

IDENTIFICACIÓN DE GENOTIPOS DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B Y MUTACIONES
EN LOS GENES P Y S, A PARTIR DE MUESTRAS DE SUEROS PROCEDENTES DE
TREINTA Y DOS DEPARTAMENTOS DE COLOMBIA, 2002 – 2014.

NIDIA JANETH FORERO CASTRO

UNIVERSIDAD EL BOSQUE
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BOGOTÁ, COLOMBIA
2017

IDENTIFICACIÓN DE GENOTIPOS DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B Y MUTACIONES
EN LOS GENES P Y S, A PARTIR DE MUESTRAS DE SUEROS PROCEDENTES DE
TREINTA Y DOS DEPARTAMENTOS DE COLOMBIA, 2002 – 2014.

NIDIA JANETH FORERO CASTRO
TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE:
MAGISTER EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS

DIRECTORA:
DIOSELINA PELAEZ CARVAJAL
MSc. Coordinadora Grupo de Virología
Instituto Nacional De Salud

CODIRECTORA:
KATHERINE LAITON DONATO
MSc. Unidad de Secuenciación y Genómica
Grupo de Virología - Instituto Nacional De Salud

UNIVERSIDAD EL BOSQUE
FACULTAD DE CIENCIAS
BOGOTÁ, COLOMBIA

2017

"La Universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, sólo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia".

Agradezco a Dios y a la Virgen de Chiquinquirá por la nueva oportunidad recibida y las muchas bendiciones que sigo recibiendo. Agradezco a mis padres Antonio y Trinidad por su apoyo incondicional siempre. A mi hermana Maribel por el apoyo y motivación que me brindó para iniciar la Maestría. A mis maestros de la Universidad el Bosque y a mi Directora de tesis por el gran apoyo recibido.

Dedico este trabajo a mis Padres, hermanas y a mis grandes amores Ray, Raikkonen,
Sofía y Luna.

TABLA DE CONTENIDO

ABREVIATURAS	11
RESUMEN.....	13
1 INTRODUCCION	15
2 MARCO TEORICO	17
2.1 CONCEPTOS Y FUNDAMENTOS.....	17
2.1.1 EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN	17
2.1.2 CLASIFICACIÓN Y ESTRUCTURA DEL VIRION	18
2.1.3 GENOMA	20
2.1.4 REPLICACIÓN.....	24
2.1.5 VARIABILIDAD GENÉTICA DEL VHB	24
2.1.5.1 Subtipos del VHB	26
2.1.5.2 Genotipos del VHB	26
2.1.5.2.1 Genotipos y progresión de la enfermedad.....	28
2.1.5.2.2 Genotipos y respuesta a antivirales	28
2.1.5.3 Mutaciones	29
2.1.5.3.1 Mutaciones en el gen preCore y Core.....	30
2.1.5.3.2. Mutaciones en el gen S	31
2.1.5.3.3 Mutaciones en el gen P	33
2.1.5.3.4 Mutaciones en el gen X.....	34
2.1.6 MÉTODOS DE GENOTIPIFICACIÓN Y BÚSQUEDA DE MUTACIONES	34
2.1.7 PATOGÉNESIS E INMUNIDAD	37
2.1.8 PRESENTACIÓN CLÍNICA	39
2.1.9 DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR VHB.....	40
2.2 ANTECEDENTES.....	41
2 OBJETIVOS.....	43
3.1 Objetivo general	43
3.2 Objetivos específicos	43
3 METODOLOGIA	44
4.1 Muestras clínicas	44
4.2 Extracción de ADN viral	44
4.3 Amplificación del gen P mediante PCR convencional.....	44
4.4 Secuenciación, edición de secuencias y análisis filogenético	45

4.5	Análisis filogenético	46
4.6	Análisis de resistencia a antivirales	47
5	RESULTADOS.....	49
5.1	Distribución de muestras por departamento.	49
5.2	Caracterización molecular de Genotipos y subgenotipos del VHB circulantes en Colombia.....	49
5.3	Mutaciones en los genes S y P del VHB circulantes en Colombia y su asociación con resistencia a antivirales y escape.	57
6	DISCUSION	61
7	CONCLUSIONES	68
8	PERSPECTIVAS	69
	BIBLIOGRAFIA.....	70

LISTA DE TABLAS

Pág

Tabla 1 Comparación de características clínicas y virológicas de los genotipos del VHB.	29
Tabla 2 Distribución de muestras según ente territorial.....	49
Tabla 3 Mutaciones de resistencia y escape en los genes P y S del VHB, Colombia 2002-2014.	59

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Esquema del Virus de Hepatitis B.....	19
Figura 2 Representación esquemática del genoma del VHB y sus ORF.....	21
Figura 3 Representación esquemática del gen S del VHB.....	23
Figura 4 Representación esquemática del gen P del VHB.....	24
Figura 5 Muestras positivas por PCR para los genes P (parcial) y S del VHB por Departamento, periodo 2002-2014.	51
Figura 6 Electroferograma de secuenciación del gen P del VHB.	52
Figura 7 Electroferograma de secuenciación del Gen S del VHB.....	52
Figura 8 Inferencia Filogenética por Neighbor-Joining de VHB basada en el gen de la polimerasa viral (parcial de 1591 pb).	54
Figura 9 Variabilidad genética en la región secuenciada correspondiente al gen de la polimerasa (parcial) de VHB.	55
Figura 10 Genotipos de VHB presentes en Colombia. Inferencia Filogenética por Neighbor-Joining basada en un fragmento de 377 pb (posiciones 1155-1531 del genoma de referencia NC_003977).	56
Figura 11 Variación aminoacídica y presencia de mutaciones de resistencia en el dominio RT del gen que codifica para la Polimerasa de VHB.....	57
Figura 12 Variación aminoacídica y presencia de mutaciones de escape en el antígeno S pequeño de VHB (Small-HBsAg).	58
Figura 13 Región codificante de los antígenos de superficie de VHB.	60

ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
Acs	Anticuerpos
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNrc	ADN relajado circular
ADV	Adefovir
Anti-HBc	Anticuerpos contra el antígeno del core
Anti-HBe	Anticuerpos contra el antígeno e
Anti-HBs	Anticuerpos contra el antígeno s
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNm	ARN mensajero
BCP	Promotor basal del core
C	Core
CHC	Carcinoma hepatocelular
dsADN	ADN bicatenario
ETV	Entecavir
HBcAg	Antígeno del Core del Virus de Hepatitis B
HBcAg	Antígeno del Core del Virus de Hepatitis B
HBeAg	Antígeno e del Virus de Hepatitis B
HBsAg	Antígeno de superficie del Virus de Hepatitis B
HBV	Virus Hepatitis B
HBx	Proteína x
HIV	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
IFN	Interferón
IFN _γ	Interferón gamma
LdT	Telbivudina
LMV o 3TC	Lamivudina
NK	Células naturales asesinas
NKT	Células naturales asesinas T
nt	Nucleótidos
OBI	Infección Oculta por Virus de la Hepatitis B (Occult hepatitis B virus infection)
ORF	Marco abierto de lectura (Open Reading Frame)
P	Polimerasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
Peg-IFN	Interferón pegilado
pgARN	ARN pregenómico
PMEADAVS	Potenciales mutantes de escape asociados con antivirales
preS1	L- HBsAg o HBsAg
preS2	M-HBsAg
PT	Proteína terminal
RHP	Región hidrofílica principal
RHP	Región hidrofílica principal

RT o rt	Transcriptasa inversa/ADN polimerasa-ADN dependiente (rt o RT)
S	S-HBsAg o HBsAg
TDF	Tenofovir
Tm	Temperatura de fusión (melting temperature)
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
VHB	Virus de Hepatitis B

RESUMEN

Introducción: La hepatitis B es una enfermedad causada por el virus de la hepatitis B (VHB) que es el tipo más grave de hepatitis vírica en todo el mundo constituyéndose así en un importante problema de salud pública. Se estima que 257 millones de personas están infectadas crónicamente con el virus de hepatitis B y que todavía hay acceso limitado al diagnóstico y tratamiento de la hepatitis B en muchos contextos con recursos limitados. En Colombia el patrón de endemicidad es heterogéneo con circulación de diferentes genotipos virales. El virus de hepatitis B tiene una alta tasa de mutaciones a lo largo del genoma que le confieren resistencia a la terapia antiviral o le permiten escapar de la respuesta inmune del hospedero tras la vacunación o por infección natural y en otros casos causar infección oculta y progresión a carcinoma hepatocelular (CHC).

Objetivo: Identificar genotipos del virus de la hepatitis B (VHB) y mutaciones en los genes S y P en muestras de la seroteca del laboratorio de virología del Instituto Nacional de Salud recolectadas de los treinta y dos departamentos de Colombia durante el período 2002 a 2014.

Metodología: A partir de 495 muestras de suero positivas para HBsAg se realizó detección molecular y posteriormente secuenciación de una región de 1591 nucleótidos correspondiente a los genes P y S. Finalmente se realizó análisis filogenético e identificación de mutaciones de resistencia y escape.

Resultados: En 66 muestras (13,3%) se logró la detección molecular del genoma viral y 28 muestras (42,4%) fueron exitosamente secuenciadas. El análisis filogenético permitió identificar los genotipos/subgenotipos F3 y A2. La muestra 49884_Cundinamarca_CO_2003 presentó simultáneamente las sustituciones asociadas con resistencia L180M y M204V, mientras que la muestra 60265_Cesar_CO_2004 presentó la mutación de resistencia I169L. Se identificó la mutación P120Q en la muestra 48877_Guaviare_CO_2002. Dos de las muestras presentaron una delección de 105 nucleótidos en la región preS1-preS2.

Conclusiones: Se confirmó la circulación en Colombia de los genotipos/subgenotipos F3 y A2, y se detectó presencia de mutaciones de resistencia y escape. El presente estudio constituye un aporte en la epidemiología molecular del VHB en Colombia y la búsqueda de mutaciones en los genes seleccionados es valiosa durante la toma de decisiones en la elección de la terapia antiviral.

Palabras clave: Virus de hepatitis B; HBsAg; genotipo; mutación.

ABSTRACT

Introduction:

Hepatitis B is a disease caused by the hepatitis B virus (HBV), which is the most serious type of viral hepatitis in the world, constituting itself in an important public health problem. It is estimated that 257 million people are chronically infected with the hepatitis B virus and that there is still limited access to the diagnosis and treatment of hepatitis B in many resource-limited settings. In Colombia the pattern of endemicity is heterogeneous with circulation of different viral genotypes. The hepatitis B virus has a high rate of mutations throughout the genome that confers resistance to antiviral therapy or allow it to escape the host immune response after vaccination or by natural infection and in other cases causes occult infection and progression to hepatocellular carcinoma (CHC).

Methodology: A total of 495 serum samples with previous HBsAg reactive result were used for molecular detection. A 1591 nucleotides region corresponding to the P (partial) and S genes was sequenced from the PCR-amplified samples. Phylogenetic analysis was performed for genotyping and escape mutations was identified.

Results: In 66 samples (13, 3%) the viral genome of VHB was detected. Twenty-eight samples (42, 4%) were successfully sequenced. The phylogenetic analysis allowed the identification of subgenotypes F3 and A2. The sample identified as 49884_Cundinamarca_CO_2003 simultaneously showed the mutations associated with resistance L180M and M204V, while 60265_Cesar_CO_2004 showed the resistance mutation I169L. A single escape mutation, P120Q was identified in 48877_Guaviare_CO_2002. Two samples showed a deletion of 105 nucleotides in the preS1-preS2 region.

Conclusions: The circulation of genotypes/subgenotypes F3 and A2 of VHB in Colombia was confirmed, as well as the presence of some resistance and escape mutations. The present study constitutes a contribution in the molecular epidemiology of HBV in Colombia and the search for mutations in the selected genes is valuable during decision making about antiviral therapy.

Keywords: Hepatitis B virus; HBsAg; genotype; mutation.

1 INTRODUCCION

La hepatitis B es una enfermedad causada por el virus de la hepatitis B (VHB), constituye un importante problema de salud pública y es el tipo más grave de hepatitis vírica en todo el mundo (1).

A nivel mundial prevalencia más significativa de la hepatitis B se registra en la región del Pacífico occidental seguido por la región del Mediterráneo Oriental, la región de Asia sudoriental, la región europea y las Américas (1). Se estima que 2.8 millones de personas viven con hepatitis B crónica en las Américas, de las cuales 2.1 millones viven en América Latina y el Caribe (2).

El virus de la hepatitis B (VHB) pertenece a la familia *Hepadnaviridae*, género *Orthohepadnavirus*, su genoma es una molécula de ADN circular, parcialmente de doble hebra, de aproximadamente 3.2 kb, constituido por marcos de lectura total o parcialmente superpuestos que codifican para las proteínas preCore/Core, PreS1/preS2/S, Polimerasa y X (3).

Basado en una divergencia intergrupo mayor al 8% a través del genoma completo, el VHB se ha clasificado filogenéticamente en 10 genotipos, identificados de la A-J, siendo el genotipo F el de mayor distribución y prevalencia en el continente Americano incluyendo Colombia (4).

Aunque la progresión y severidad de la hepatitis B es multifactorial, se han identificado mutaciones en el genoma de VHB asociadas con progresión a carcinoma hepatocelular, hepatitis fulminante y resistencia a terapia antiviral como Lamivudina (LMV o 3TC), Entecavir (ETV) Telbivudina (LdT), Adefovir (ADV) y Tenofovir (TDF) (5); desarrollo de mutantes de escape vacunal (6) y casos de infección oculta caracterizada por la presencia de ADN sin detección de antígeno de superficie (HBsAg) en suero (7).

Las variantes del VHB que albergan mutaciones en el gen de la polimerasa viral son las causantes de las resistencias a tratamientos con inhibidores de dicha enzima que pueden ser análogos de nucleótidos o nucleósidos (8).

La proteína S es la principal diana de los anticuerpos neutralizantes anti-HBs, por lo que los cambios de aminoácidos en ella pueden evitar la neutralización del virus por estos anticuerpos (9).

