TÍTULO DEL PROYECTO

Detección de DNA del virus hepatitis B utilizando PCR en pacientes atendidos en el Hospital Walter Cruz Vilca de Salaverry-La Libertad entre Marzo a Octubre 2016

SIGLAS

VHB

TIPO DE PROYECTO

Basica

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

LINCAP

DURACIÓN ESTIMADA

Fecha de inicio: 16/03/2016 Fecha de término: 30/10/2016

PARTICIPANTES

- TERAN ROJAS YONY ALEXANDER (TECNICO) — 000070981
- ARAUJO JIMENEZ ARMANDO (DOCENTE) — 000042098
- REYNA LOPEZ LENNIS ANTONIO (COORDINADOR(INV. PRINCIPAL)) — 000070550
- GONZALEZ CABEZA JOSE GUILLERMO (DOCENTE) — 000048718
- GOMEZ CASTRO KELLYN MYLUSKA (DOCENTE) — 000076554
- AVILA VEREAU ELIO FERNANDO (DOCENTE) — 000064893
- ABANTO DIAZ CARLOS EDUARDO (DOCENTE) — 000142091

INSTITUCIÓN O LUGAR A EJECUCARSE

- UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO - UPAO (Microbiología Molecular. Departamento de Ciencias)

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El Perú es un país con más de treinta millones de habitantes, con un promedio de prevalencia del virus de la Hepatitis B (VHB) entre 1.4 a 2.2%, la prevalencia de la hepatitis B varía en las diferentes regiones geográficas ⁽¹⁾⁽²⁾ localidades, habitat y los grupos de población y presenta zonas hiperendémicas en la región de la selva alta que incluye a 10 departamentos que cuentan con selva alta y áreas rurales de la selva baja ⁽³⁾. Además en algunos valles de la vertiente oriental de la cordillera de los Andes como Abancay y Huanta ⁽⁴⁾.

Las enfermedades transmisibles por transfusión han sido un riesgo persistente desde el inicio de la práctica de la medicina transfusional. Los primeros casos de transfusión de infecciones virales fueron reportados en 1943 y los estudios de laboratorio para el tamizaje de sangre se iniciaron en 1969, con la identificación del antígeno de superficie del VHB ⁽⁵⁾⁽⁶⁾. En la actualidad, la transfusión de componentes sanguíneos aún no puede realizarse sin algún riesgo residual en

todo el mundo. De acuerdo con las cifras de la OMS, más de 92 millones de unidades de sangre son recolectadas de tres tipos diferentes de donantes: voluntarios, por reposición y remunerados; y más del 50% de éstas donaciones son recolectadas en países de alto índice de desarrollo humano⁽⁷⁾ ; por ello el objetivo de la OMS es que para el año 2020 todos los países obtengan el 100% de unidades de sangre a partir de donantes voluntarios no remunerados⁽⁸⁾

Actualmente, con la implementación de tecnologías de amplificación de ácidos nucleicos en países con índice de desarrollo humano medio y alto, que cuentan con altos índices de donación voluntaria y de reposición, la posibilidad de transmisión del VIH, el VHB y el virus de la hepatitis C (VHC) es de 1 en 1,500,000-4,300,000, 1 en 282,000-357,000 y 1 en 2,000,000, respectivamente ^{(9) (10)} .

Por lo tanto, no es fácil predecir la alta probabilidad de transmisión cuando se realiza la evaluación a personas potencialmente donantes de sangre en los diferentes unidades de banco de sangre, puesto que allí se realizan diferentes técnicas para la detección de VHB con el método de ELISA pudiendo este método entregar resultados falsos negativos debido a la sensibilidad y especificidad de éste método y sobretodo a la naturaleza de replicación del VHB ; sin embargo este proyecto pretende utilizar el método de diagnóstico molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por tener una alta especificidad y sensibilidad para la detección del VHB en personas posibles donantes de sangre.

II. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

2.- ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

Según la OMS, La máxima prevalencia de la hepatitis B se registra en el África subsahariana y Asia oriental, regiones en las que entre el 5% y el 10% de la población adulta está infectada de forma crónica. También hay tasas elevadas de infección crónica en la cuenca del Amazonas y en partes meridionales de Europa oriental y central. Se calcula que entre un 2% y un 5% de la población del Oriente Medio y el subcontinente indio padece infección crónica. En Europa occidental y América del Norte menos del 1% de la población padece infección crónica ⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾ .

La Doctrina, Normas y Procedimientos del Programa Nacional de Hemoterapias y Bancos de Sangre (PRONAHEBAS) indican que entre las pruebas en la sangre de donantes o bolsa de sangre debe realizarse para la detección de agentes infecciosos mediante la serología para antígeno de superficie del VHB (HBsAg) y anti-core (HBcAb).⁽¹⁶⁾

Los niveles de prevalencia y endemicidad del HBV, pueden determinarse tomando como índice a marcadores serológicos como el HBsAg y anticuerpos anti HBsAg o a los anticuerpos anti-HBcAg. De acuerdo con ello se pueden ubicar a las diferentes zonas endémicas. El antecedente de

infección de HBV se estima en 5% en los Estados Unidos y países de baja prevalencia y cerca de 100% entre los adultos en algunas partes del sudeste de Asia, África y la Cuenca Amazónica, en donde presentan alta endemicidad. En los Estados Unidos, el predominio de infección de HBV es más alto entre los afro-americanos, hispanos y asiáticos que en la población blanca, además se conoce que varias comunidades con mayores tasas de portadores crónicos de HBsAg se encuentran en los esquimales de Alaska, en las Islas Asiático-Pacífico, y los aborígenes australianos⁽¹¹⁾

En Sudamérica anualmente se reportan 100.000 nuevos casos, con prevalencias de Ag HBs entre 0,4% y 13%. Estudios con anticuerpos contra el core (anti-HBc) revelan la más alta frecuencia en República Dominicana, seguida de Brasil, Venezuela y Argentina. Las más bajas frecuencias corresponden a México y Chile⁽¹⁷⁾.

