

GENOTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B EN PACIENTES DE ÁREAS ENDÉMICAS DEL PERÚ

Gisely Hijar^{1,a}, Magna Suárez^{1,b}, Carlos Padilla^{1,a}, César Cabezas^{1,2,c}

RESUMEN

En el mundo existen más de 350 millones de portadores crónicos con hepatitis viral B, en el Perú la prevalencia de este virus es variada. Existen áreas hiperendémicas en la región Amazónica y en algunos valles de la vertiente oriental de los Andes tales como Abancay y Ayacucho. El objetivo de este estudio fue determinar preliminarmente los genotipos del virus de la hepatitis B (HBV) presentes en 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 de este análisis indica la presencia del genotipo F (subtipo adw4) en todas las muestras analizadas.

Palabras clave: Hepatitis B/ virología; Genotipo; Perú (fuente: DeCS BIREME).

GENOTYPING OF HEPATITIS B VIRUS IN PATIENTS OF ENDEMIC AREAS FROM PERU

ABSTRACT

In the world there are more than 350 million of chronic carriers with hepatitis B virus (HBV), in Peru the prevalence of this virus is varied. There are hyperendemic areas in the Amazon Region and some valleys of the Eastern slope of the Andean such as Abancay and Huanta. The objective of this study was to determine preliminary the genotypes of the HBV present in serologic samples from Ancash, Ayacucho, Lima, Loreto and Ucayali areas. The analysis of partial S region HBV sequence was realized from twelve antigen e (HBeAg) positive serums. The result of this analysis indicates the presence of genotype F (subtype adw4) in all the analyzed samples.

Key words: Hepatitis B/ virology; Genotype; Peru (source: DeCS BIREME).

INTRODUCCIÓN

El virus de la hepatitis B (HBV) produce hepatitis aguda y crónica en el hombre, en el mundo existe más de 350 millones de portadores crónicos y se diagnostican 400 000 nuevos casos anualmente¹. En el Perú la prevalencia de hepatitis viral B es variada, existen áreas consideradas hiperendémicas en la región amazónica y en algunos valles de la vertiente oriental de los Andes tales como Abancay y Ayacucho-Huanta^{2,3}. La intensa migración ocurrida en las últimas décadas está permitiendo la dispersión de la infección hacia áreas de baja endemicidad como las grandes ciudades de la costa peruana⁴.

El genoma del HBV es circular de doble cadena y mide aproximadamente 3,2 kilobases, contiene cuatro marcos abiertos de lectura en fase. La detección del ADN del VHB es el marcador más sensible para determinar la replicación activa y la infectividad del virus circulante⁵.

El HBV ha sido clasificado en ocho genotipos A-G⁶⁻⁷, estos genotipos tienen diferente distribución geográfica⁸⁻¹¹. En el genotipo G presenta una única inserción en la región genómica que codifica el antígeno core en portadores del sur de Francia y el estado de Georgia en los Estados Unidos de Norte América⁷. Se ha descrito que algunos genotipos de HBV están asociados con cuadros de hepatocarcinoma^{8,12}, así como la asociación

¹ Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

² Instituto de Medicina Tropical "Daniel A. Carrión", Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

^a Biólogo molecular; ^b Bióloga; ^c Médico infectólogo.

de genotipos con alguna implicancia en la respuesta a la vacuna y al tratamiento de los casos crónicos.

El objetivo del estudio fue determinar de manera preliminar los genotipos del HBV en muestras serológicas peruanas basados en la secuencia parcial del región S del genoma de HBV.

EL ESTUDIO

Se incluyeron por conveniencia 12 muestras de suero sanguíneo de pacientes con diagnóstico de infección aguda de HBV (HBsAg, HBeAg y anti-HBc positivos). Estas muestras provenían de Ancash (2), Ayacucho (3), Lima (2), Loreto (3) y Ucayali (2).