Dado que el gen Pol que codifica la polimerasa superpone completamente el gen S que codifica la proteína de superficie, cada mutación que se produce en el gen Pol implica

posibles cambios en la proteína de envoltura y viceversa. Así, mutantes del VHB resistentes a los medicamentos que emergen bajo el tratamiento también pueden mostrar mutaciones en la proteína S causando alteración en su antigenicidad. Estos mutantes resistentes a antivirales y que posiblemente son además mutantes de escape a la vacuna, afectan negativamente la eficacia tanto del tratamiento antiviral como de los programas de vacunación (10,11).

Por lo anterior, el objeto del presente estudio de carácter descriptivo de corte longitudinal y retrospectivo es identificar genotipos del virus de la hepatitis B (VHB) y mutaciones en los genes S y P en muestras de la seroteca del laboratorio de virología del Instituto Nacional de Salud recolectadas de los treinta y dos departamentos de Colombia y del Distrito Capital durante el período 2002 a 2014.

Los resultados del presente proyecto de investigación serán significativos para el reporte y conocimiento de los genotipos del VHB circulantes en Colombia durante el periodo 2002-2014 y la detección de mutaciones en los genes P y S, que contribuyen a la elección adecuada de la terapia antiviral y al pronóstico de la enfermedad.

2 MARCO TEORICO

2.1 CONCEPTOS Y FUNDAMENTOS

2.1.1 EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN

De acuerdo con la Organización mundial de la salud (OMS) se estima que 257 millones de personas están infectadas crónicamente con el virus de hepatitis B (1) y que todavía hay acceso limitado al diagnóstico y tratamiento en muchos contextos con recursos limitados. Además informa que a 2015 el porcentaje de las personas que viven con infección por el VHB y que conocían su diagnóstico era del 9% (22 millones) y de los diagnosticados, la cobertura de tratamiento global fue de sólo el 8% (1,7 millones) (1). Muchas personas son diagnosticadas sólo cuando ya tienen enfermedad hepática avanzada por lo que entre el 15% y el 25% de las personas con enfermedad crónica mueren por cirrosis o cáncer de hígado (12,13).

La máxima prevalencia de la hepatitis B se registra en la región del pacífico occidental y la región de africana, donde el 6.2% y 6.1% respectivamente de la población adulta está infectada. En las regiones del Mediterráneo oriental, sudeste Asiático y región Europea, un 3.3%, 2.0% y 1,6 %% de la población está infectada, respectivamente. En las Américas el 0,7% de la población de la región está infectada (1).

La seroprevalencia de hepatitis B en Latinoamérica es de aproximadamente 0.48% y en Colombia se estima en 2.29% (12). En el año 2016 se notificaron 1.967 casos de hepatitis B al sistema nacional de vigilancia epidemiológica SIVIGILA, el 42% de los casos notificados proviene de los departamentos de Antioquia, Bogotá y Norte de Santander, la incidencia nacional de hepatitis B fue de 4 casos por cada 100.000 habitantes (14). Con un patrón epidemiológico heterogéneo debido a las diferencias geográficas, étnicas, culturales y socioeconómicas, el país ha sido considerado de endemidad baja e intermedia (15).

Hay dos modos principales de transmisión de VHB que se producen en el mundo. La transmisión perinatal, que ocurre al nacer de madres infectadas a sus recién nacidos, que representa la mayor parte de la transmisión del VHB en todo el mundo. La transmisión horizontal puede ocurrir a través de cortes abiertos; transfusión de productos sanguíneos;

romper las buenas prácticas para prevenir las infecciones transmitidas por la sangre en el ámbito de la atención de la salud; transmisión sexual y comportamientos de riesgo, incluyendo el uso de drogas intravenosas o tatuajes, perforación corporal y procedimientos de escarificación sin el uso de equipos esterilizados y agujas (16)

La probabilidad de que la infección se cronifique depende de la edad a la que se produzca. Los niños infectados con el virus de la hepatitis B antes de cumplir los seis años son los más expuestos al riesgo de sufrir infecciones crónicas. Así, entre un 80% un 90% de los lactantes infectados en el primer año de vida sufrirán una infección crónica; y entre un 30% y un 50% de los niños infectados antes de cumplir los seis años sufrirán una infección crónica. En los adultos, menos de un 5% de las personas sanas que se infecten en la edad adulta sufrirán una infección crónica; y entre un 20% y un 30% de los adultos que padecen una infección crónica sufrirán cirrosis y/o cáncer hepático (1).

2.1.2 CLASIFICACIÓN Y ESTRUCTURA DEL VIRION

La identificación del antígeno australiano, conocido posteriormente como antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), por Baruch S. Blumberg a mediados de los años sesenta, la caracterización por microscopía electrónica de partículas de VHB humano a principios de los años 70 por D.S Dane y la caracterización del genoma viral permitieron la identificación del VHB como un miembro prototipo de la familia Hepadnaviridae (17,18).

Los Hepadnaviridae , son virus de ADN que incluyen los Orthohepadnavirus que infectan mamíferos (entre otros VHB, virus de la hepatitis de la marmota [WHV], virus de la hepatitis de la ardilla de tierra [GSHV]) y los Avihepadnavirus que infectan aves (virus de la hepatitis del pato [DVHB] y virus de la hepatitis de garza [HVHB]) (19). La asignación de estos dos géneros se basa en las fuertes similitudes en la secuencia de ADN entre todos los Orthohepadnavirus y entre todos los Avihepadnavirus, pero casi la completa falta de homología entre los dos grupos (3).

Una divergencia máxima de secuencias de aproximadamente 40% se encuentra entre los Orthohepnavirus, en comparación con aproximadamente el 20% entre los Avihepadnavirus. La familia Hepadnaviridae tiene genomas de tamaño extremadamente pequeño (3-3,3 kbp),

una disposición de marcos abiertos de lectura y una estrategia única de replicación por transcripción inversa, que los diferencia casi completamente de otros virus (3).

El VHB es un virus esférico con un diámetro exterior de aproximadamente 42 nm. La envoltura interna del virus tiene un diámetro de aproximadamente 22 nm y está constituido por 120 dímeros de la proteína core. Los dímeros forman la cápside icosaédrica con un número de triangulación $T = 4$. La cápside se cubre con una membrana de lipoproteína formada por tres formas de la proteína de la envoltura viral: grande (L), mediana (M) y pequeña (S) adquiridas junto con los lípidos del huésped cuando brotan en cuerpos multivesiculares. Las proteínas L, M, y S están presentes en la envoltura del virus en una proporción de aproximadamente 1: 1: 4. Las cápsides contienen una copia única del genoma ADN (dsADN, ADN bicatenario), que está covalentemente ligado a la transcriptasa inversa (RT) en el extremo 5' de la hebra completa. La transcriptasa reversa (TR) proporciona la actividad ADN polimerasa endógena. Hay también evidencia de la presencia de proteínas celulares incluyendo una o más serina-quinastas dentro del virus. Los títulos de VHB pueden variar significativamente entre los pacientes y puede ir hasta 10^{10} por ml en sangre (3,20). (Figura 1)

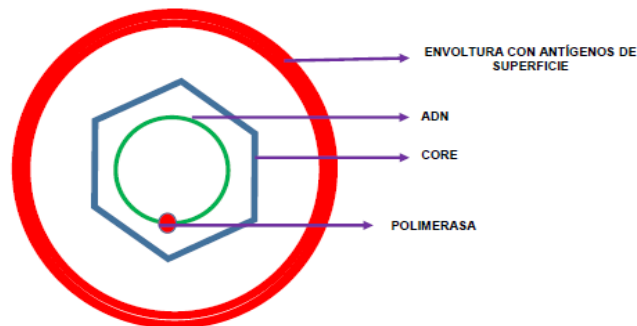


Figura 1 Esquema del Virus de Hepatitis B.

Las infecciones por el VHB también llevan a la liberación de partículas subvirales no infecciosas: las esferas y los filamentos. Las esferas de 22 nm contienen las proteínas M y S en una relación de aproximadamente 1: 2 y sólo trazas de proteína L; pueden alcanzar títulos tan altos como 10^{12} por ml y representan las más abundantes partículas liberadas

en la sangre a partir de células infectadas del hígado. Los filamentos en forma de varilla tienen las proteínas L, M y S en una proporción 1: 1: 4, con un diámetro de aproximadamente 22 nm. La función de estas partículas subvirales en el ciclo de vida del VHB no se conoce, pero una posibilidad es que al unirse con los anticuerpos neutralizantes faciliten la propagación y el mantenimiento del virus en las células (3).

2.1.3 GENOMA

Dentro del virion se encuentra el genoma ADN bicatenario de aproximadamente 3.200 pares de bases (pb) de longitud y mantiene en conformación circular a pesar de no estar cerrado covalentemente (ADNrc) debido a una pequeña región cohesiva que solapa la región situada entre los extremos 5' de ambas cadenas (3).

La cadena más larga (L) posee una secuencia nucleotídica complementaria a la del ARN mensajero (ARNm) viral, y por convención se la designa como cadena negativa (-). Por ende, la cadena más corta (S) es la positiva (+). La cadena (-) posee los extremos 5' y 3' fijos, mientras que la cadena (+) exhibe el extremo 5' fijo y el 3' en posición variable. En el extremo 5' de ambas cadenas, a la cadena (-) se le une covalentemente la proteína terminal (codificada por el dominio PT de la polimerasa viral), y a la cadena (+) se le une un oligoribonucleótido de 18 bases de longitud proveniente del ARN pregenómico (pgARN) (3).

El genoma del VHB contiene 4 marcos de lectura abierta (ORF) (C, P, S y X) solapados (67%) que se transcriben en 5 ARN mensajeros (ARN pre-core, ARN core, ARN preS1, ARN preS2/S y ARN X) para formar las 7 proteínas del VHB (pre-core, C, P, preS1, preS2, S y proteína X) (Figura 2). Los procesos transcripcionales del genoma de VHB están regulados por dos potenciadores (enhancer I: enhI y enhancer II: enhII), cuatro promotores (el promotor basal del core, el de preS2/S, el de preS1 y el de X), un elemento silenciador, un elemento de respuesta a glucocorticoides (Glucocorticoids Response Element GRE), y un elemento CCAAT (que es una caja de inicio de la transcripción) (3).

Los distintos ARNm difieren en su extremo 5' (en función de los promotores correspondientes), pero el extremo 3' es una señal poliadenilada (TATAAA) común. Tanto el ARN core como el ARN pre-core tienen una longitud mayor que el propio genoma (3,5 kb), con una redundancia en el extremo 3' donde presentan una repetición del fragmento

que va desde el lugar de inicio de la transcripción (5') hasta la señal de poliadenilación. En este fragmento, la secuencia correspondiente a la región pre-core presenta una estructura secundaria característica tallo-joroba- bucle, que constituye la llamada «señal de encapsulación» o señal ϵ que es esencial en la replicación del virus.

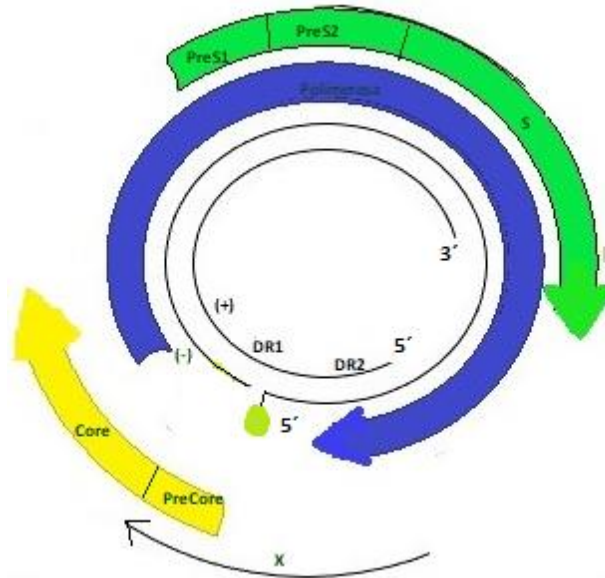


Figura 2 Representación esquemática del genoma del VHB y sus ORF

El gen C o precore-core del VHB (posiciones 1814 a 2458)

La transcripción del gen C 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) (3).

El gen C presenta 2 codones de iniciación (ATG), que codifican 2 proteínas. Cuando la traducción se produce a partir del primer codón (posición 1814), codifica una proteína de 16.000 daltons, el HBeAg y cuando se traduce a partir del segundo codón (posición 1901) codifica el HBcAg, de 21.000 daltons componente de la cápside viral. El HBeAg o conocido también como la proteína pre-core, o proteína HBe, es la forma soluble del HBcAg (3).

El gen S del VHB (posiciones 2854 a 833)

El gen S, contiene las regiones Pre-S1, Pre-S2 y S que codifican para las proteínas de la envoltura viral. La proteína grande se forma por la traducción de las regiones Pre-S1, Pre-S2 y S; la proteína mediana sólo se deriva de la información genética de Pre-S2 y del gen S y la proteína pequeña conocida también como el HBsAg se forma a partir de la región S (3).

El HBsAg es una proteína de envoltura de membrana con cuatro dominios transmembrana y una región principal hidrofílica que está expuesta en la superficie de la partícula viral (21). Los dominios más importantes del HBsAg son: el sitio de unión al receptor del hepatocito, aminoácidos 21-47 de la forma L, que además es esencial para el ensamble y salida de los viriones; el dominio ubicado entre los residuos 29-79 que forma el principal “loop” citoplasmático y mediante el cual interactúa con HBcAg; el dominio entre los aminoácidos 3-16 en la forma M, que se une al sitio de polimerización de la albumina; y la región hidrofílica principal (RHP) (*major hydrophilic region* [MHR]) localizada entre los residuos 101-169 de la forma S, dentro de la cual está el determinante “a” (aminoácidos 124-147) (3) (Figura 3).