El Perú tiene una endemicidad intermedia como país para la infección por hepatitis B, sin embargo, debido a la enorme diversidad geográfica y cultural del país, existen una importante variabilidad en la prevalencia en diferentes poblaciones. En la cuenca del Amazonas y algunas zonas de la sierra se describen áreas hiperendémicas, mientras que Lima, se está convirtiendo en una zona de endemicidad media para la hepatitis B.⁽¹⁸⁾

En localidades donde el estado de portador del HBsAg excede al 10%, la infección por HBV produce hasta 3% de la mortalidad total⁽¹²⁾, aunque en áreas hiperendémicas como Huanta (Ayacucho) y Abancay (Apurímac) en el Perú, este porcentaje llega a 7%⁽¹⁹⁾⁽⁴⁾. El 30% de los portadores crónicos del virus que sobreviven hasta los 30 años, están expuestos a morir de complicaciones como hepatitis crónica, cirrosis o cáncer primario de hígado⁽²⁰⁾⁽²¹⁾⁽²²⁾

Estudios realizados en población urbana de la costa, sierra y selva encontraron seroprevalencias de HBsAg entre 0 y 5 %, estas últimas en muestras de Abancay⁽²³⁾. En la década de los 80, diversos estudios encontraron seroprevalencias de HBsAg que variaban hasta el 5 % en población de la selva, mientras que el anti-HBs tuvo mayor prevalencia en Abancay (86,9 %), Loreto (58,2 %) y Madre de Dios (57,3 %)⁽¹⁸⁾

Otros estudios identificaron elevadas seroprevalencias de anti-HBc y HBsAg en poblaciones de Huanta y sierra central⁽²⁴⁾⁽⁴⁾⁽²⁵⁾. En la costa se ha reportado prevalencia en población general de 0-4,9 % en algunas ciudades. En la sierra la prevalencia es más heterogénea: Arequipa (3,6 %), Abancay (9,8 %) y en la población escolar de Huanta (16 %). Diversos autores han encontrado en la Costa cifras de portadores del HBsAg, en donantes de sangre voluntarios y población general, que van entre el 0.2% al 1.3% y antiHBs y antiHBe de 7.6%⁽²⁶⁾⁽²⁷⁾⁽²⁸⁾⁽²⁹⁾

III. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO (IMPORTANCIA, BENEFICIARIOS, RESULTADOS ESPERADOS)

3.- JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

En la actualidad se cuentan con pruebas inmunológicas que son utilizados para ayudar en el diagnóstico clínico de VHA, VHB Y VHC mediante la técnica de ELISA, pero la técnica PCR ayudaría a mejorar el diagnóstico detectando directamente el DNA del virus, lo cual se determinaría la fase de infección real del donante; evitando con ésta técnica el escape de donantes que podrían estar infectados con el VHB y que no fueron detectados por ELISA; debido a que el virus podría encontrarse en períodos de ventana o de replicación viral en el organismo hasta el momento de la donación de sangre. La transfusión sanguínea puede ser una intervención salvadora; sin embargo, como todo tratamiento, puede resultar en complicaciones agudas o tardías y conlleva el riesgo de infecciones transmisibles por transfusión, incluyendo el VHB.

En Trujillo , que es en donde se realizará el presente estudio, la población general se ubica dentro los grupos de menor prevalencia para los marcadores serológicos de VHB; pero eso no implica que no se podría detectar ADN del VHB en potenciales donantes de sangre.

En 1995 en el estudio de Hepatitis B después de la transfusión de sangre conteniendo anticuerpo con el antígeno core, contrastaron la hipótesis de que los donadores que poseen anti-HBc pero que carecen del HBsAg y anticuerpos anti HBs pueden transmitir la hepatitis tipo B, llegando a determinar la gran importancia del anti-HBc como indicador de infección por el VHB y que sangre con altos títulos de anti-HBc puede ser infeccioso⁽³⁰⁾. Lo mismo fue corroborado por Ren, F. y col. en su investigación titulada: estudios de infección del VHB en donadores de sangre con anti-HBc positivo y HBsAg negativo, concluyendo que la sangre que contienen altos títulos de anti-HBc puede ser infeccioso y que esto estaría relacionado con la sensibilidad de los ensayos para detectar HBsAg⁽³¹⁾⁽³²⁾. En 1998, hallaron el DNA del VHB en el 0.34% (1/297) de donantes de sangre, habiendo relacionado el hallazgo con el título alto del anti HBc > a 1:128; en las unidades de sangre con títulos < a 1:128 de anti HBc no fueron encontrados ningún caso la presencia de DNA del VHB; concluyendo que la presencia de DNA del VHB estaría en relación a los títulos de anticuerpos contra HBc, existiendo una relación positiva directa⁽³¹⁾. De igual modo; se encontró que de 80 donantes con anti HBc positivo y HBsAg negativo uno mostró amplificación por PCR para el DNA del VHB representando un 1.25% de incidencia, recomendando que estos donadores deben de restringirse para casos de emergencia en un estudio realizado en el Cairo, Egipto⁽³³⁾, en la investigación titulada riesgo de infección con virus de la hepatitis B por transfusión en Kumasi, Ghana, hallaron que aproximadamente el 0.5% de muestras con HBsAg negativo pero anti HBc positivo contenían el DNA del VHB⁽³⁴⁾ y nos formulamos el siguiente problema ¿Cuál es la prevalencia de DNA del Virus de la Hepatitis B en pacientes atendidos en el Hospital Walter Cruz Vilca de Salaverry-La Libertad entre Marzo a Octubre 2016?

