepatocitos - 3
<b>HRM</b>	Alta resolución de fusión (High Resolution Melting)
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina.
<b>IC</b>	Infección crónica
<b>IgM</b>	inmunoglobulina M.
<b>NTCs</b>	sin control de ADN
<b>OBI</b>	<i>Occult hepatitis B Infection</i>
<b>ORF</b>	marco abierto de lectura
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PCR- RT</b>	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PT</b>	proteína terminal
<b>pC</b>	preCore
<b>Pol</b>	polimerasa
<b>pC/C</b>	región precore/core de hepatitis B
<b>RT</b>	transcriptasa reversa (siglas en ingles de <i>reverse transcriptase</i> )
<b>SNPs</b>	Polimorfismo de nucleótido simple
<b>Sp</b>	Promotor s
<b>TI</b>	Tasa de incidencia
<b>Tm</b>	Temperatura melting
<b>VHB</b>	Virus Hepatitis B
<b>wt</b>	tipo salvaje (siglas en ingles de <i>wild type</i> )

Anexo 20

MATRIZ DE CONSISTENCIA

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVO	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES	METODOLOGÍA
Genotipificación de Virus de Hepatitis B, de las muestras de la seroteca del Laboratorio Referencial de la Dirección de Salud Ayacucho -2017.	¿Existirá diferentes genotipos de Virus de la Hepatitis B, en las muestras de la seroteca del Laboratorio Referencial de la Dirección de Salud Ayacucho - 2017.?	<p><b>General</b> Genotipificar el virus de la Hepatitis B, de las muestras de la seroteca del Laboratorio Referencial de la Dirección de Salud Ayacucho -2017.</p> <p><b>Específicos</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Estandarizar la técnica para la genotipificación virus de la hepatitis B.</li> <li>▪ Cuantificar la carga viral de HBV de las muestras de la seroteca</li> <li>▪ Georeferenciar la procedencia del paciente crónico a quien le corresponda la muestra.</li> </ul>	<p><b>Aspectos característico de HBV</b></p> <p>Virus del Hepatitis B</p> <p>Estructura del virus (VHB)</p> <p>Organización genómica</p> <p>Diversidad genotípica</p> <p>Ciclo Biológico</p> <p>Epidemiología</p> <p>Método para la genotipificación</p> <p>Curvas de disociación</p> <p>Importancia de la georreferenciación</p>	<p>Existen diferentes genotipos del virus de la Hepatitis B, en las muestras de la seroteca del Laboratorio Referencial de la Dirección de Salud Ayacucho - 2017.</p> <p>Ayacucho – 2017</p>	<p><b>Variable de caracterización:</b></p> <p>Muestras de suero sanguíneo</p> <p><b>Variable de interés:</b></p> <p>Genotipificación</p>	<p><b>Tipo de investigación :</b> Observacional -descriptivo.</p> <p><b>Nivel de investigación:</b> Básico</p> <p><b>Definición de la población y muestra:</b> La obtención y selección de muestra fue por conveniencia , de la seroteca del Laboratorio de Referencia Regional de Ayacucho conservados entre 2016 al 12 de febrero del 2018</p> <p><b>Metodología:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1 Se realizara la extracción de ADN viral</li> <li>2 El PCR tiempo real utilizara el equipo (Aplicado LightCycler™ 480), ,</li> <li>3 El Análisis con la curva de disociación.</li> </ol> <p><b>Análisis estadístico :</b></p> <p>El análisis estadístico descriptivo de la población en estudio será de las variables Edad, Sexo,y empleando el programa Stata versión 14.</p>