El determinante “a” está definido por una conformación específica de dos “loops”, el primero conformado por los aminoácidos 124-137 y el segundo por los aminoácidos 139-147 estabilizados mediante puentes disulfuro establecidos entre residuos de cisteína altamente conservados. Además el determinante “a” es considerado como el más importante blanco para los anticuerpos (Acs) neutralizantes anti-HBs y como la región con mayor homología del HBsAg entre todos los genotipos. Esta región altamente inmunogénica se expone en la superficie de los viriones y de las formas subvirales, y se encuentra sometida a la presión de selección del sistema inmune del hospedador. Anticuerpos dirigidos contra este epítipo conformacional, conservado en todos los genotipos del VHB, confieren protección contra la infección (y/o reinfección) con cualquiera de los diez genotipos (A-J) (3,10).

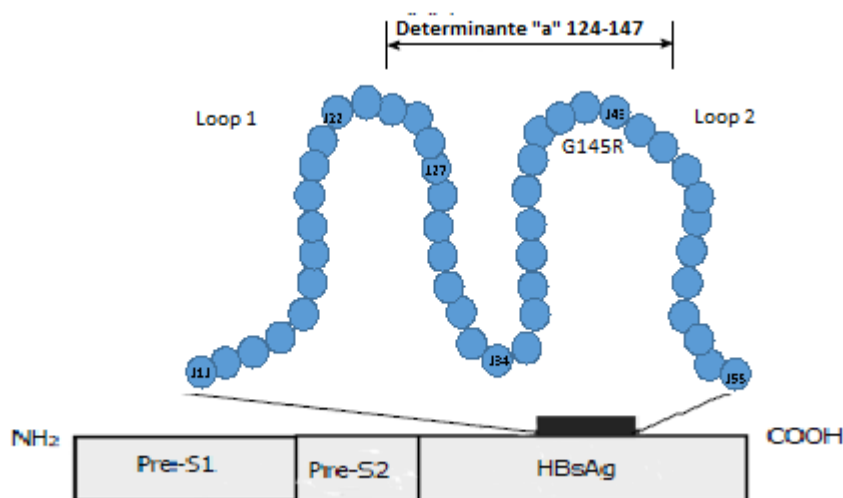


Figura 3 Representación esquemática del gen S del VHB.

El gen X del VHB (posiciones 1374 a 1838)

El gen X codifica un polipéptido de 145-154 aminoácidos (HBx) con actividad multi-reguladora, tanto del ciclo viral como de la célula huésped (transcripción, progresión del ciclo celular, reparación del ADN, proliferación celular y apoptosis). La localización de HBx es coherente con su doble función de especificidad. HBx se localiza predominantemente en el citoplasma y hasta cierto punto dentro del núcleo y las mitocondrias. Esta distribución celular dinámica y compartimentación le podría atribuir múltiples funciones en diferentes etapas de la infección viral y la progresión del CHC. En muestras de tejidos hepáticos de pacientes con CHC y con AgHBs negativo se ha observado una acumulación preferencial de transcritos X lo que sugiere el posible papel de la proteína X del VHB en la transformación neoplásica (3).

El gen P del VHB (posiciones 2307 a 1623)

El gen P cubre las tres cuartas partes del genoma y solapa la porción carboxi terminal del gen C, la totalidad del gen S y la porción amino-terminal del gen X. Codifica un polipéptido básico de unos 90.000 daltons que tiene asociadas las actividades de ADN polimerasa/transcriptasa inversa (dominio RT) y ARN-asa (dominio RH en el extremo carboxi terminal). También codifica, en su dominio amino-terminal, la denominada proteína terminal (PT) que contiene residuos que forman una superficie de unión para el pgRNA

durante la encapsidación y contiene el cebador para la iniciación de la síntesis de ADN de cadena negativa a la que permanece unida covalentemente (3) (Figura 4).



Figura 4 Representación esquemática del gen P del VHB.

2.1.4 REPLICACIÓN

El ciclo de replicación del VHB comienza con la unión del virion a la membrana del hepatocito a través de interacción entre la proteína pre-S1 y el receptor del hepatocito conocido como polipéptido cotransportador de taurocolato de sodio NTC (sodium taurocholate cotransporting polypeptide) (22) .

A continuación, la envoltura del virion se fusiona con la membrana celular y la nucleocápside (core) se libera dentro del citoplasma, dirigiéndose hacia el núcleo, allí se completa la síntesis del ADN viral, de tal forma que el genoma del VHB se convierte en un ADN circular covalentemente cerrado (ADNccc), sirviendo como base para la transcripción del ARN viral. Posteriormente, todo el ARN viral se transporta al citoplasma donde se traducen las diferentes proteínas del VHB. Las proteínas de la nucleocápside se ensamblan en el citoplasma, encerrando en su interior una hebra de ARN intermediario (pregenómico) y el complejo de la polimerasa. A continuación ocurre la transcripción reversa, donde a partir del RNA intermediario se sintetiza una nueva cadena de ADN viral, a la que después se añadirá otra hebra para formar un ADN bicatenario incompleto. Una vez completado el proceso, esta nueva partícula viral (core) puede volver a entrar en el núcleo para formar más ADNccc o unirse a la membrana citoplasmática donde adquiere las proteínas de la envoltura para ser liberado de la célula mediante exocitosis (3).

2.1.5 VARIABILIDAD GENÉTICA DEL VHB

Aunque el VHB se replica en células infectadas a través de un ARN intermediario debido a la actividad RT de su polimerasa viral. La síntesis de este ARN pregenómico por una ARN

polimerasa II celular está dirigida por el promotor del core y su encapsidación en la partícula del núcleo requiere la proteína P, la señal de encapsidación ϵ del ARN pregenómico y la proteína del core.

La transcripción inversa de este ARN pregenómico es llevada a cabo por la proteína P, que tiene que cambiar la plantilla tres veces para llevar a cabo la síntesis del ADN del virion final. La ausencia de actividad de corrección de la polimerasa de VHB conduce a una alta tasa de mutaciones, estimadas en 1,4 a $3,2 \times 10^{-5}$ sustituciones de nucleótidos por sitio por año (nt / sitio / año) (3). Como resultado, las poblaciones de VHB pueden evolucionar más rápidamente que la mayoría de los virus de ADN en respuesta a factores ambientales y la aparición de mutantes virales de VHB bajo la presión de tales factores es probable que sea un evento frecuente.

Eventos de recombinación parecen tener importancia en la diversidad genómica del VHB y han contribuido a una amplia diversidad de las cepas de VHB. Los genotipos, subgenotipos y subtipos de HBsAg representan poblaciones virales genéticamente estables que comparten una historia evolutiva común porque emergieron en poblaciones humanas específicas y emigraron con sus huéspedes a otras áreas del mundo, la cual es la razón de su distribución geográfica actual (23).

En términos de variabilidad genética, hay que hacer una distinción entre los genotipos del VHB y los mutantes. Los diferentes genotipos de VHB son formas (relativamente) estables del virus, que son el resultado de cambios aleatorios seleccionados a lo largo de años de presión poblacional. El término genotipo se aplica a las formas competentes de replicación en las que la secuencia genómica se ha estabilizado después de un período prolongado de tiempo. Los mutantes surgen en individuos por presión selectiva en respuesta a antivirales o vacunas (hepatitis B crónica) (24,25)

Los polimorfismos naturales de VHB o "variantes" son variaciones de origen natural observadas dentro de un individuo y entre poblaciones comparadas con cepas de tipo salvaje. Se ha recomendado que las variantes que surgen bajo una presión de selección específica (tratamiento con HBIG o con lamivudina), que están asociadas con un fenotipo específico, deberían denominarse "mutantes" (26). Estos mutantes son estables a lo largo

del tiempo, pueden retener durante varios años su capacidad para replicarse en altos títulos y se pueden transmitir horizontalmente a otros seres humanos. La generación de variantes y mutantes que evolucionan continuamente dentro de una población de VHB dentro de un hospedero contribuye a la variabilidad de una cepa (24).

2.1.5.1 Subtipos del VHB

Las primeras indicaciones de la heterogeneidad de la secuencia del VHB se basaron en la existencia de diferentes determinantes antigénicos o subtipos del HBsAg (27).

Cuatro serotipos han sido designados para el VHB denominados adw, ayw, adr y ayr, los cuales se dividen en 10 serotipos menores, ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw3, adw4q-, adr y adrq-; la primera letra corresponde a la región antigénica altamente conservada: el determinante “a”. La designación d/y es mutuamente excluyente y hace referencia al aminoácido lisina (Y) o arginina (R) en la posición 122 del HBsAg; las letras w/r también son mutuamente excluyentes y corresponden al aminoácido Y o R en la posición 160 del HBsAg. La designación w 1-4 obedece a la identidad del aminoácido en la posición 127; prolina (P) w1/2, treonina (T) w3 y leucina (L) w4 y el subtipo q- corresponde a los aminoácidos alanina (A) y glicina (G) en las posiciones 177 y 178 (28).

2.1.5.2 Genotipos del VHB

Debido a la alta variabilidad genética hasta la fecha se han identificado 10 genotipos del VHB (A-J) debido a una divergencia genética superior al 8% en todo el genoma del VHB. Cada genotipo se divide además en sub-genotipos definidos como aquellos linajes conformados por cepas con una divergencia en la secuencia de nucleótidos entre el 4 y 8%. Este enfoque ha establecido los diferentes subgenotipos: genotipo A (A1-A7), el genotipo B (B1-B9), genotipo C (C1-16), genotipo D (D1-D9), genotipo I (I1-I2) y el genotipo F (F1 - F4). Tanto los genotipos como los sub-genotipos están relacionados con el desenlace clínico, la distribución geográfica y el modo de transmisión. Existen varios estudios que documentan el efecto del genotipo sobre diversos resultados clínicos (29–32).

Además, las migraciones humanas globales afectan el patrón de distribución del genotipo, introduciendo genotipos diferentes de los encontrados en los habitantes nativos de un área

geográfica determinada. En Asia oriental (genotipos B y C) y en África subsahariana (genotipo A) se encontraron zonas hiperendémicas y con alta incidencia de carcinoma hepatocelular (CHC). Por otra parte, los genotipos A y D son frecuentes en países donde la transmisión horizontal es común, como el África Subsahariana, el Mediterráneo, Oriente Medio y la India, mientras que los genotipos B y C son frecuentes en países donde hay mayor frecuencia de transmisión vertical (30,33).

El genotipo A es más prevalente en algunas regiones de África, Europa y Norteamérica; los genotipos B y C son comunes en Asia Oriental; genotipo D prevalece en la cuenca del Mediterráneo y en el Medio Oriente; el genotipo E es nativo de África y predomina en toda su región occidental.

El genotipo F es el de mayor prevalencia en América del Sur (34), el subgenotipo F1 se clasifica a su vez en F1a (encontrado en Costa Rica y El Salvador) y F1b (encontrado en Alaska, Argentina y Chile); los subgenotipos F2 y F3 co-circulan en el norte de América del Sur: F2a se encuentra en Brasil y Venezuela, F2b se describe sólo en Venezuela, F3 es frecuente en Colombia, Venezuela y Panamá y F4 se informa de las áreas central y sur de América del Sur, Incluyendo Bolivia, Argentina y el sur de Brasil (29,35–37).

El genotipos G ha sido descrito en Francia, Alemania, Estados Unidos y México (38–40) y más recientemente en Colombia (41) y Brasil (42). El genotipo H es frecuente en México y también se ha encontrado en otros países de América Central y del Norte (41) y más recientemente en Argentina (43). El genotipo I ha sido recientemente reportado en Vietnam y Laos. El más reciente genotipo de VHB, es el genotipo J, el cual ha sido identificado en las Islas Ryukyu en Japón (44).

En Colombia se ha identificado el genotipo F, subgenotipo F3, como el más frecuente según los estudios realizados en donantes de sangre y en pacientes con hepatopatías terminales principalmente en la Región Andina y en los amerindios en el sureste del país (4,45–47); el subgenotipo F1b se ha encontrado en el Departamento de Amazonas. El genotipo A es muy frecuente en el oeste de Colombia, donde la mayoría de la población es de ascendencia africana (36,48,49). Otros genotipos/subgenotipos como A1, A2, C, D3, F1a y G también han sido descritos en menor proporción (4,37,46,49). Adicionalmente se ha

identificado el genotipo E en gestantes afrodescendientes (49) y una cepa recombinante F3 / A1 (50). (4,36,45–49)

2.1.5.2.1 Genotipos y progresión de la enfermedad

Existen varios estudios que documentan el efecto del genotipo sobre diversos resultados clínicos (Tabla 1). Existe cada vez más evidencia respecto a la influencia de los distintos genotipos de VHB sobre la enfermedad hepática, tanto en infecciones agudas como en crónicas. Sin embargo, los análisis comparativos reportados han estado restringidos a estudios con los genotipos predominantes en algunas regiones, como son los genotipos B v/s C en algunos países asiáticos y los genotipos A v/s D en Europa e India. En estudios de cohortes asiáticos, el genotipo C ha sido asociado a una mayor frecuencia de desarrollo de cirrosis, y hepatocarcinoma, comparado con el genotipo B. Adicionalmente, 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 ejemplo, 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. De igual forma se ha asociado el genotipo F con una mayor frecuencia de desarrollo de hepatocarcinoma, cuando se comparó con los genotipos A, B, C, y D (51–53).

2.1.5.2.2 Genotipos y respuesta a antivirales

Diferentes estudios han establecido que el rol de los genotipos del VHB en respuesta al tratamiento con interferón (IFN) evidenciando una mayor respuesta en los genotipos A y B con respecto a los genotipos C y D; y la respuesta es limitada al IFN se observa en el genotipo D (48,54,55), además el IFN /Peg-IFN (interferón pegilado) fue más efectivo en los genotipos A o B que en los genotipos C, D e I (56).

Tabla 1 Comparación de características clínicas y virológicas de los genotipos del VHB.