IV. OBJETIVOS

4.- OBJETIVOS

Generales

- Determinar la prevalencia de DNA del VHB en pacientes atendidos en el Hospital Walter Cruz Vilca de Salaverry-La Libertad entre Marzo a Octubre 2016

Específicos

- Determinar la relación existente entre la detección de DNA del VHB y los títulos de anticuerpos contra HBc en pacientes atendidos en el Hospital Walter Cruz Vilca de Salaverry-La Libertad entre Marzo a Octubre 2016

- Determinar la procedencia de potenciales donantes portadores VHB mediante la detección de ADN de VHB en pacientes atendidos en el Hospital Walter Cruz Vilca de Salaverry-La Libertad entre Marzo a Octubre 2016

V. MARCO TEÓRICO

5.- MARCO TEÓRICO

El VHB es un virus de la familia Hepadnaviridae que primariamente infecta al hígado, es cien veces más infeccioso que el VIH, se le encuentra en sangre, fluidos corporales y es capaz de permanecer más de una semana en sangre desecada que queda en la superficie⁽³⁵⁾⁽³⁶⁾

Historia natural del VHB

El curso natural de infección de HBV está determinado por la interacción entre la replicación del virus y la respuesta inmune. Otros factores que pueden contribuir en la progresión de la enfermedad hepática debido a HBV, están relacionadas con el sexo, consumo del alcohol, e infección concomitante con otros virus de hepatitis. El resultado de infección de HBV crónica depende de la gravedad de enfermedad hepática en el momento de la replicación viral⁽³⁶⁾

La edad en la que ocurre la infección es gravitante para el desarrollo de infección crónica. Si la infección ocurre al nacimiento la probabilidad de quedar como portador crónico es de 90%, si la infección ocurre entre 1 – 4 años esta probabilidad está entre 30-50% y si ocurre en la edad adulta se reduce a menos del 5%⁽³⁷⁾. Por otro lado, la infección en niños pequeños cursa de manera asintomática, de modo que sólo 10% de niños menores de diez años presentan síntomas que clínicamente orienten a una infección por hepatitis B⁽³⁸⁾

En general, la infección de HBV crónica pasa por dos fases, una fase replicativa temprana relacionada con la enfermedad activa del hígado y una fase no replicativa más tardía, relacionada con la remisión de la enfermedad hepática. Sin embargo, en los pacientes que adquirieron la infección en el periodo perinatal, se cree que hay una fase adicional en la que la replicación del virus no se acompaña de enfermedad hepática activa. Esto es debido a la tolerancia inmune secundaria a la exposición de HBV o a los antígenos HBV-relacionados, en etapas tempranas de la vida⁽³⁹⁾.

MECANISMOS DE TRANSMISIÓN: Transfusión sanguínea.

En los años 60, el riesgo de hepatitis por la infección HBV por transfusión de sangre comercial, era tan alto como 50%, y el HBsAg fue detectado en 60% de pacientes con hepatitis postransfusión de sangre. La exclusión de donantes pagados y la aplicación de tamizaje de marcadores para HBV, redujo dramáticamente en los años 70 la incidencia de VHB postransfusión, al menos en los países desarrollados⁽⁴⁰⁾

En Estados Unidos se usa para el tamizaje tanto de HBsAg como anticuerpos anti Core anti-HBc. El anti HBc permite detectar la infección por HBV en la fase de la ventana durante la recuperación de las hepatitis agudas B o en aquellos casos en los que la infección crónica HBV es de bajo nivel. Cuando se determine el uso de marcadores de infección como el anti HBc, hay que tener en cuenta la sensibilidad y especificidad de la prueba⁽³⁸⁾⁽³⁹⁾. Igualmente, se debe considerar la incidencia de infección de VHB asociada con transfusión, en áreas de baja prevalencia donde sólo se usa el HBsAg como marcador de tamizaje⁽⁴¹⁾.

Hace falta la evaluación de otros marcadores de infección como el DNA del virus, para definir los niveles reales del riesgo de infección por VHB, pues hay hallazgos de que en personas con anticuerpos anti HBc positivos y HBsAg negativos en el país, hasta 14% de ellos pueden ser positivos para DNA de VHB. En el Perú, los niveles de prevalencia en donantes de sangre son coincidentes con los niveles de prevalencia en la población general, así, en Chiclayo (Lambayeque) encontramos 0,5% de portadores de HBsAg, en Ica 2,2%, Arequipa 0,4%, Huancayo (Junín) 1,8%, Tarapoto (San Martín) 3,8%, Pucallpa (Ucayali) 3,2%⁽⁵³⁾. En el caso de las áreas urbanas de las ciudades de la selva, encontramos prevalencias intermedias. Un hallazgo que llama la atención es la de Ica, que está en transición de endemidad baja a intermedia, probablemente por la intensa migración receptora de áreas hiperendémicas del departamento de Ayacucho.