Las muestras fueron procesadas utilizando el kit de purificación *Qiaamp Blood Kit* (Qiagen Inc.) según las indicaciones de los fabricantes. Se amplificó una parte de la región genómica S del HBV utilizando la metodología reportada previamente¹⁴. Los productos de amplificación fueron purificados utilizando el *Qiaquick PCR Purification Kit* (Qiagen Inc.), y luego fueron clonados utilizando el Kit *pGEM-T Easy Vector System* (Promega) y se secuenció los plásmidos recombinantes obtenidos utilizando el kit de secuenciación ALFexpress™ AutoRead Sequencing Kit (GE Healthcare.) y el secuenciador ALFexpress, todos los kits fueron utilizados según las instrucciones de los fabricantes. Se secuenció dos clones de cada producto no encontrándose diferencias entre las secuencias nucleotídicas obtenidas de cada clon. Asimismo, todas las muestras presentaron la misma secuencia que se presenta en la Figura 1.

El análisis de homología de secuencias nucleotídicas y aminoácidas de la región parcial S del genoma viral permitió predecir que todas las muestras pertenecían al genotipo F subtipo adw4 (Figura 1). Asimismo esta predicción concuerda con los criterios descritos por

Echevarria¹², en los aminoácidos presente codones 122K, 127L, 134F, 159G, 160K, 177V y 178Q que permiten predecir este subtipo¹². El genotipo Fawd4 peruano presenta 100% de homología con aislamientos de HBV de Venezuela, Brasil, Colombia, Argentina, Italia y Holanda, además presenta un cambio nucleotídico con otros aislamientos de HBV de Venezuela, Colombia, Nicaragua, El Salvador, Guatemala y Honduras. El análisis filogenético de estas secuencias indica claramente su relación con diferentes aislamientos de HBV subtipo adw4 reportados en diferentes países de Sudamérica, así como de Europa y Japón (Figura 2).

El secuenciamiento nucleotídico se registró en el Banco Internacional de Genes GENBANK del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) de los Estados Unidos. Los números de acceso de las secuencias nucleotídicas son AY059396, AY059397 y AY059398.

DISCUSIÓN

El genotipo F presenta 14% de divergencia con los genomas de otros genotipos, siendo el genotipo más divergente de HBV caracterizado hasta ahora⁸. Además, comparaciones filogenéticas muestran que el genotipo F no desciende de una rama común a los demás genotipos de HBV, este genotipo es evolutivamente más homólogo a genotipos de HBV de primates no humanos^{6,15}.

Estudios similares al nuestro indican que el genotipo F está distribuido en América en poblaciones autóctonas, probablemente este genotipo se haya diseminado en algunos lugares de Europa después del descubrimiento de América^{4,7-9,11,13,15}. Nuestros resultados son concordantes con estos hallazgos.

Sin embargo, el número de muestras analizadas no nos permite detectar la posible existencia de otros genotipos

5'-T	CCT	CTA	CTT	CCA	GGA	TCC	ACG	ACC	ACC	AGC	ACG	GGA	CCA	TGC	AAA	ACC	TGC	ACA
	P	L	L	P	G	S	T	T	T	S	T	G	P	C	K	T	C	T
	ACT	CTT	GCT	CAA	GGA	ACC	TCT	ATG	TTT	CCC	TCT	TGC	TGC	TGT	TCC	AAA	CCC	TCG
	T	L	A	Q	G	T	S	M	F	P	S	C	C	C	S	K	P	S
	GAC	GGA	AAC	TGC	ACT	TGT	ATT	CCC	ATC	CCA	TCA	TCC	TGG	GCT	TTA	GGA	AAA	TAC
	D	G	N	C	T	C	I	P	I	P	S	S	W	A	L	G	K	Y
	CTA	TGG	GAG	TGG	GCC	TCA	GCC	CGT	TTC	TCC	TGG	CTC	AGT	TTA	CTA	GTG	CAA	TTT
	L	W	E	W	A	S	A	R	F	S	W	L	S	L	L	V	Q	F
	GT	-3'																

Figura 1. Secuencia nucleotídica y aminoácida de los aislamientos de HBV analizados en muestra peruanas.