GENOTIPO	B	C	A	D	E	F	G-J
TENDENCIA A CRONICIDAD	MODERADA	ALTA	ALTA	MODERADA	SD	SD	SD
INFLAMACIÓN HISTOLÓGICA	MODERADA	ALTA	MODERADA	ALTA	SD	POSIBLE ASOCIACIÓN	SD
FIBROSIS HISTOLÓGICA	BAJA	ALTA	BAJA	ALTA	SD	POSIBLE ASOCIACIÓN	SD
ASOCIACION CON ENFERMEDAD HEPÁTICA AVANZADA	MODERADA	ALTA	LIGERA	MODERADA	SD	POSIBLE ASOCIACIÓN	SD
ASOCIACIÓN CON CARCINOMA HEPATOCELULAR	LIGERA	MODERADA	LIGERA (A1)	MODERADA	SD	MODERADA	SD

Nota. Tabla modificada a partir de Seminars in Liver Disease 2013 (53).

Por otro lado, durante el tratamiento con IFN la disminución más rápida en el nivel cuantitativo del HBsAg fue observada en los genotipos A y B, y las mejores respuestas serológicas se obtuvieron después de la interrupción del tratamiento en estos genotipos, además los pacientes con genotipo C que recibieron el tratamiento con IFN alcanzaron la negatividad del ADN del VHB más temprano; igualmente se ha observado que para el tratamiento de infecciones por el genotipo E se requiere un periodo de tiempo más largo (54).

Han sido presentadas respuestas similares al tratamiento con lamivudina, adefovir, entecavir y telbivudina entre los diferentes genotipos del VHB en varios estudios clínicos (31,57), es así como un meta-análisis demostró que no había diferencias en la respuesta entre los genotipos de VHB a los análogos de nucleósidos y nucleótidos (58).

2.1.5.3 Mutaciones

Debido a la falta de actividad exo-nucleasa 3'-5' por parte de la polimerasa del VHB, la replicación de VHB se caracteriza por la generación de poblaciones de virus conocidas como cuasiespecies, generadas por acumulación de mutaciones al azar en diferentes regiones del genoma viral que se originan de forma natural durante el curso de la infección

por el VHB y si conservan la capacidad de replicación del virus son seleccionadas positivamente y se establecen en la naturaleza (59–61).

2.1.5.3.1 Mutaciones en el gen preCore y Core

Mutaciones preCore

La mutación G1896A da como resultado un codón de parada que impide la producción de HBeAg y se encuentra con mayor frecuencia en pacientes anti-HBe positivos infectados con genotipo D y E y rara vez se encuentra en el genotipo A, genotipo H y en menor proporción en Genotipo C y cepas del genotipo F (62–65). Numerosas otras mutaciones se han descrito en la región precore que incluye una mutación puntual en G1899A (comúnmente visto en asociación con G1896A) (66), la cual es causa de hepatitis crónica HBeAg negativo y parece estar asociada con hepatitis fulminante (67). Además, mutaciones precore G1896A, G1899A, así como en la región Pre-S se han asociado con mayor riesgo de CHC (63,68).

Mutaciones del promotor basal del core (BCP)

Las mutaciones en la región promotora del core pueden tener repercusiones en la expresión y / o replicación viral, con un impacto concurrente en la patogénesis viral. Una mutación doble en el BCP que conduce a la sustitución de A por T, y G por A, en las posiciones 1762 y 1764 respectivamente, se ha descrito en varios estados de la enfermedad y se ha demostrado que se asocia con disminución de los niveles de mRNA preCore y, por tanto, con la disminución de la producción de HBeAg; además se piensa que esto podría conferir alguna ventaja compensatoria al virus y se ha descrito que aumentan los niveles de replicación viral por encima de los del virus de tipo salvaje, incluso en cepas con mutaciones resistentes a Lamivudina (69).

Estudios sobre estas mutaciones en los distintos subgenotipos F de VHB sugieren que las variantes F1 y F4 son más susceptibles a la ocurrencia de la mutación G1896A en la región pre-core/core, y de la doble mutación A1762T/G1764A en la región promotora basal del core (70,71). Estos cambios puntuales en la secuencia del virus han sido observados en

aislados de VHB provenientes de casos con hepatitis crónica, carcinoma hepatocelular y hepatitis fulminante (72).

Mutaciones en core

El gen del core codifica para aminoácidos blancos de linfocitos T citotóxicos (73). Las mutaciones en los epítopes reconocidos por linfocitos T citotóxicos permiten al virus evadir la respuesta inmune.

En los subgenotipos F de VHB se sugiere que las variantes F1 y F4 son más susceptibles a la ocurrencia de la mutación G1896A en la región pre-core/core, y de la doble mutación A1762T/G1764A en la región promotora basal del core (30,31); estos cambios puntuales en la secuencia del virus han sido observados en aislados de VHB provenientes de casos con hepatitis crónica, carcinoma hepatocelular y hepatitis fulminante (32).

2.1.5.3.2. Mutaciones en el gen S

Dentro del ORF S, la región S es una de las más conservadas y las mutaciones en esta región tienen mucha relevancia en la antigenicidad de la proteína, ya que en ésta se encuentran los epítopes reconocidos por linfocitos B y T; por otro lado las regiones PreS1 y PreS2 (PreS) son las más variables del genoma del VHB.

Mutantes de la región pre-S

La proteína codificada por la región PreS es considerada altamente inmunogénica e involucrada en la protección contra el VHB; las mutaciones puntuales en estas regiones no son consideradas de gran relevancia clínica ni epidemiológica en la infección por VHB, como sí lo son las deleciones de fragmentos de PreS y en codón de inicio Pre-S2 (74–80).

Las deleciones de secuencias que codifican los dominios de unión al hepatocito, de unión a la nucleocápside, de unión al sitio de polimerización de la albumina y deleciones que

incluyen la región del promotor de S, están muy relacionadas con la acumulación del HBsAg en el retículo endoplásmico, la generación de estrés oxidativo, cirrosis y progresión a carcinoma hepatocelular. Es así como las deleciones dentro de la región pre-S pueden conducir a deterioro de la eliminación viral sin afectar la unión del VHB a los hepatocitos y su posterior penetración, y por lo tanto podrían contribuir a la cronicidad de la infección (81,82).

Se ha descrito que los mutantes de deleción pre-S ocurren con mayor frecuencia en el genotipo C que en los aislados del genotipo B (83) y más en aislados adr (correspondiente al genotipo C) que en aislados adw (correspondiente al genotipo B) (84).

Mutantes de la región S

Mutaciones no sinónimas en la secuencia que codifica para el determinante “a” del HBsAg se conocen como variantes de escape que por primera vez fue reportada en un aislado del VHB proveniente de un niño vacunado con un cambio puntual guanina por alanina (G a A) en el nucleótido 587, que se traduce en el cambio de aminoácido G145R del HBsAg en su forma pequeña que altera la estructura y evita que el HBsAg sea reconocido por los anticuerpos neutralizantes (85–87). Sustituciones puntuales de aminoácidos en esta y otras posiciones del determinante “a” o en secuencias cercanas impiden el reconocimiento del HBsAg y pueden llevar a la propagación del VHB en personas vacunadas y convertirse en un grave problema de salud pública, además de no poder ser reconocidas por pruebas convencionales de ELISA para detectar HBsAg (86,87).

Además de las dos mutaciones de escape dominantes en el determinante “a” G145R y P127T, muchas otras mutaciones se han reportado en esa región y cerca de ella; las más frecuentes son P120Q, C121S, C124Y, C137W/Y C147Y/R, T115N y Y134H (21,88).

En Colombia, recientemente se realizó un estudio con 1.275 niños vacunados y sus 571 madres pertenecientes a comunidades indígenas del Departamento del Amazonas donde se identificaron dos variantes de escape: mutación W156* en aislado de un niño con infección oculta por VHB y la mutación G145R en una muestra de una madre. Este es el primer reporte de la circulación de variantes de escape del VHB en Latinoamérica (89).

Debido a la superposición de los ORF P y S en el genoma del VHB, las mutaciones asociadas con resistencia a antivirales frecuentemente también están asociadas con cambios en el HBsAg, en el dominio de unión de anticuerpos neutralizantes, específicamente en los aminoácidos cercanos al determinante “a” del HBsAg y las principales mutaciones reportadas en el ORF P que afectan el HBsAg son la rtM204V/I, la cual confiere resistencia a lamivudina y también reduce la eficiencia de replicación del VHB *in vitro*, y la rtL180M que restaura el “fitness” viral (habilidad de una población viral para replicarse en un ambiente determinado).

Otra mutación a destacar es la mutación compensatoria rtV173L que es seleccionada en pacientes resistentes a lamivudina y potencia la replicación viral (90).

Los potenciales mutantes de escape asociadas con antivirales (PMEADAVs), corresponden a las mutaciones que ocurren en el ORF P y que igualmente resultan en cambios en el ORF S. Estas mutaciones se producen debido al tratamiento antiviral con análogos de nucleósidos como: lamivudina, telbivudina y entecavir; y de nucleótidos como: adefovir y tenofovir y son características en pacientes con infección por hepatitis B crónica y se presentan tanto en inmunizados como no inmunizados. Las PMEADAVs más frecuentes son: rtM204V/sI195M, rtM204I/sW196S, rtM204I/sW196L, rtV173L/sE164D, rtA181T/sW172*, codón de parada, rtA181T/sW172L y rtA181V/sL173F. Se ha reportado que la triple mutación rtV173L/sE164D, rtL180M, rtM204V/sI195M reduce la unión del HBsAg a los anti-HBs en un nivel similar a la mutación dominante G145R (91,92).

2.1.5.3.3 Mutaciones en el gen P

Con el creciente uso de análogos de nucleósidos y nucleótidos como agentes antivirales contra el VHB, los informes de mutaciones en el gen de la polimerasa viral que confieren resistencia antiviral también han aumentado en los últimos años (93).

La mutación más estudiada en esta categoría es la mutación primaria de resistencia a la lamivudina RtM204V / I en el dominio C, (cambiando el motivo conservado YMDD a YVDD o YIDD), y suele acompañarse por otra mutación compensatoria o secundaria corriente

arriba del motivo YMDD en rtL180M y / o rtV173L en el dominio B de la polimerasa que mejora la eficacia replicativa del mutante resistente (94).

Por otro lado, la resistencia a Adefovir se asocia con mutaciones rtN236T en el dominio D y rtA181T / V en el dominio B (95,96). Mutaciones de resistencia a Entecavir rtT184S / A / I / G / C / M, RtS202I / C / G y rtM250I / V se han asignado a dominios B, C y D, respectivamente (93,97).

2.1.5.3.4 Mutaciones en el gen X

Sobresalen las mutaciones que afectan los codones carboxi-terminal 130 y 131 de la proteína X (K130M y V131I) lo que lleva a cambios de aminoácidos que incrementan la actividad fibrogénica y promueve la hepatocarcinogénesis (98).

2.1.6 MÉTODOS DE GENOTIPIFICACIÓN Y BÚSQUEDA DE MUTACIONES

Recientemente, la genotipificación se ha añadido a los algoritmos de manejo clínico y aunque comenzó como herramienta principalmente para estudiar el patrón evolutivo del VHB, ahora está disponible gracias a las nuevas técnicas de biología molecular que han evolucionado a versiones más simples (99), las pruebas de genotipificación incluyen la detección de mutaciones asociadas con la resistencia a fármacos, asignación de genotipo del VHB, detección de mutaciones precore y core y del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) (100). El uso clínico más importante de la determinación del genotipo del VHB radica en la predicción de la severidad de la enfermedad, desarrollo de CHC (junto con otras variables) y la predicción de la respuesta a IFN (101,102).

Al menos 10 métodos diferentes de genotipificación del VHB y detección de mutaciones han sido desarrollados con variable sensibilidad, especificidad, tiempo de respuesta y costo (103–110):

- PCR y secuenciación del genoma completo (o genes parciales P y/o S) seguido por el análisis filogenético.

La estrategia de secuenciación se basa en el método de Sanger en el cual se sintetiza, de forma secuencial, una hebra de ADN complementaria a una hebra de

cadena simple (que se utiliza como molde), en presencia de ADN polimerasa, los cuatro 2'-deoxinucleótidos que componen la secuencia del ADN (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), cuatro dideoxinucleótidos (ddATP, ddGTP, ddCTP y ddTTP) marcados con fluoróforos. Finalmente se realiza una electroforesis capilar en un gel de poliacrilamida (111). El análisis filogenético es un método para evaluar la relación evolutiva de cada una de las secuencias y las secuencias de control. La fiabilidad del árbol filogenético y el análisis estadístico se puede realizar mediante el examen de los datos con 1000 repeticiones (bootstrap) que requieren la interpretación de algoritmos computacionales necesarios para el análisis filogenético también se puede realizar individualmente para cada gen. La fiabilidad de la utilización de la secuencia de genes individuales está limitada a la secuencia del gen, dependerá tanto del tamaño de la secuencia como del grado de homología (103,110).