Técnicas de Diagnóstico Molecular para detectar DNA del VHB

Comprenden las técnicas que evidencian o descubren el material genético específico viral conservado y replicable que se encuentra en un fluido, en una célula o tejido activo. Estas técnicas, que son más rápidas que las tradicionales permiten hacer estudios en tejidos almacenados y se pueden clasificar en dos categorías: el primero en ensayos de hibridación y el

segundo empleando la PCR convencional basado en la amplificación del ácido nucleico que se desea detectar⁽⁴²⁾⁽⁴³⁾

Técnicas de amplificación del ácido nucleico:

La PCR se utiliza para descubrir VIH, CMV, VHB; papilomavirus, hantavirus, herpes 6 y 8, así como una gran variedad de patógenos (bacterias, parásitos).⁽⁴⁴⁾⁽⁴⁵⁾ Esta prueba se puede hacer directamente en muestras de enfermos con un proceso previo de extracción de ADN; también se puede realizar a partir de cultivos del microorganismo que se quiere descubrir, es relativamente rápida (demora entre 6 y 8 horas) y se puede automatizar. La PCR presenta una sensibilidad y especificidad alta, pero varían según el ensayo para el que se ha diseñado⁽⁴²⁾⁽⁴³⁾⁽⁴⁶⁾ Es una alternativa cuando otras pruebas no ofrecen mayor sensibilidad y en entidades en las que no hay mayor disponibilidad de pruebas diagnósticas. Sin embargo, posee algunas limitaciones, como la necesidad de cebadores específicos para encontrar determinado microorganismo y por ello hay la posibilidad de falsos negativos, lo que implica un conocimiento adecuado de la secuencia de nucleótidos del agente. Además, la prueba se debe efectuar en condiciones adecuadas de astringencia, es decir, una temperatura, pH y concentración de cebadores y nucleótidos apropiados. Si hay fallas, pueden ocurrir amplificaciones inespecíficas y contaminaciones con DNA extraño. Esto dificulta la aplicación de esta técnica de rutina en el laboratorio clínico porque exige infra estructura y entrenamiento adecuados. Es importante tener en cuenta que una PCR positiva no siempre indica infección activa pues demuestra material genético y se puede tratar de una infección latente o presencia de material genético de un agente no infectivo; por tanto su interpretación se hace en el contexto clínico de la persona. Un ejemplo de su utilidad en la clínica es la evaluación de HSV en el LCR en encefalitis, donde la PCR tiene una sensibilidad mayor de 95% en el momento de la presentación clínica y una especificidad de 100%⁽⁴⁷⁾ La PCR ha sido de valor diagnóstico considerable en descubrir portadores del virus de hepatitis B; mediante esta técnica se detecta el genoma del virus en secreciones lagrimales de 50% de los portadores incluso los asintomáticos, lo que es importante frente al auge de los trasplantes de tejidos oculares. Además, es de utilidad en el diagnóstico de virus mutantes de la hepatitis B que no expresan antígeno e (HBe) asociado con DNA viral circulante y que son causa frecuente de hepatitis aguda y mortal. En la hepatitis C se dice que los resultados obtenidos con PCR (RT PCR transcripción previa del ARN a DNA) son superiores a la prueba serológica de demostración de anticuerpos. En el caso de infección por CMV es importante para encontrar infecciones subclínicas o que no han sido descubiertas por otros métodos, lo que es de interés en el caso de trasplantes y en individuos VIH positivos en los que se debe iniciar la profilaxis antes que la infección comience. Una de las mayores ventajas de la PCR, es que puede evidenciar una infección aunque el individuo se encuentre en ventana inmunológica, lo que permite disminuir la transmisión de estas infecciones, en el caso del virus de hepatitis B reduce la demostración a 11 días postinfección y en la hepatitis C la reduce de 59 a 25 días⁽⁴⁸⁾

VI. HIPÓTESIS

6.- HIPÓTESIS

Ho : Se detecta DNA del virus hepatitis B en pacientes atendidos en el Hospital Walter Cruz Vilca de Salaverry-La Libertad entre Marzo a Octubre 2016.

H1 : No se detecta DNA del virus hepatitis B en pacientes atendidos en el Hospital Walter Cruz Vilca de Salaverry-La Libertad entre Marzo a Octubre 2016.

VII. METODOLOGÍA

7.- METODOLOGÍA

Tipo de Investigación

Según la evolución del fenómeno del estudio: El presente estudio es un estudio descriptivo de una serie de casos.

Población muestral: Pacientes atendidos en el Hospital Walter Cruz Vilca de Salaverry-La Libertad entre Marzo a Octubre 2016.

Muestra: Sangre obtenida sin anticoagulante de pacientes donantes de sangre atendidos en el hospital Walter Cruz Vilca de Salaverry-La Libertad entre Marzo a Octubre 2016.

Unidad muestral: Suero obtenida de pacientes donantes de sangre atendidos en el hospital Walter Cruz Vilca de Salaverry-La Libertad

entre Marzo a Octubre 2016.

Criterios de inclusión:

- ü Perfil serológico de anti HBc IgG positivo, anti HBc IgM negativo y HBsAg negativo.
- ü Aparentemente sanos.
- ü Sin antecedentes de haber sufrido la hepatitis viral B aguda.
- ü Con edades entre los 18 a 55 años.
- ü Con residencia mayor de 5 años en Trujillo

Criterios de exclusión:

Se excluirán del estudio a individuos con:

- ü Perfil serológico de anti HBc IgM positivo; HBsAg positivo.
- ü Antecedentes de haber sufrido la hepatitis viral B aguda.
- ü Menores de 18 años y mayores de 55.
- ü Con residencia fuera de Trujillo o permanencia menor a 5 años en ella.

Diseño Muestral

Al estudio ingresarán todas los pacientes donantes que cumplieron con los criterios de inclusión y que asistieron como donantes de sangre al Hospital Walter Cruz Vilca entre los meses de marzo a octubre del 2015.