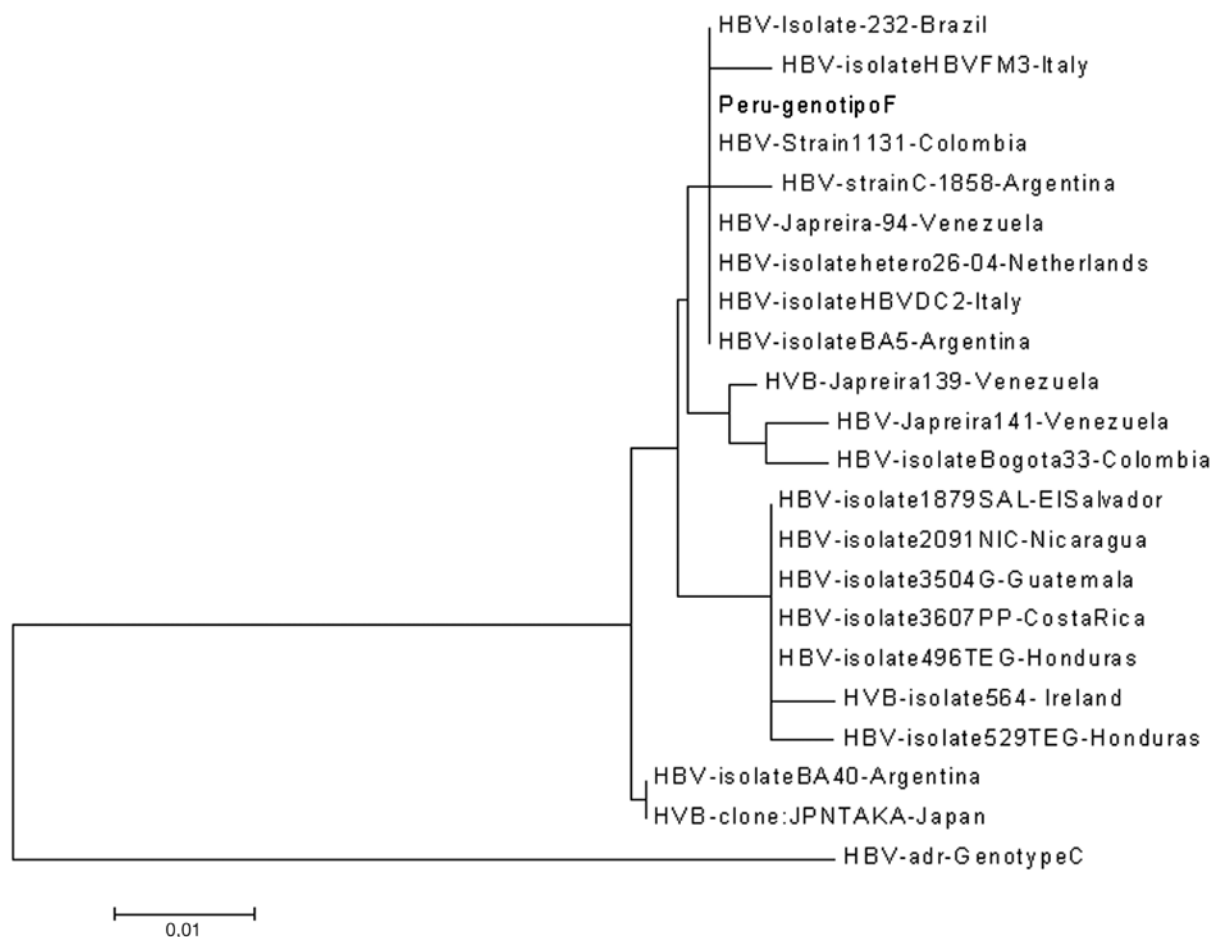


Figura 2. Cladograma de secuencias de nucleótidos de diversos aislamientos de HBV de diferentes zonas geográficas comparadas con nuestros resultados. Este cladograma se ha obtenido utilizando los algoritmos Neighbor-Joining y el software MEGA 4.0.1.

circulantes en el Perú. Además, debido a que la región genética analizada es muy específica, no hemos podido diferenciar subtipos genéticos dentro del genotipo F, por lo cual recomendamos el estudio de la secuencia de otros genes para determinar mejor el polimorfismo genético del HBV en zonas endémicas peruanas.