- La genotipificación por INNO-LiPA está basada en el principio de hibridación inversa donde el material de ADN biotinilado amplificado se desnaturaliza químicamente y las hebras separadas se hibridan con sondas de oligonucleótidos específicos inmovilizadas en bandas paralelas sobre tiras basadas en membranas seguido de una fase de lavado astringente a fin de eliminar cualquier material amplificado incorrectamente emparejado; tras el lavado, se añade estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina, que queda ligada a cualquier híbrido biotinilado que se haya formado con anterioridad; la incubación con una solución de sustrato que contiene un cromógeno produce un precipitado de color púrpura/marrón, esta reacción se interrumpe mediante una fase de lavado, tras la que se registra el patrón de reactividad de las sondas (112).
- El análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción RFLP (del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*) basado en la amplificación del gen S seguido de la digestión utilizando las enzimas de restricción: HphI, NCII, Alwi, Earl y NlaIV que distinguen los diferentes genotipos del VHB y se escogen de acuerdo con el análisis de las secuencias de los diferentes genotipos descritas en el GenBank. Los polimorfismos de un sólo nucleótido se traducen en un cambio en el sitio de la restricción que afectará la digestión y la veracidad de la determinación del genotipo (113);
- La multiplex PCR que es un método de PCR anidada empleando secuencias de nucleótidos entre el gen pre-S1 y S (114);

- Ensayos con paneles de anticuerpos monoclonales para las regiones preS2 y S específicos para cada genotipo (103,110). Aunque es un método bajo costo y fácil de realizar tiene la desventaja de analizar un número limitado de nucleótidos/aminoácidos haciéndolo poco confiable en comparación con el análisis filogenético de la secuencia.
- Los microarreglos o chips de oligonucleótidos consisten en 15 sondas dirigidas a la región pre-S de los diferentes genotipos del VHB; inicialmente las muestras se amplifican y marcan con Cy5-dCTP (cianina 5-2' deoxy-citidina-5'-trifosfato) en una reacción de PCR usando cebadores que cubren la región flanqueante del gen pre-S del VHB seguido por un proceso de purificación después del cual los productos marcados se hibridan al microarreglo (107).
- El método de transferencia reversa a través de flujo FT-RDB (flow through reverse dot blot) basado en una región conservada del gen S del VHB, en la que primero se realiza una PCR usando un cebador inverso marcado con biotina; los amplicones de PCR se desnaturalizan y enfrían rápidamente antes de la hibridación para luego ser transferidos a una membrana de nylon a la que se inmovilizaron las sondas específicas del genotipo. Después de la hibridación, la detección se realiza mediante la adición de estreptavidina - peroxidasa seguida de un cromógeno tetra - metilbencidina (TMB) (115).
- El método de análisis de polimorfismos de masa de fragmentos de restricción (RFMP: *Restriction Fragment Mass Polymorphism*) está basado en variaciones genotípicas en el gen S, y al igual que el RFLP, este método depende de la digestión con enzimas de restricción de productos de PCR para producir fragmentos de oligonucleótidos genotipo específicos. La masa de los fragmentos producidos se determina a continuación utilizando *espectrometría de masas* de desorción / ionización láser asistida por matriz acoplado a un detector de iones (MALDI-TOF: *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-Of-Flight*) (116).
- Ensayo PCR Invader® amplificando la region core/S y utilizando oligonucleótidos Invader® y sondas genotipo específicas (117).
- La PCR en tiempo real que identifica tanto el genotipo del VHB como la carga viral utilizando SYBR green o sondas fluorescentes que permite la detección y cuantificación del ADN del VHB, mientras que el análisis de curva de fusión permite la determinación de genotipos. El valor de la temperatura de fusión (T_m : *melting*

temperature) difiere entre diferentes genotipos dependiendo de la complementariedad entre la sonda y el blanco y / o el contenido de GC (guanina-citosina) de la secuencia de hibridación (118).

Numerosas herramientas bioinformáticas están disponibles para análisis generales de genomas virales como el del VHB, tales como alineación de múltiples secuencias de nucleótidos / aminoácidos, identificación de motivos, recombinación, anotación de genomas y relaciones filogenéticas. La mayoría de estas herramientas están disponibles en el sitio web del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) o del Laboratorio Europeo de Biología Molecular (119).

Además, se han establecido bases de datos públicas dedicadas que funcionan como repositorios de datos para la historia del tratamiento, secuencias moleculares virales y datos clínicos (120). Para la interpretación genética de los datos de las secuencias del VHB, existen herramientas bioinformáticas en las cuales se realiza el análisis descubriendo las similitudes y las diferencias entre múltiples secuencias biológicas, comparando las secuencias de nuevos estudios con secuencias de referencia (120–123).

Las principales bases de datos son: HIV-grade VHB drug resistance interpretation (DRI) (124), Geno2pheno [VHB] (G2P) (125), Stanford VHBseq (STAN) (126) y HepSEQ International Repository for Hepatitis B Virus Strain Data (127). Las tres primeras bases de datos han sido desarrolladas para predecir el genotipo del virus de un paciente y para conocer mutaciones en gen P asociadas a resistencia a fármacos. Además, G2P y DRI predicen mutaciones en S que han sido asociadas con "escape" o con disminución de unión al anticuerpo (120,128).

2.1.7 PATOGÉNESIS E INMUNIDAD

La patogénesis incluye desde hepatitis aguda hasta la hepatitis crónica, con cirrosis y carcinoma hepatocelular (CHC). El desarrollo y severidad de la infección por VHB depende de factores tanto virales como del hospedero.

En el 95% de los adultos inmunocompetentes, el resultado de una masiva infección es una fuerte reacción inmune, con la muerte de grandes cantidades de hepatocitos durante la fase

de eliminación de la infección, lo que les llevará a resolver la infección pocas semanas después de iniciar la eliminación. Por el contrario, alrededor del 5% de adultos y la mayoría de los niños menores de un año no pueden resolver la infección ocurriendo una hepatitis B crónica, mediada por una respuesta inmune de células T a los antígenos virales. Las infecciones crónicas se caracterizan por la persistencia de niveles detectables de virus y de antígeno de superficie, son de larga duración y en estos pacientes se ha reportado un cierto grado de disfunción en las células T (3,129).

La disminución de la carga viral requiere de la respuesta inmune innata mediada por células Natural Killers (NK) y células Natural Killers T (NKT), una respuesta citotóxica de linfocitos CD8+ que reconocen hepatocitos infectados y una respuesta no citolítica, en la cual los linfocitos CD8+ y otras células no antígeno-específicas reclutadas a los sitios de la inflamación, producen citoquinas TH1 tales como interferón gamma ($IFN\gamma$), factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$) e interleucina 12 (IL-12) que exhiben un efecto antiviral directo suprimiendo la replicación del virus en el hígado infectado; la producción de anticuerpos neutralizantes para prevenir la infección; lisis celular, apoptosis y proliferación compensatoria para generar células no infectadas que repoblarán el hígado (3,130,131).

Durante la infección aguda autolimitada, la patología es moderada y la replicación viral es efectivamente controlada por la respuesta inmune policlonal contra diferentes epítopes de todas las proteínas virales que llevan a la resolución de la hepatitis no obstante, algunas veces la respuesta inflamatoria se exagera llevando a hepatitis fulminante.

En el caso de la hepatitis crónica, el daño hepático es continuo debido a una respuesta disminuida de los linfocitos TCD4+ y probablemente debida a una disminución en la función de las células dendríticas (CDs) infectadas, las cuales presentan una disminución en la producción de $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ e IL-12. Por otro lado, la disminución de respuesta es más marcada en linfocitos CD8+ específicos contra epítopes del Core, donde no sólo esta línea celular es indetectable, sino que también disminuyen su capacidad para producir $IFN\gamma$ (132).

Existe una asociación entre la infección crónica por VHB y el desarrollo de carcinoma hepatocelular (CHC) debido a la acción oncogénica del gen X que es un activador transcripcional muy importante en la replicación del virus y la activación de vías de

señalización puede causar la activación de oncogenes capaces de inducir proliferación de hepatocitos lo que puede conducir a CHC (133,134).

2.1.8 PRESENTACIÓN CLÍNICA

El VHB puede causar una infección aguda o crónica y su espectro clínico es variable desde una hepatitis aguda subclínica, hepatitis aguda sintomática, hepatitis aguda fulminante (fase aguda de una hepatitis o fase crónica de un portador inactivo del HBsAg), hepatitis crónica, cirrosis y CHC.

Tras la adquisición del VHB el diagnóstico de la hepatitis aguda se basa en la elevación de las transaminasas, en la positividad del HBsAg y del anti-HBc IgM. En neonatos y niños la infección aguda suele ser subclínica, mientras que en adultos se presenta como hepatitis icterica en 30-50% de los casos y puede ser fulminante en 0.1%-0.5% de los casos (135).

La persistencia del HBsAg, HBeAg y del ADN –VHB más allá de seis meses indica la progresión de la enfermedad hacia una hepatitis crónica. La edad en el momento de la infección es el factor más importante de cronicidad de forma que esta ocurre en más del 90% de los casos de infección perinatal, en el 30% en la infancia y en el 1-5% de los casos adquiridos en edad adulta (135).

En la hepatitis crónica existen cuatro fases en su historia natural: fase de inmunotolerancia con alta replicación viral sin respuesta inmune y sin daño hepático con altos niveles de ADN viral y transaminasas normales ; fase de inmunoeeliminación con descenso del ADN viral y niveles elevados de transaminasas, durante la cual el sistema inmune reconoce el virus e intenta eliminarlo de los hepatocitos infectados, en esta etapa algunos pacientes logran controlar la replicación con la desaparición del HBeAg y la aparición del anti HBe; fase no replicativa o de portador inactivo caracterizada por niveles bajos de ADN viral, transaminasas normales y persistencia del HBsAg. Por último la fase de reactivación en la cual una proporción de pacientes en fase de portador inactivo presentan niveles elevados tanto de ADN viral como de transaminasas(135).

Desde finales de los años 70 se describió un tipo de infección adicional correspondiente a individuos negativos para el marcador serológico HBsAg y presencia del genoma viral (5); esta particular forma de infección se conoce como infección oculta por VHB (OBI siglas del inglés: occult HBV infection).

Los criterios para definir la OBI son: No detección del HBsAg, presencia de anti-HBc, carga viral menor a 200 UI/mL, presencia de ADN viral e intermediarios replicativos en tejido hepático y la presencia en algunos casos de anti-HBs. En el 20% de los casos de OBI no hay detección de los marcadores anti-HBc y/o anti-HBs; estos casos se conocen como OBI seronegativos (136).

2.1.9 DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR VHB

En la actualidad el diagnóstico se realiza mediante el análisis de marcadores serológicos. Se puede determinar el curso de la infección de acuerdo a la fase aguda, crónica, resuelta o si ha funcionado satisfactoriamente la vacuna o tratamiento. Durante la fase de incubación de la infección, solamente se puede detectar el virus. Hacia el final del período de incubación, pueden detectarse los antígenos virales HBsAg y HBeAg y el ADN viral (ADN-VHB).

Cuando el paciente está en fase de enfermedad, se detectan marcadores virales aún (ADN-VHB, HBsAg y HBeAg) y marcadores de respuesta inmunológica, el primero es el anticuerpo contra la proteína de la cápside o core (anti-HBc) tipo IgM. Con el paso de las semanas, aparece anti-HBe y, posteriormente, el anticuerpo anti-envoltura (anti-HBs). Paralelamente, va negativizándose primero el ADN-VHB, luego el HBeAg y posteriormente el HBsAg. Se considera curado cuando el HBsAg es negativo y hay anti-HBs positivo (137). Después de la resolución de la infección por VHB, quedará permanentemente el anticuerpo anti-HBc tipo IgG y el anti-HBs, mientras que en una infección crónica persistirá anticuerpo anti-HBc tipo IgG o IgM, el anticuerpo anti-HBe o antígeno HBeAg (según esté o no en fase de replicación), el HBsAg y el ADN-VHB si existe replicación (137).

2.2 ANTECEDENTES

Abundante evidencia ha demostrado que la diversidad genética del VHB juega un papel crítico en la modulación de la patogénesis en la infección por el VHB; se ha encontrado que sub-genotipos y mutaciones en ciertas regiones del genoma del VHB Influyen en las tasas de seroconversión HBeAg y HBcAg, niveles de viremia, evasión inmune, patogénesis de la enfermedad hepática, respuesta y resistencia a la terapia antiviral y vacunación contra el virus (3,138).

En 1988 Zanetti et al., encontraron mutantes del gen S de VHB en sueros de niños italianos vacunados además de HBsAg y anticuerpos anti-HBs, quienes adquirieron infección de la madre. El análisis del gen S reveló la sustitución G145A, dentro del determinante “a” del gen S, lo que causó cambios conformacionales que permitieron que el VHB escapara de la vacuna (139). Esta mutación es la principal mutación inmunitaria inducida por la vacuna y en los últimos años se ha informado un aumento de la detección de G145R principalmente en países con alta tasa de endemicidad y programa de inmunización universal (5).

En 2001 Myung, et al., reportaron la mutación P120Q localizada cerca del determinante “a”, en un paciente recién nacido de madre infectada en Corea, al cual se le administró de forma simultánea la vacuna y el tratamiento profiláctico de inmunoglobulina (140). Otras mutaciones puntuales en el gen S que pueden conducir al escape inmune, a infección oculta por el VHB y a reactividad disminuida son K122I, T123N (141–145). Existen además deleciones en la región PreS del gen S que puede conducir no solo al escape inmune sino a infección oculta por el VHB (146–149).

Mutaciones en la transcriptasa reversa (TR) pueden conducir a la poca o nula respuesta frente a fármacos antivirales análogos de nucleótidos y/o nucleósidos después de su uso por largo tiempo y son conocidas como mutaciones de resistencia.

En 1996 en dos trabajos paralelos de Ling, et al., y Tipples, et al reportaron que la resistencia del VHB a lamivudina (LMV) está asociada con mutaciones en el motivo YMDD altamente conservado (Y: tirosina, M: metionina, D: ácido aspártico, D: ácido Aspártico) del dominio catalítico (dominio C) de la polimerasa (150,151). Así, sustituciones de metionina en el codón 204 a isoleucina (variante rtM204I, YIDD) o valina (rtM204V, variante YVDD)

son las mutaciones predominantes que causan resistencia a la lamivudina. La mutación L180M en el dominio B del gen de la polimerasa confiere resistencia a lamivudina LMV, entecavir ETV, telbivudina LdT y se presenta con frecuencia asociada con la mutación rtM204V (152–155).

Otras mutaciones reportadas en la transcriptasa reversa (TR) que pueden conducir a la resistencia a fármacos son V173L, L180I/V (lamivudina LMV), A181V/T (LMV, telbivudina LdT, adefovir ADV, tenofovir TNF) N236T (ADV, TFN), T184S (entecavir ETV), S202I (ETV), M204I/V (LMV, LdT, ETV), F249A, M250I/V (143,156,157).

Típicamente los VHB resistentes a fármacos tienen un antígeno de superficie alterado debido a la superposición entre el gen de la polimerasa y el de la envoltura (gen S), por ejemplo mutaciones A181T / V en la región RT pueden causar mutaciones W172 * (mutación del codón de parada), W172L y L173F en la región S. Las mutaciones M204V / I en la región RT pueden resultar en mutaciones de I195M, W196 * (mutación del codón de parada), W196S y W196L en la región S (11,91).