Todos los pacientes que se incluirán en el estudio firmarán un consentimiento informado.

PROCEDIMIENTO : Materiales y Reactivos

Tampón Tris estéril (TE):

Tris 10 mM (pH 8,0),

EDTA 1 mM

K tampón: Tris 20 mM (pH 8,0),

NaCl 150 mM,

EDTA 10 mM,.

10 mg de dextrano T4000 por ml

Fenol equilibrado con un tampón que contenía Tris 20 mM (pH 8.0)

NaCl 150 mM y EDTA 10 mM

Mezcla maestra de PCR:

Tris 10 mM (pH 8,3)

2,5 mM MgCl₂

KCl 50 mM,

200 uM de cada desoxirribonucleósido trifosfato,

2 U de Taq polimerasa (New England Biolabs),

1 uM de primer 1

1 uM de primer 2

200 ug gelatin por ml

DNA size marker: pBR322 digestado con ALU I.

Tampón de electroforesis de carga:

27 ml de glicerol

3 ml de tampón TBE 10 X

10 mg de azul de bromofenol

59 ml de H₂O (añadido para hacer una concentración final de volumen de

100 ml).

0,1 M ditiotritol.

Tampón de fosforilación 10x:

Tris 500 mM (pH 7,6),

100 mM MgCl₂

100 mM 2-mercaptoethanol

Primer:

3 – 5 x Secuencia mezcla de reacción:

Tris 200 mM (pH 7,5),

100 mM MgCl₂

250 mM NaCl

NaCl Didesoxi G, A, T, C y mezclas de reacción de terminación (8 uM dideoxy GTP)

80 uM cada dGTP, dATP, dTTP, and.dCTP;

50 mM NaCl

8 uM dideoxyATP;.

80 uM cada dGTP, dATP, dTTP, y dCTP;.

50 mM NaCl

8 uM dideoxy TTP;

80 mM cada dGTP, dATP, dTTP, dCTP y;.

50 mM NaCl

ADN polimerasa (Sequenase; US Biochemical Corp., Cleveland, Ohio) Detener la reacción

tampón de mezcla-de carga de gel para la secuenciación: 95% de formamida, EDTA 20 mM, 0,05% azul de bromofenol

0,05% de xilenocianol FF

NOMBRE	FUNCIÓN	SECUENCIA NUCLEOTIDICA 5' A 3'	LOCALIZACIÓN
PRIMER 1	Amplificación	CAA GGT ATG TTG CCC GTT TG	329-348
PRIMER 2	Amplificación	AAA GCC CTG CGA ACC ACT GA	587-568
PRIMER 3	Secuenciamiento	CTT CCA GGA ACA TCA ACT ACC	356-376

Se utilizarán estas secuencias porque su longitud de nucleótidos es lo más recomendado en diferentes trabajos de investigación, porque sus secuencias nucleotídicas se encuentran entre 19 y 25 nucleótidos, por ser rico en GC; es complementaria a la región deseada; este tipo de primers no forman horquillas de replicación interna y porque no son complementarias entre sí ; este primers es un consenso a nivel mundial.⁽³²⁾⁽⁴²⁾

Método: Obtención de la muestra: Se obtendrá por venipuntura sangre total (aproximadamente 5 mL) de donante y luego la muestra de sangre se centrifugará para la obtención de suero, aproximadamente usará 100 ul de suero y será almacenada a -20 °C antes del análisis.

Para la preparación de la plantilla de ADN antes de la amplificación extraer ácidos nucleicos del suero mediante el siguiente procedimiento:

1. Añadir 500 ul de buffer K para 100 ul de suero en tubos eppendorf de 1.5 ml y luego vortex por 30 segundos luego incubar la muestra 2 horas a 37 °C
2. Añadir en igual volumen de buffer equilibrado cloroformo-fenol (1:1) y luego vortex por 30 seg
3. Centrifugar a velocidad máxima (16,000 rpm) en una microcentrífuga por 5 minutos
4. Transferir la fase acuosa a otro tubo eppendorf de 1.5 ml
5. Repetir paso a paso 2 a 4 veces
6. Añadir 1/10 volume de 3M de acetato de sodio (pH 4,3) y 1ul de dextrano T4000 luego añade 2.5 volúmenes de etanol refrigerado (a -20 °C) y mezclar bien.

7. Mantener en hielo seco por 30 minutos o a -20 °C durante la noche.
8. Centrifugue a velocidad máxima en una microcentrífuga por 15 minutos.
9. Descartar el sobrenadante y añadir etanol refrigerado 70 %
10. Centrifugar por 5 minutos
11. Descartar el sobrenadante y secar el precipitado
12. Resuspender el pellet en 10 ul de TE

PCR AMPLIFICACIÓN

1.- Se preparará el master mix , añadiendo 90 ul de master mix para la reacción. En la preparación del master mix será necesario estimar el volumen requerido por una o dos reacciones para permitir pipeteos imprecisos y otras pérdidas de volúmenes . Añadir el DNA extraído . Superponer la mezcla con 100 ul de aceite mineral.

2.- Amplificar en un termociclador mediante el uso de los siguientes pasos:

Desnaturalización a 95°C por 5 minutos

Desnaturalización a 95 °C por 2 minutos

Anillamiento a 55 °C por 2 minutos

Elongación a 70 °C por 2 minutos .

Estos pasos serán repetidos por 35 ciclo en el último ciclo la elongación es a 70° C por 5 minutos.

3.- Preparar 3 % seakem 1 % agarosa en TBE buffer . Electroforesis separado de 10 ul de reacción producida con 2 ul de electroforesis de producto de reacción con 2 ul de buffer de carga por paredes en TBE buffer en TBE buffer junto al marcador de tamaño de DNA.