Se ha reportado que algunos genotipos de HBV están asociados con diferentes pronósticos de la enfermedad¹³. Así, probablemente algunos genotipos o subtipos genéticos estén asociados con cuadros más graves de esta enfermedad en pacientes con HBV y coinfectados con el VIH¹⁶ o también puedan tener alguna implicancia en la respuesta a la vacuna cuando esta es elaborada utilizando otros genotipos como el A y D¹⁷. Asimismo, la presencia de ciertos genotipos podría tener implicancias para el tratamiento de la infección crónica, por lo que es importante seguir evaluando y caracterizando más detalladamente los genotipos de HBV en el Perú incluyendo su distribución y resistencia a los antivirales que puedan ser parte de la terapia que se instaure.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dehesa-Violante M, Nuñez-Nateras R. Epidemiology of hepatitis virus B and C. Arch Med Res 2007; 38(6): 606-11.
2. Cabezas C, Suárez M, Romero G, Carrillo C, García MP, Reátegui J, et al. Hiperendemicidad de hepatitis viral B y Delta en pueblos indígenas de la Amazonía Peruana. Rev Peru Med Exp Salud Publica. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2006; 23(2): 114-22.
3. Cabezas C. Hepatitis virales B y Delta en el Perú: Prevención y control. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2002; 19(3): 150-61.
4. Campos RH, Mbayed VA, Pineiro Y, Leone FG. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Latin America. J Clin Virol. 2005; 34(Suppl 2): S8-13.
5. Schaefer S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. World J Gastroenterol. 2007; 13(1): 14-21.
6. Norder H, Couroucé AM, Magnius LO. Complete nucleotide sequences of six hepatitis B viral genomes encoding the surface antigen subtypes ayw4, adw4q-, and adr- and their phylogenetic classification. Arch Virol Suppl. 1993; 8: 189-99.

7. **Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF, et al.** A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol.* 2000; 81(Pt 1): 67-74.
8. **Mbayed VA, Barbini L, Lopez JL, Campos RH.** Phylogenetic analysis of the hepatitis B virus (HBV) genotype F including Argentine isolates. *Arch Virol.* 2001; 146(9): 1803-10.
9. **Fares MA, Holmes EC.** A revised evolutionary history of hepatitis B virus (HBV). *J Mol Evol.* 2002; 54(6): 807-14.
10. **Gutiérrez C, Devesa M, Loureiro CL, León G, Liprandi F, Pujol FH.** Molecular and serological evaluation of surface antigen negative hepatitis B virus infection in blood donors from Venezuela. *J Med Virol* 2004; 73(2):200-7.
11. **Mello F, Souto F, Nabuco L, Villela-Nogueira C, Coehlo HS, Franz H, et al.** Hepatitis B virus genotypes circulating in Brazil: molecular characterization of genotype F isolates. *BMC J Microbiol.* 2007; 7: 103.
12. **Echevarría JM, Avellón A.** Hepatitis B virus genetic diversity. *J Med Virol.* 2006; 78(Suppl 1): S36-42.
13. **Kao JH.** Hepatitis B viral genotypes: clinical relevance and molecular characteristics. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17(6):643-650.
14. **Hijar G, Carrillo C, Padilla C, Cabezas C, Suárez M, Romero G, et al.** Estandarización de la PCR para el diagnóstico del virus de la hepatitis B en el Perú. *Rev Peru Med Exp. Salud Publica.* 1998, 15 (1-2): 30-33.
15. **Magnius LO, Norder H.** Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene. *Intervirology.* 1995; 38(1-2): 24-34.
16. **Gomes SA, de Castro L, Niel C, Santos EA.** Uncommon mutation pattern of a hepatitis B virus isolate from genotype F infecting a patient with AIDS. *J Infect.* 2004; 48(1): 102-8.
17. **Tacke F, Amini-Bavil-Olyae S, Heim A, Luedde T, Manns MP, Trautwein C.** Acute hepatitis B virus infection by genotype F despite successful vaccination in an immune-competent German patient. *J Clin Virol* 2007; 38(4): 353-7.

Correspondencia: Blga. Gisely Hijar Guerra. Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología, Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.
 Dirección: Av. Defensores del Morro 2268, Chorrillos, Lima 9.
 Teléfono: (511) 251-6151
 Correo electrónico: ghijar@ins.gob.pe

**Consulte las ediciones anteriores de la
 Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública
 en WWW.SCIELO.ORG.PE**