Las mutaciones A1762T y G1764A en el promotor basal del core (BCP) o la mutación G1896A en preC pueden aumentar la replicación viral, suprimir o disminuir la expresión de HBeAg (143). Algunas mutaciones en el epítipo reconocido por los linfocitos T citotóxicos (LTC) del gen core del VHB pueden causar el escape inmune mediado por LTC (143).

Algunas mutaciones puntuales o mutantes truncados en el gen X del VHB tales como C1653T, T1753V pueden causar tumorigénesis u otra enfermedad hepática terminal (143).

Los avances en las pruebas moleculares han contribuido significativamente a mejorar el diagnóstico y el tratamiento de la Infección por el VHB (158). Las guías de diagnóstico y tratamiento actuales incluyendo la Guía de práctica clínica sobre diagnóstico y tratamiento de Hepatitis B, enfatizan el papel crítico de las pruebas de carga viral en el diagnóstico, caracterización de la infección crónica y monitoreo terapéutico (159,160).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar genotipos del virus de la hepatitis B (VHB) y mutaciones en los genes S y P en muestras de la seroteca del laboratorio de virología del Instituto Nacional de Salud recolectadas de los treinta y dos departamentos de Colombia durante el período 2002 a 2014.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar los genotipos del virus de hepatitis B circulantes en Colombia durante el periodo 2002 a 2014.
- Identificar las mutaciones en las secuencias obtenidas de los genes P y S del VHB y sus posibles implicaciones clínicas.
- Destacar la importancia de los estudios de epidemiología molecular del VHB en Colombia.

4 METODOLOGIA

4.1 MUESTRAS CLÍNICAS

Se realizó un estudio descriptivo longitudinal retrospectivo a partir de 495 muestras de sueros provenientes de 32 departamentos del país y el distrito capital, conservadas de -20 °C a -30 °C en la seroteca del Grupo de Virología del Instituto Nacional de Salud y colectadas durante el periodo 2002-2014. Se seleccionaron muestras con resultado positivo por ELISA para el antígeno de superficie de VHB (HBsAg), donde solamente 242 muestras habían sido confirmadas por prueba de neutralización.

4.2 EXTRACCIÓN DE ADN VIRAL

Se realizó la extracción de ADN a partir de 200 µl de muestra de suero utilizando el kit PureLink® Viral RNA/ADN Mini Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA EEUU) ante la eventual necesidad de procesar las muestras posteriormente para la detección de virus con genoma RNA (HAV, HCV, HEV). Brevemente, el procedimiento consistió en mezclar 200 µl de suero con 25 µl de Proteinasa K y 200 µl de buffer de lisis (conteniendo 5.6 µg de Carrier RNA) seguido de incubación a 56°C durante 15 minutos para después añadir 250 µl de etanol absoluto e incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente se transfirió el lisado (aprox. 675 µL) a una columna (Viral Spin Column), se centrifugó a 9300 rpm por 1 min, se lavó dos veces con 500 uL de buffer con centrifugaciones de 9300 rpm. Finalmente se añadieron directamente a la columna 30 uL de Agua MQ libre de nucleasas, seguido por 1 minuto de incubación a temperatura ambiente y finalmente centrifugación a 13000 rpm por 1 min (161).

4.3 AMPLIFICACIÓN DEL GEN P MEDIANTE PCR CONVENCIONAL

Para la amplificación parcial del gen P del VHB se utilizaron los primers Polymerase_Sense TCGTGGTGGACTTCTCTCAATT y Polymerase_Antisense CGTTGACAGACTTTCCAATCAAT previamente descritos por Sayan et al., 2010 (162) los cuales se extienden desde nt 254-973. La mezcla de reacción para la PCR incluyó 12,63 µL de agua libre de RNasas, 2,7 µL de Buffer 10X, 1,2 µL de MgCl₂ 50 mM, 1,2 µL de la mezcla de dNTPs (10 mM) I, 1 µL de cada uno de los primers 10 pmol/µL, 0,27 µL de

Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA EEUU), 5 µL del extracto de ADN viral para un volumen final de 25 µL. El perfil térmico consistió en una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificación (95°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos, 72°C por 45 segundos) y una extensión final a 72°C por 7 minutos. El producto fue un fragmento de aproximado de 742 pb del gen de la polimerasa del VHB.

Para la amplificación del gen S se utilizaron los oligonucleótidos externos HBPr1_Sense 5'-GGGTCACCATATTCTTGGG-3' y HBPr374_Antisense 5'-GTTCCGCAGTATGGATCGGCAGAGG-3', previamente descritos por Stuyver et al., 2000 (39) los cuales se extienden desde la posición 2816-3182...1-1281 del genoma de referencia con número de acceso GenBank: NC_003977.2. La mezcla de reacción para la PCR incluyó 10 pmoles de cada oligonucleótido, 1.35 U de Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA EEUU), 60 mM de Tris-SO₄ (pH 8.9), 18 mM de (NH₄)₂SO₄, 2.4 mM MgSO₄, 480 nM de cada dNTP, 5 µL del extracto de ADN viral y agua libre de nucleasas, para un volumen final de 25 µL. El perfil térmico consistió en una desnaturalización inicial a 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificación (94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, 72°C por 2 minutos) y una extensión final a 72°C por 5 minutos. El producto esperado correspondía a un fragmento de aproximadamente 1680 pb.

Los amplicones esperados de las PCR fueron teñidos con SYBR® Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA EEUU), separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1X y visualizados mediante el fotodocumentador GelDoc™ XR (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

4.4 SECUENCIACIÓN, EDICIÓN DE SECUENCIAS Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Los productos obtenidos de la PCR del gen S y gen P con el tamaño de fragmento esperado fueron purificados mediante el estuche QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN Inc, Valencia, CA, EEUU).

Para la secuenciación del gen S, se prepararon mezclas de reacción que incluyeron 10 ng de cada producto de PCR, 2 µL de BigDye Terminator Cycle Sequencing v 3.1 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EEUU), 3.2 pmol de seis oligonucleótidos, cinco de ellos descritos por Stuyver et al., 2000 (externos HBPr1, HBPr374 e internos HBPr440, HBPr135,

HB1F)(39), otro descrito por Sugauchi *et. al.*, 2001 (HB12R, primer interno) (163) y 1.0 µL de 5X Sequencing buffer, en un volumen final de 10 µL.

Para la secuenciación del gen P, se prepararon mezclas de reacción que incluyeron 10 ng de cada producto de PCR, 2 µL de BigDye Terminator Cycle Sequencing v 3.1 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EEUU), 3.2 pmol de los oligonucleótidos descritos por Sayan *et al.*, Polymerase_Sense y Polymerase_Antisense (162) y 1.0 µL de 5X Sequencing buffer, en un volumen final de 10 µL. Para la secuenciación de los dos genes el perfil térmico consistió en una desnaturalización inicial a 96°C durante 1 min, seguido por 25 ciclos de desnaturalización a 96°C durante 10 seg, hibridación a 50°C durante 5 seg y extensión a 60°C durante 4 min. Los productos de las reacciones de secuenciación se purificaron mediante el estuche de purificación BigDye XTerminator (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EEUU) y posteriormente se procesaron mediante el Analizador Genético ABI3130 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EEUU).

Las secuencias fueron editadas y ensambladas a través del módulo SeqMan de la suite LaserGene v8.1 (DNASTAR Inc. Madison, WI, USA). Se corroboró que cada base estuviera representada al menos dos veces por secuencias obtenidas a partir de dos diferentes oligonucleótidos (profundidad 2x), en diferentes regiones se obtuvo una profundidad de hasta 4x.

4.5 ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Con el fin de establecer la relación filogenética entre las cepas de VHB colombianas y cepas que han circulado a nivel mundial, se generaron dos matrices, la primera (Matriz 1) con el fin de analizar una longitud máxima del genoma, se extendió entre las posiciones 2858-3182...1-1266 (1591 pb) y la segunda (Matriz 2) con el fin de incluir el máximo número de secuencias colombianas previamente reportadas, se extendió entre las posiciones 281-657 (377 pb) del genoma circular de referencia NC_003977.2. Para cada matriz se seleccionó el modelo evolutivo que mejor se ajustó a los datos utilizando el programa jModelTest (164). El análisis filogenético fue realizado mediante el software MEGA 6.0, utilizando el método Neighbor-Joining. El soporte de la topología del árbol se obtuvo mediante un remuestreo bootstrap de 1000 réplicas (165).

Se incluyeron secuencias disponibles en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) representativas de los diferentes genotipos y subtipos del VHB humano, el máximo número de secuencias colombianas previamente reportadas y una secuencia de VHB derivada del mono lanudo como grupo externo (número de acceso GenBank: AY226578).

4.6 ANÁLISIS DE RESISTENCIA A ANTIVIRALES

Para la determinación del impacto de las diferentes mutaciones presentes en las secuencias del VHB, se emplearon dos herramientas bioinformáticas disponibles online: HIV-grade HBV drug resistance interpretation (DRI) (124) y Geno2pheno [HBV] (G2P) (125), las cuales permiten determinar el genotipo viral, identificar las mutaciones en el dominio transcriptasa reversa (RT) del gen P asociadas a resistencia a fármacos e identificar mutaciones en la región codificante del antígeno pequeño S (S-HBsAg) previamente asociadas a escape o disminución de unión al anticuerpo.

En Geno2pheno [HBV] permite someter hasta ocho secuencias simultáneamente para luego ser alineadas contra una secuencia consenso del dominio RT del VHB e inferir el genotipo y subgenotipo utilizando 325 secuencias de referencia. Geno2pheno implementa una metodología de genotipificación que puede identificar y genotipar inter e intragenotipo infecciones duales basado en datos de secuenciación poblacional cuando múltiples cepas virales son visibles en las secuencias de entrada. Posteriormente la secuencia de nucleótidos alineada se traduce al aminoácido con respecto tanto al ORF RT como al ORF HBsAg; todos los polimorfismos con respecto a ambos marcos de lectura se extraen. Usando la lista de mutaciones en el ORF RT, un sistema experto basado en un conjunto de expresiones booleanas (expresiones algebraicas que dan lugar a uno de dos posibles valores, 1 ["verdadero"] o 0 ["falso"]) calcula la predicción de resistencia para los antivirales 3TC, ADF, ETV, TDF y Tlb para luego organizar estos resultados en cuatro categorías, susceptible, limitada, parcial resistente y resistente.

Las reglas están basadas en la investigación bibliográfica e incorpora resultados de investigaciones recientes; de forma similar, la secuencia de aminoácidos del HBsAg se compara con una lista exhaustiva de mutaciones que fue elaborada a partir de la literatura y que se encuentra en la herramienta www.genafor.org/services.php. El informe incluye la predicción del modo de escape (vacunal, Inmune, y / o de detección) para cada mutación

relevante, además de la escala del impacto de cada mutación (Impacto alto, impacto medio, mutación secundaria) (121). HIV-grade HBV drug resistance interpretation es una adaptación al VHB de la herramienta HIV-GRADE (166), la cual tiene como fuente la base de datos Stanford HIV (Stanford HIVdb) (167). Con esta herramienta la secuencia es alineada con una secuencia consenso pan-genotipo y luego realineada con una secuencia consenso específica; después compara la homología con diferentes secuencias representativas y secuencias consenso genotipo específicas. Las diferencias con la secuencia del genotipo más cercano se extraen y esta información es llevada a un buscador de secuencias genotipadas en el Genbank. Las diferencias con la secuencia consenso son clasificadas de acuerdo con las reglas de la interfase (algoritmos) desarrollada por el grupo de HIVdb y basadas en una extensa investigación bibliográfica, experiencia clínica de los miembros del grupo (121).

5 RESULTADOS

5.1 DISTRIBUCIÓN DE MUESTRAS POR DEPARTAMENTO

Se incluyeron 495 muestras de sueros con resultado positivo para HBsAg pertenecientes a los 32 departamentos de Colombia y al Distrito Capital con resultado positivo por ELISA para el antígeno de superficie de VHB (HBsAg), donde solamente 242 muestras habían sido confirmadas por prueba de neutralización (Tabla 2), con un mínimo de 2 y un máximo de 65 sueros provenientes de cada entidad territorial. Debe tenerse en cuenta que la incidencia de VHB reportada por año epidemiológico por las distintas entidades territoriales es independiente del número de muestras recibidas en el INS, porque la vigilancia virológica que se realiza en el grupo de virología se relaciona con la capacidad de diagnóstico en el departamento y el nivel de referencia con el INS.

5.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE GENOTIPOS Y SUBGENOTIPOS DEL VHB CIRCULANTES EN COLOMBIA

En 66 muestras (13.3%) de las 495 analizadas, se obtuvo amplificación por PCR convencional tanto del gen S como del gen P, lo cual se evidenció mediante fragmentos de banda única y del tamaño esperado para cada gen; once muestras provenían de Córdoba, nueve muestras de Guaviare, siete de Cauca, seis de Caldas, cinco de Guainía, cuatro de Magdalena, tres de Cundinamarca, tres de Sucre, tres de Tolima, dos de Boyacá, dos de Guajira, dos del Meta y una muestra de cada uno de los departamentos de Vichada, Santander, Putumayo, Norte de Santander, Casanare, Cesar, Caquetá, Atlántico y Antioquia. (Figura 5).