4.- Se visualizará el 259-pb del producto amplificado después de la coloración con bromuro de etidio .

Control de calidad

Control Positivo amplificado: 10 ng de HVB DNA. La muestra control positivo será proporcionada por el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas-Lima.

Amplificación de Control Negativo: 10 ul de agua destilada. (cada 5 reacciones)

Control de suero positivo: La muestra de suero de HBsAg paciente (Cada reacción

Suero de Control Negativo.

Muestra de sujeto salubre que esta negativo para VHB

Nota: Todas las muestras de suero y ADN de control se almacenan en alícuotas y se eliminan después de usarlos.

EXTRACCIÓN DE ADN VIRAL

El método de extracción de ADN a partir de 200 microlitros de suero, está basado en la lisis de la membrana del virus bajo ciertas condiciones químicas como detergentes, enzimas que permitan lisar la membrana del virus dejando libre el material genético y luego es tratado por una resina de carga catiónica y eluida con agua pura libre de DNAsas y RNAsas.

Luego el ADN será cuantificado por espectrofotometría para conocer la cantidad a utilizar en PCR y poder determinar la sensibilidad.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La PCR se realizará usando oligonucleótidos iniciadores (primers) ya reportados que son específicos para la región del gen del antígeno de superficie (HBsAg) y para todos los subtipos de Hepatitis B. Para amplificación se utilizará: 01 enzima ADN Polimerasa, Los dNTPs, Agua para PCR libre ADNsa y RNAsa; Cloruro de Magnesio (MgCl₂). Los tubos de reacción serán sometidos a diversas temperaturas: Denaturación del ADN a 95°C por 30 segundos, hibridación de los primers a 55°C por 30 segundos y una extensión a 72°C por 30 segundos. Se repetirán estas 3 temperaturas 35 veces y la extensión final a 72°C por 5 minutos^{(32) (42)}.

Se realizará la estandarización de la temperatura de hibridación de los primers, curvas de concentraciones de MgCl₂, y curvas de ADN para demostrar la sensibilidad de la técnica. Los productos de amplificación serán visualizados en geles de agarosa al 3 %, coloreados con syber safe y fotografiarlas.

En relación a la obtención de los datos:

ü Ingresarán al estudio las muestras de suero obtenidas de donantes de sangre atendidos en el Hospital Walter Cruz Vilca

ü La muestra obtenida será llevado a conservación a la temperatura de -20 °C para luego ser

transportado a laboratorio de Microbiología Molecular para su análisis respectivos.

ü Se recogerá la información de todos los donantes de sangre atendidos en el Hospital Walter Cruz Vilca con la finalidad de elaborar la base de datos respectiva para proceder a realizar el análisis respectivo.

Procesamiento y análisis de datos:

El registro de datos que están consignados en las correspondientes hojas de recolección de datos serán procesados utilizando el paquete estadístico SPSS Vers. 22.0, los que luego serán presentados en cuadros de entrada simple y doble, así como gráficos de relevancia.

Estadística Descriptiva:

En cuanto a las medidas de tendencia central se calculará la media, y en las medidas de dispersión la desviación estándar. También se obtendrán datos de distribución de frecuencias.

Estadística Analítica

En el análisis estadístico se hará uso de la prueba Chi Cuadrado (X^2), Test exacto de Fisher para variables categóricas y la prueba t de student para variables Cuantitativas, las asociaciones serán consideradas significativas si la posibilidad de equivocarse es menor al 5% ($p < 0.05$).

Se calculará la prevalencia respectiva para las infecciones por VHB.

Se calculará la asociación estadística tomando como significativo un $p < 0,05$ para cuantificar la fuerza de asociación se calculará la odds ratio (OR) con un intervalo de confianza de 95 %.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

8.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1. 1. OMS** , Nota descriptiva N° 204 junio del 2014
- 2. 2. Cabezas Sánchez C.** Prevalencia de marcadores serológicos para Hepatitis Viral A, B y Delta en escolares aparentemente sanos en Huanta. Tesis para optar el título de Especialista en Enfermedades Infecciosas y Tropicales. Universidad Peruana Cayetano Heredia.(1993).
- 3. 3. Gastelumendi R., Burstein M., León Barua R.** Contribución al estudio de hepatitis viral endemo-epidémica en Abancay. Ann de la Fac. de Med. 1960. XLII: 629-650.