Tabla 2 *Distribución de muestras según ente territorial.*

Departamento	Numero de muestras procesadas	Porcentaje
Guaviare	65	13,1
Meta	45	9,1
Caldas	42	8,5
Cauca	35	7,1
Caquetá	31	6,3
Boyacá	26	5,3
Córdoba	24	4,8
Guainía	24	4,8
Amazonas	21	4,2
Sucre	20	4
Putumayo	18	3,6
Vaupés	17	3,4
Cesar	14	2,8
Casanare	13	2,6
Magdalena	13	2,6
Cundinamarca	10	2
Tolima	10	2
Santander	9	1,8
Norte de Santander	7	1,4
Arauca	6	1,2
Risaralda	6	1,2
Bogotá	5	1
Bolívar	5	1
Antioquia	4	0,8
Atlántico	4	0,8
Chocó	3	0,6
Guajira	3	0,6
Nariño	3	0,6
Valle del Cauca	3	0,6
Vichada	3	0,6
Huila	2	0,4
Quindío	2	0,4
San Andrés	2	0,4

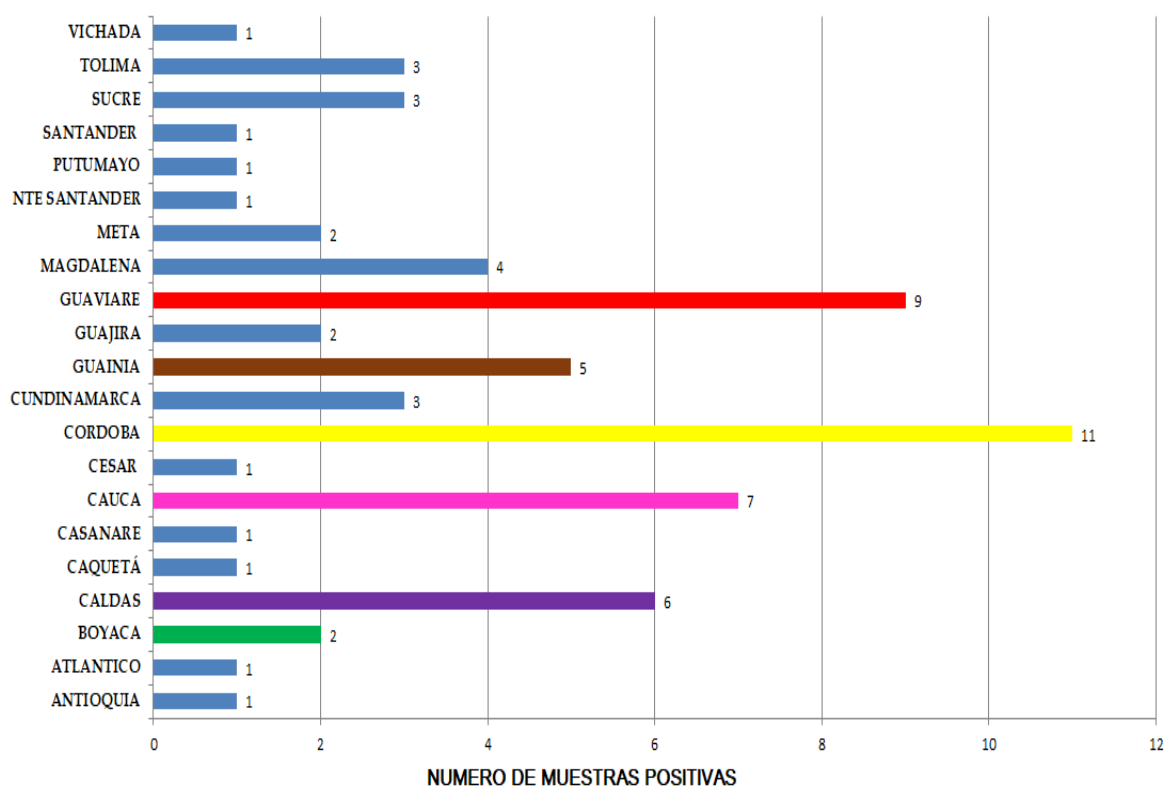


Figura 5 Muestras positivas por PCR para los genes P (parcial) y S del VHB por Departamento, periodo 2002-2014.

Las 66 muestras fueron secuenciadas para ambos genes y se incluyeron en el análisis filogenético 28 muestras (42,4%) que representaban en el análisis de los electroferogramas una profundidad de 2x (Figura 6) hasta 4x (Figura 7). Fueron excluidas del análisis las secuencias que no presentaban profundidad de al menos 2x (baja resolución en uno de los electroferogramas obtenidos) y las que sobrerrepresentaban secuencias del mismo departamento y año porque a nivel de secuencia nucleotídica fueron idénticas.

Mediante el análisis filogenético, se evidenció la presencia de los genotipos A y F cuyos subgenotipos fueron A2 y F3 respectivamente (Figura 8). El 85,7% (24/28) de las secuencias se clasificaron en el genotipo F y del 14,3% fueron clasificadas en el genotipo A, lo que está acorde con lo reportado para el país en estudios previos (4,36,45–49).

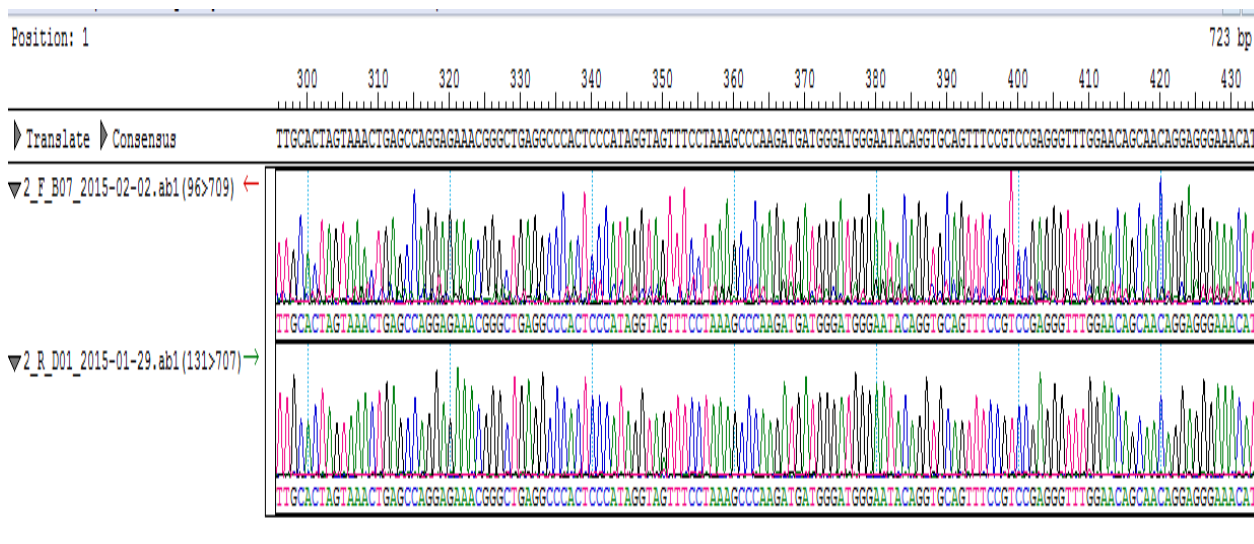


Figura 6 Electroferograma de secuenciación del gen P del VHB.

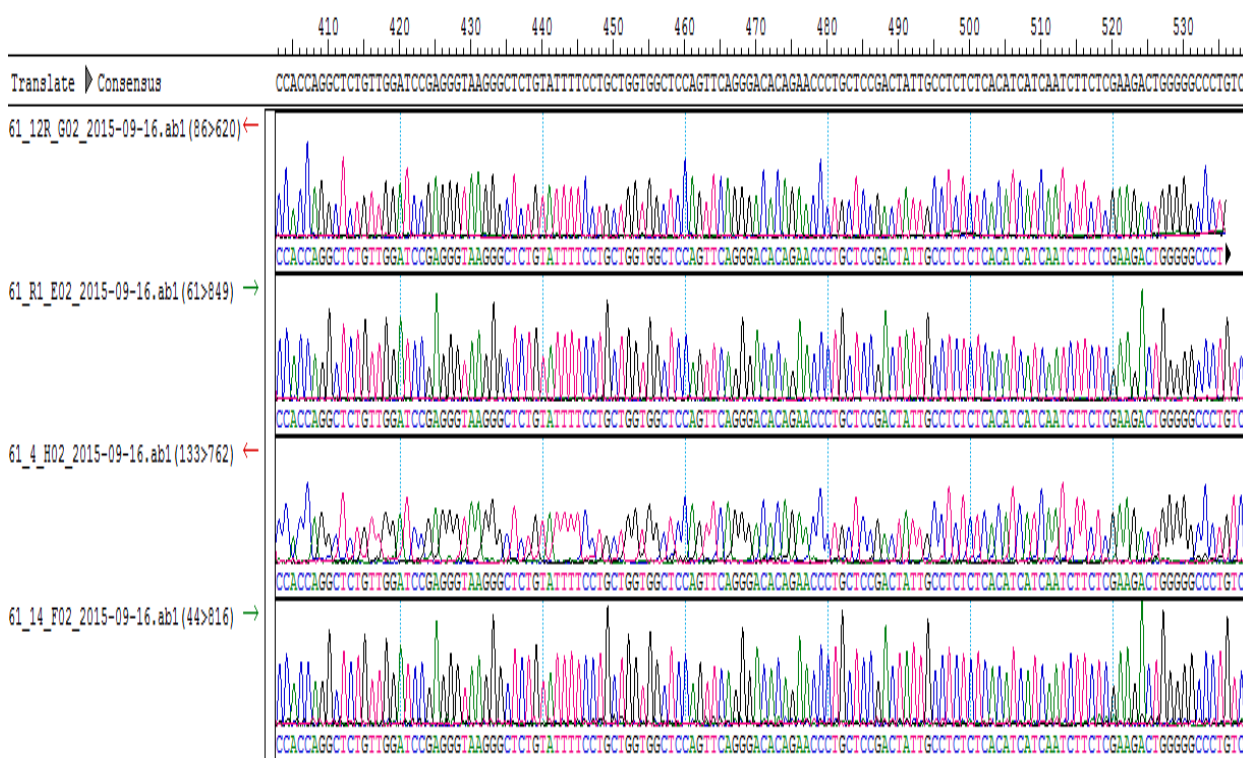


Figura 7 Electroferograma de secuenciación del Gen S del VHB.

Utilizando la Matriz 1 con 28 secuencias y basada en el gen de la polimerasa viral (longitud de 1591 pb), se realizó el análisis filogenético para la identificación de subgenotipos, de tal forma que todas las secuencias de VHB del genotipo F identificadas

en el presente estudio pertenecieron al subgenotipo F3 con una confiabilidad (soporte bootstrap) del 92% y todas las secuencias del genotipo A al subgenotipo A2 con una confiabilidad del 99%, similar a lo previamente descrito (46). La región genómica representada en la Matriz 1 (Figura 9) evidencia la divergencia evolutiva promedio de VHB entre cada par de cepas colombianas del subgenotipo A2 y F3 (0,003 y 0,007 sustituciones/sitio para A2 y F3, respectivamente) y entre dichos subgenotipos (0,162 sustituciones/sitio entre cada par de cepas colombianas). En el presente estudio no se identificaron secuencias pertenecientes a los genotipos C, D, E y G, que previamente han sido reportados para el país (4,47,49,50).

Ya que las secuencias Colombianas disponibles en GenBank pertenecientes a dichos genotipos no fueron lo suficientemente extensas o no corresponden completamente a la región representada en la Matriz 1, se generó una Matriz 2 con el fin de establecer las relaciones filogenéticas y obtener un panorama completo de los genotipos que han circulado en el país (Figura 10). En este árbol se pueden observar los diferentes genotipos representados, sin embargo, en general no es posible definir subgenotipos debido a los bajos soportes bootstrap a este nivel.

La secuencia de la muestra identificada con el código 49791_Cauca_CO_2003 presentó un gran número de sitios variables, los cuales fueron designados de acuerdo al código internacional de ambigüedad nucleotídica IUPAC (Figura 9). La alta frecuencia de sustituciones no sinónimas en la secuencia (Figura 11) sugiere la ocurrencia de una confección con dos diferentes cepas de VHB, sin embargo, es necesaria la clonación y secuenciación de los clones del producto de PCR con el objetivo de confirmar o refutar dicha hipótesis.

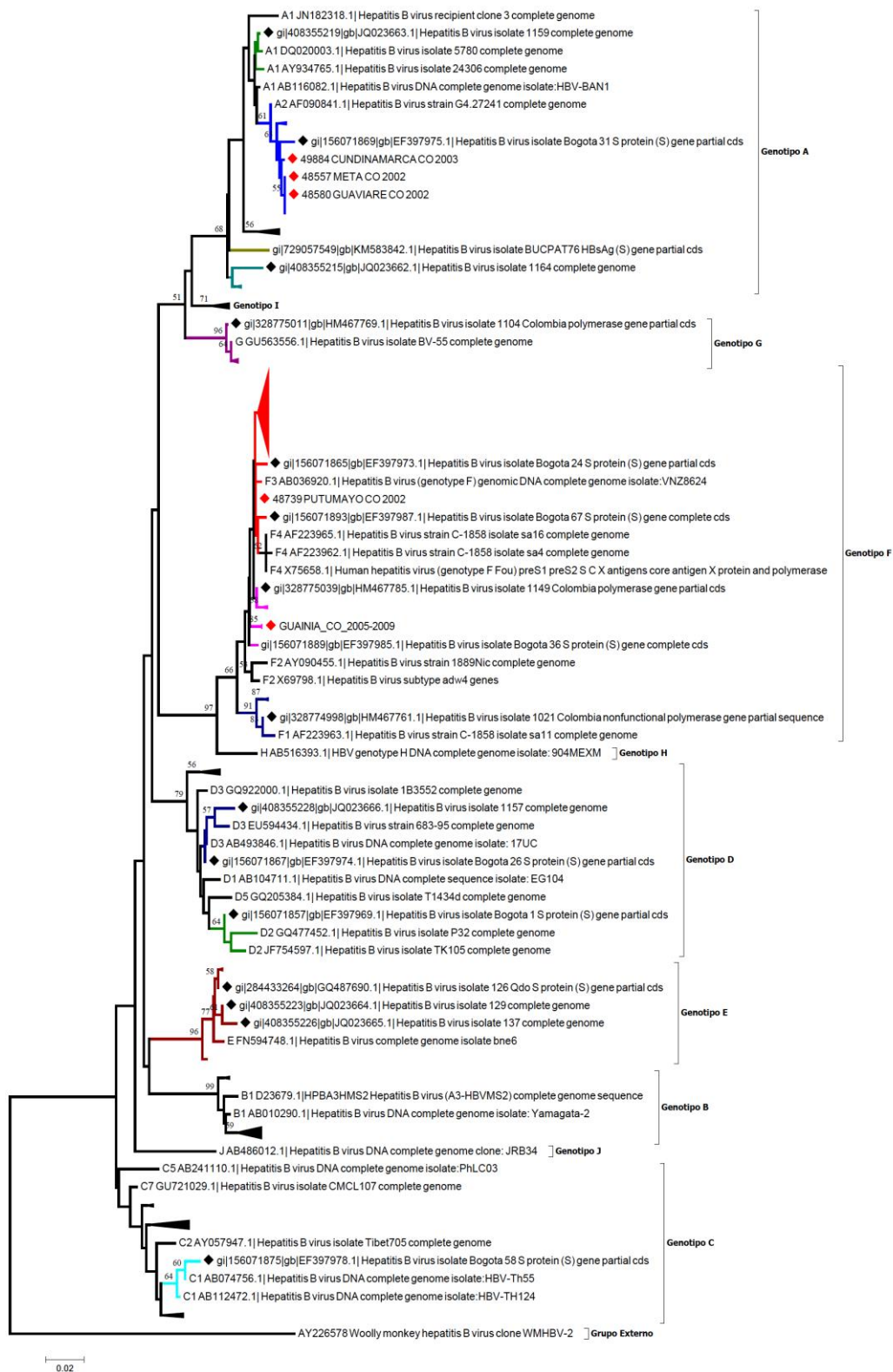


Figura 10 Genotipos de VHB presentes en Colombia. Inferencia Filogenética por Neighbor-Joining basada en un fragmento de 377 pb (posiciones 1155-1531 del genoma de referencia

Tabla 3 Mutaciones de resistencia y escape en los genes P y S del VHB, Colombia 2002-2014.