4. **Indacochea S. Gotuzzo E.**, De la Fuente J., Phillips I., Whignall S. Elevada prevalencia de hepatitis B y Delta en el Valle interandino de Abancay. *Revista Medica Herediana* 1991. 2(4); 168-71.
5. **Dwyre DM, Holand PV.** Hepatitis viruses. En: Barbara JAJ, Regan FAM, Contreras MC, eds. *Transfusion Microbiology*. Cambridge: Cambridge University Press; 2008. p. 9-23.
6. **Dwyre DM, Fernando LP, Holland PV.** Hepatitis B, hepatitis C and HIV transfusion-transmitted infections in the 21st century. *Vox Sang*. 2011; 100(1):92-8.
7. **Julieta Rojo Medina.** Secretaría de Salud. Centro Nacional de Transfusión Sanguínea. Informes mensuales de ingresos y egresos de sangre y sus componentes y enfermedades transmisibles por transfusión. México, 2012.
8. **World Health Organization.** Making the most of World Blood Donor Day. [Internet](http://www.who.int/worldblooddonorday/resources/making_the_most_of_wbdd.pdf) Consultado el 30 de julio de 2012. Disponible en: http://www.who.int/worldblooddonorday/resources/making_the_most_of_wbdd.pdf.
9. **Zou S, Stramer SL, Notari EP, et al.** Current incidence and residual risk of hepatitis B infection among blood donors in the United States. *Transfusion*. 2009;49:1609-20.
10. **Zou S, Dorsey KA, Notari EP, et al.** Prevalence, incidence and residual risk of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infections among United States blood donors since the introduction of nucleic acid testing. *Transfusion*. 2010;50:1495-504.
11. **Szmunes W.** Hepatocellular carcinoma and the hepatitis virus: evidence for a causal association. *Prog Med Virol*. 1978; 24: 40-69.
12. **Kew MC.** The development of hepatocellular cancer in humans. *Cancer Surv*. 1986; 5: 719-39.
13. **Brown ML, Goldie SJ, Draisma G, Harford J, Lipscomb J.** Health service interventions for cancer control in developing countries in: priorities in developing countries. In: Jamison DT, Breman JG, Measham AR, Alleyne G, Claeson M, Evans DB, et al (editors). *Diseases control priorities in developing countries*. 2nd ed. New York: Oxford University Press; 2006.
14. **Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM.** GLOBOCAN 2000: Cancer incidence, mortality, and prevalence worldwide, Version 1.0, IARC Cancer Base N° 5. Lyon: IARC Press; 2001.
15. **Fuente :** *N Engl J Med* 2008. 359; 14: 1486 - 1500
16. Sistema de Gestión de calidad de PRONAHEBAS. Manual de Calidad. NT N° 011-MINSA(DGSP – V- 01.Lima – Perú 2014.
17. **Tanaka J.** Hepatitis B epidemiology in Latin America. *Vaccine* 2000; 18 Suppl 1:S17-9.
18. **Escudero A.** Situación Epidemiológica de la Hepatitis B en el Perú *Vigilancia Epidemiológica*. Bol. Epidemiol (Lima). 2013; 22 (26): 563 – 567.

- 19. Cabezas C**, Miranda J. A 38 year evaluation of death causes related to liver diseases in Huanta – Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 61(Suppl 3): 370.
- 20. World Health Organization.** Expanded Programme on Immunization. Protocol for assessing prevalence of hepatitis B infection in antenatal patients. Geneva: WHO; 1990. WHO/EPI/GEN/90.6
- 21. Maynard JE**, Kane MA, Hadler SC. Global Control of hepatitis B vaccine in the Expanded Programme on Immunization. *Rev Infect Dis.* 1989, 2(Suppl 3): S574-75.
- 22. Beasley RP**, Hwang LY, Lin CC, Chien CS. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet.* 1981; 2: 1129-33.
- 23. Mayca J**, Vallejos R. Hepatitis B en el Perú: revisión 1970-2002. *Rev Perú Med Exp Salud Pública.* 2004;21(4):261-8. Murakami S, Mutsuhiko M, Nakahiro Y, Doi T, Hato N, Yanagihara H. Bell palsy and herpes simplex virus identification of viral DNA in endoneural fluid and muscle. *Ann Intern Med* 1996; 24: 27-30.
- 24. Coronel L.** Incidencia de marcadores de HBsAg en pacientes con diagnóstico de hepatitis en el hospital de Huanta-Ayacucho. %5BTesis de Bachiller%5D. Huanta: Facultad de Biología UNSCH; 1985-1986.
- 25. Hidalgo H**, Reátegui G, Rada A. (1,999)Prevalencia de hepatitis viral A y B Factores asociados a su infección en población escolar del distrito de Huánuco. *Rev Perú Med Exp Salud Pública.*
- 26. Farfán G**, Vidal J, Inurrategui R, Velasco A. Detección del AgsHB en donantes de sangre del Hospital Cayetano Heredia y Clínica privada de Lima. Libro de de Resúmenes XI Congreso Peruano de Gastroenterología , Pag84, 1988.
- 27. Vildósola H**, Bautista M, Moran F y col. Prevalencia del AgHBs en donantes de sangre en el Hospital Loayza entre 1980 y 1985. Libro de Resúmenes del X Congreso Peruano de Gastroenterología. P 111, Lima Perú, 1986.
- 28. Soriano C**, Figueroa R, Padrón A y col. Prevalencia del HbsAG en donantes de sangre en el Hospital Central del IPSS N°2. VII Congreso Peruano de Gastroenterología, Pág. 96,1980.
- 29. Deville J**, Llanos A, Campos C y col. Factores de riesgo para infección por virus de hepatitis B en personal hospitalario. *Rev Gastroent Perú* 1989, 9:24.
- 30. Hoofnagle J**, Seefe L, Bales Z, Zimmerman H. 1995. Type B hepatitis after transfusion **with** blood containing antibody to hepatitis B core antigen.
- 31. Ren F**, Li H, Zhao H. Studies on hepatitis B virus infection in blood donors with positive anti-

HBc and negative HBsAg. Beijing Red Cross Blood Center. Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi 1998; 32(1): 7-9.

32. Hajar Guerra, Gisely Bióloga. "Presencia de ADN del VHB en donantes potenciales de sangre con anti HBc positivo y HBsAg negativo. Hospital de apoyo de Huanta – Ayacucho" Laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular, INS. ghijar@ins.gob.pe / giselyhi@yahoo.com 2007.

33. Zekri Ar, Awlia Aa, El Malawi H, Ismail Ef, Mabrouk G. Evaluation of blood units with isolated anti HBC for the presence of HBV DNA. Virology and immunology Unit Cancer biology Department and Clinical Pathology Department National Cancer Institute. Cairo, Egipto.

34. Allain J, Candotti D, Soldan K, Sarkodie F, Phelps B, Giachetti C, Shyamala V, Yeboah F, Anokwa M, Owusu-Ofori S, Opare-Sem O. 2000. The risk of hepatitis B virus infection by transfusion in Kumasi, Ghana. Division of Transfusion Medicine. Department of Haematology. University of Cambridge.

35. Ribeiro RM, Lo A, Perelson AS. Dynamics of hepatitis B virus infection. Microbes Infect. 2002; 4(8): 829-35

36. Lai CL, Yuen MF. The natural history of chronic hepatitis B. J Viral Hepatol. 2007; 14(Suppl 1): 6-10.S

37. Pearce N, Milne A, Moyes C. Hepatitis B virus: the importance of age at infection. N Z Med J. 1988; 101(858): 788-90.

38. McMahon BJ, Parkinson AJ, Helminiak C, Wainwright RB, Bulkow L, Kellerman-Douglas A, et al. Response to hepatitis B vaccine of persons positive for antibody to hepatitis B core antigen. Gastroenterology. 1992; 103(2): 590-94.

39. Lok ASF, Lai CL, Wu PC. Prevalence of isolated antibody to hepatitis B core antigen in an area endemic for hepatitis B virus infection: implication in hepatitis B vaccination programs. Hepatology. 1988; 8(4): 766-70.

40. Madelengoitia J, Ishida N, Umenay T, Miyamoto T, Mejia J, Flores W, et al. The prevalence of hepatitis B antigen among hepatitis patients and residents of Peru. Bull Pan Am Health Organ. 1975; 9(2): 142-47.

41. Preiksaitis JK, Rivet C. A history of the evolution of hepatitis C testing of blood donors: implications for the Canadian blood supply system. Transfusion. 1995; 35(4): 348-52.

42. Podzorski RP, Persing DH. Molecular detection and identification of microorganisms. In Murray PR (ed.) Manual of clinical microbiology. 6th ed. Washington: ASM, 1995. Pp. 130-157

- 43. Pfaller MA.** Molecular biology: molecular methods for direct detection of microorganisms in clinical specimens. In Isenberg HD (ed.). Essential procedures for clinical microbiology. Washington: ASM, 1998. Pp. 581-666.
- 44. Peters JC.** Hantavirus pulmonary syndrome in the Americas. In Scheld M, Craig W, Hughes J (eds.). Emerging infections 2. Washington; ASM, 1998. Pp. 17-64.
- 45. Khabbaz RH,** Chamberland M. From prions to parasites: issues and concerns in blood safety In Scheld M, Craig W, Hughes J (eds.). Emerging infections 2. Washington : ASM, 1998. Pp. 295-309.
- 46. Atmar R,** Englund J. Laboratory methods for the diagnosis of viral diseases. In Evans E, Kaslow R (eds.). Viral infections of humans. 4th ed. New York: Plenum Publishing Co., 1997. Pp. 229-251.
- 47. Whitley RJ,** Lakeman F. Herpes simplex virus infections of the central nervous system: herapeutics and diagnostic considerations. Clin Infect Dis 1995; 20: 414-420.
- 48. Janda JM,** Desmond EP, Abbott S. Animal and animal cell culture systems. In Balows A (ed.). Manual of clinical microbiology. 5th ed. Washington: ASM, 1991. Pp. 137 – 145

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ACTIVIDAD	INICIO	FIN
Pruebas piloto para estandarización de protocolos y métodos	16/03/2016	31/03/2016
Obtención de las muestra	30/03/2016	26/08/2016
Extracción de ADN	08/04/2016	26/08/2016
Amplificación de ADN	09/04/2016	27/08/2016
Revelado de ADN	10/04/2016	28/08/2016
Informe Parcial del Proyecto	30/06/2016	15/07/2016
Procesamiento y análisis de los datos	12/08/2016	30/09/2016
Informe Final del Proyecto	08/10/2016	29/10/2016

PRESUPUESTO

DESCRIPCION	CANTIDAD	PRECIO_UNITARIO	PRECIO_PARCIAL
REACTIVOS E INSUMOS	5 UNI	150	750
Guantes de látex de nitrilo	25 CAJ	10	250
OTROS	4 UNI	500	2000
Equipo	3 UNI	118	354
REACTIVOS E INSUMOS	2 UNI	350	700
REACTIVOS E INSUMOS	2 UNI	180	360
REACTIVOS E INSUMOS	2 UNI	110	220
REACTIVOS E INSUMOS	2 UNI	250	500
REACTIVOS E INSUMOS	5 UNI	200	1000
OTROS	10 UNI	100	1000
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	950	950
REACTIVOS E INSUMOS	2 UNI	700	1400
REACTIVOS E INSUMOS	2 UNI	400	800
REACTIVOS E INSUMOS	2 UNI	110	220
REACTIVOS E INSUMOS	5 UNI	87	435
CAJAS CRIOGENICAS	5 CAJ	60	300
REACTIVOS E INSUMOS	3 UNI	400	1200
REACTIVOS E INSUMOS	3 UNI	300	900
CONSULTOR	1 UNI	1000	1000
REACTIVOS E INSUMOS	2 UNI	750	1500
REACTIVOS E INSUMOS	2 UNI	110	220
Refrigeradora Bosch ECO TT 303/ 332 litros	1 CAJ	1.80	1.80
Mascarillas quirúrgicas	2 CAJ	18	36
REACTIVOS E INSUMOS	3 UNI	200	600
TRANSPORTE LOCAL	50 UNI	20	1000
Total 17696.80			