Código muestra ^a	Departamento	Año	Edad	Sexo	Genotipo	Mutaciones de resistencia a drogas en la RT ^b		Mutaciones de escape HBsAg	
						VHB DRI	Geno2Pheno	VHB DRI	Geno2Pheno
10646	Cundinamarca	2002	43	M	F	No	No	No	No
48557	Meta	2002	22	M	A	No	No	No	No
48580	Guaviare	2002	48	M	A	No	No	No	No
48585	Meta	2002	64	M	F	No	No	No	No
48627	Guaviare	2002	44	M	F	No	No	No	No
48676	Casare	2002	27	F	A	No	No	No	No
48732	Guaviare	2002	34	M	F	No	No	No	No
48739	Putumayo	2002	47	M	F	No	No	No	No
48794	Córdoba	2002	6	F	F	No	No	No	No
48817	Córdoba	2002	19	M	F	No	No	No	No
48875	Guaviare	2002	19	F	F	No	No	No	No
48877	Guaviare	2002	22	F	F	No	No	P120Q	No
49621	Boyacá	2003	25	M	F	No	No	No	No
49791	Cauca	2003	24	M	F	No	No	No	No
49793	Cauca	2003	36	M	F	No	No	No	No
49794	Cauca	2003	23	F	F	No	No	No	No
49884	Cundinamarca	2003	17	M	A	L180M (3TC, ETV, LdT) M204V (3TC, ETV, LdT)	L180M (3TC, ETV, LdT, Tyzeka®, Sebivo®) M204V (3TC, ETV, LdT, Tyzeka®, Sebivo®)	No	No
49887	Boyacá	2003	4	M	F	No	No	No	No
50418	Cauca	2004	19	M	F	No	No	No	No
50797	Córdoba	2004	31	M	F	No	No	No	No
50858	Cauca	2004	24	F	F	No	No	No	No
60265	Cesar	2004	51	M	F	I169L	I169L (ETV)	No	No
61048	Guainía	2005	20	M	F	No	No	No	No
61188	Guainía	2005	68	M	F	No	No	No	No
62233	Atlántico	2005	30	F	F	No	No	No	No
70874	Caldas	2009	39	M	F	No	No	No	No
72391	Guainía	2009	48	M	F	No	No	No	No
79446	Magdalena	2014	48	M	F	No	No	No	No

a Código interno del Laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Salud.

b Abreviaturas: M: Masculino; F: Femenino; LdT: Telbivudina; 3TC: Lamivudina; ETV: Entecavir; FTC: Emtricitabine.

Dos de las secuencias de VHB obtenidas en el presente estudio presentaron una delección en la región preS1-preS2 (Figura 13). Aunque dicha delección no compromete el HBsAg (S-HBsAg, antígeno de superficie pequeño), la misma compromete 15 codones de la región codificante del antígeno S mediano (M-HBsAg) incluyendo el codón de inicio, así como 35 codones codificantes del antígeno S grande (L-HBsAg).

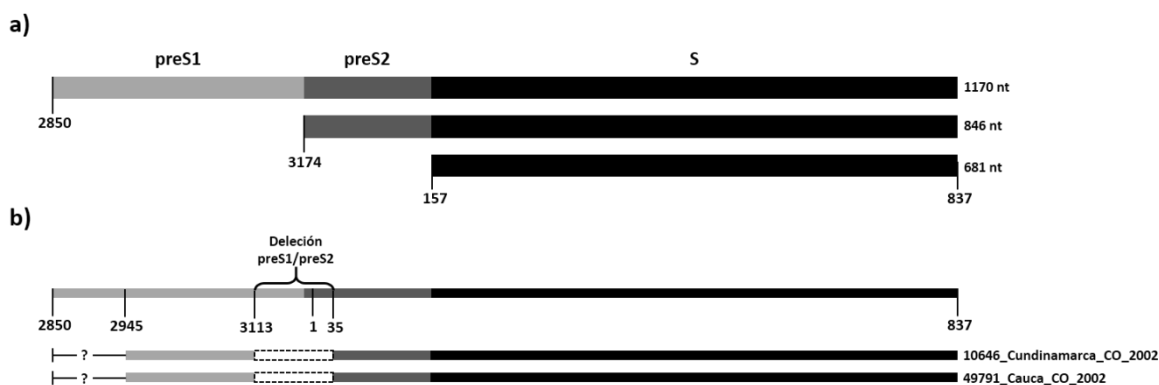


Figura 13 Región codificante de los antígenos de superficie de VHB. a) Representación gráfica de los antígenos de superficie grande (L-HBsAg), mediano (M-HBsAg) y pequeño (S-HBsAg) de VHB. b) Delimitación de la región correspondiente a la delección presente en dos cepas de VHB colombianas. Las posiciones genómicas fueron calculadas con base al genoma de referencia de VHB con número de acceso GenBank NC_003977.2. La región delimitada con signo de interrogación no pudo ser resuelta en los electroferogramas obtenidos.

6 DISCUSIÓN

La infección por el virus de la hepatitis B (VHB) es un problema de salud pública y las estimaciones mundiales sugieren que más de 2.000 millones de personas han sido infectadas por el VHB y 257 millones de estas personas están hoy infectadas crónicamente (definido como positividad del antígeno de superficie de la hepatitis B) (1,12). Aunque la mayoría de los pacientes con Hepatitis B crónica no presenta complicaciones hepáticas, todos los individuos infectados tienen mayor riesgo de fibrosis hepática progresiva que lleva a la cirrosis, descompensación hepática y/o carcinoma hepatocelular (CHC) (169). En las últimas tres décadas se ha caracterizado la infección oculta por VHB, OBI del inglés *Occult HBV infection* (definida como la detección del ADN del VHB en muestras de tejido hepático y / o de suero, en ausencia detectable del antígeno de superficie) que representa un gran riesgo de transmisión del VHB por transfusión de sangre, trasplante de órganos y progresión a cirrosis y / o carcinoma hepatocelular (HCC) (170,171).

En Colombia la notificación de Hepatitis B inició a mediados de 1996, el comportamiento en el reporte o de la incidencia hasta la actualidad ha sido influenciado no solo por la cobertura en la vigilancia del evento sino también por la definición y configuración de los casos. Hasta 2005 ingresaban al sistema de vigilancia los casos tanto probables como confirmados, posterior a ese año los casos de hepatitis B ingresan únicamente confirmados por laboratorio (172). A partir del año 2007 se inicia la notificación individual de hepatitis B, la cual se consolida hasta el año 2008. Desde entonces se ha evidenciado un incremento en los casos notificados a lo largo de los últimos años, aunque se estima que aún es importante el sub-registro, tal y como resulta al comparar con las cifras de hepatitis B en donantes de sangre las cuales han registrado en los últimos años un porcentaje de reactividad para el HBsAg cercano al 2% (14,173).

Colombia presenta un patrón heterogéneo en la incidencia y prevalencia de infección por el VHB y aunque en el año 2016 la incidencia promedio nacional registrada fue de 4.0 casos por 100.000 habitantes que corresponde a una endemidad de baja a intermedia, departamentos como el Amazonas, Norte de Santander, Guaviare, Chocó y Vaupés han sido catalogados históricamente como altamente endémicos para la hepatitis B (14,174–177). Alvarado *et al.*, en 2011 analizaron 697 muestras de suero para los marcadores

serológicos HBsAg, anti-HBc, anti-HBs y anti-HCV (anticuerpos anti virus de hepatitis C) de habitantes de Amazonas, Chocó, Magdalena y San Andrés Islas, informando que además del Amazonas, Magdalena también se cataloga como zona hiperendémica para la infección por el VHB (15).

De hecho, el Departamento del Amazonas fue la primera región en que se inició el programa universal de vacunación contra este virus con la administración de la vacuna en forma monovalente en 1992 que luego fue reemplazada por la vacuna pentavalente (además confiere protección contra las toxinas de *Corynebacterium diphtheriae* y *Clostridium tetani*, antígenos de *Bordetella pertussis* y polisacárido de *Haemophilus influenzae* tipo b) en el 2001 que se administra a los 2, 4 y 6 meses, después de una dosis de la vacuna monovalente al nacimiento (178).

La genotipificación en Colombia se ha realizado en distintos estudios epidemiológicos dentro de los cuales algunos han incluido donantes de sangre y pacientes con hepatopatías terminales identificando el genotipo F, subgenotipo F3, como el más frecuente en el país seguidos en menor proporción por los genotipos A, D, C,E y G (4,34,36,37,45–47,49,50,176). En 2009 Ríos *et al.*, realizaron un estudio en población asintomática con factores de exposición a infección por el VHB pertenecientes a dos municipios de Colombia, Quibdó (región del Pacífico con población predominantemente afrodescendiente) y Apartadó (región Nordeste con diferentes grupos étnicos, incluyendo caucásicos, mestizos y afrodescendientes) y caracterizaron los genotipos del VHB encontrando el genotipo F en ambas poblaciones (subgenotipo F3 y por primera vez en el país subgenotipo F1a) y el genotipo A sólo en la población de Quibdó lo cual concuerda con el informe de 2012 de Alvarado *et al.*, con respecto al predominio del genotipo A en población de Quibdó (46,50).

En 2008 Devesa *et al.*, secuenciaron la región S del VHB de 47 aislados procedentes de donantes de sangre de Bogotá y Bucaramanga, encontrando el genotipo F como predominante (86%) seguido por los genotipos D (8%), A (2%), C (2%) y G (2%) y el subgenotipo principal hallado fue el F3 (4) lo cual es coherente con los hallazgos del presente estudio. En 2010 Alvarado *et al.*, publicaron los resultados de la caracterización de los genotipos del VHB de nueve muestras de pacientes afro-colombianos de Quibdó, mediante la secuenciación del gen parcial S / P, encontrando por primera vez en el país el genotipo E (49). Cortés *et al.*, en 2011 encontraron que de 131 muestras de pacientes con

enfermedad hepática terminal admitidos en una clínica de Medellín, catorce fueron positivos para el HBsAg y las muestras secuenciadas pertenecían al genotipo F (37). En 2011 Di Filippo *et al.*, reportaron el subgenotipo F1b en una población amerindia del Amazonas (176). En otro estudio en 2011 en el que participaron donantes de sangre colombianos, el subgenotipo más frecuente de VHB fue F3 (75%), seguido de A2 (15,3%), G (7,7%) y F1b (2%) (41).

En general se ha encontrado que el genotipo F3 es el más frecuente en poblaciones de la región Andina de Colombia (Antioquia, Bogotá y Bucaramanga), el genotipo A en la región del Pacífico (Quibdó), mientras que el subgenotipo F1b del VHB podría ser el predominante en el sureste de Amazonas (4,37,46,50).

En concordancia, los resultados del presente estudio mostraron que una alta proporción (85,7%) de las muestras genotipificadas pertenecen al genotipo F y las restantes al genotipo A. El genotipo F ha sido asociado con falla hepática, la progresión temprana a CHC y casos fatales (52,179) y el genotipo A, subgenotipo A2 ha sido relacionado con riesgo de cronicidad en población japonesa (180). Los departamentos de Guaviare, Meta, Caldas, Cauca y Caquetá contribuyeron con el 44% de las muestras (218/495) estudiadas, estos departamentos están clasificados en los tres niveles de endemidad y con antecedentes de haber aportado de forma significativa a las estadísticas. Incluso, a pesar de la lucha por controlar la transmisión mediante la aplicación de una vacuna efectiva en población expuesta y promoción de prácticas que minimicen los factores de riesgo, el grupo de la población que no recibe vacuna podría ser un foco para la diseminación de la enfermedad.

La genotipificación y análisis filogenético del VHB ha sido relevante desde el punto de vista epidemiológico y clínico, puesto que ha permitido rastrear el origen ancestral y reciente de los virus, estimar el tiempo de aparición de los diferentes genotipos y subgenotipos, asociación con las rutas de diseminación y respuesta a la terapia antiviral (62,181), así como un complemento en el estudio de brotes para establecer cadenas de transmisión incluso a nivel judicial (182,183).

Algunas guías de práctica clínica a nivel mundial dan a la genotipificación un valor predictivo importante, es así como la Asociación Europea de estudio del hígado en su Guía de práctica

clínica para el manejo de la infección por el virus de hepatitis B indica que aunque no es necesario conocer el genotipo del VHB en la evaluación inicial del paciente infectado, puede ser muy útil para seleccionar pacientes a tratar con IFN-alfa ofreciendo información pronóstica de respuesta al tratamiento y riesgo de CHC, pero siempre acompañado de otras herramientas predictivas de primera línea (99) y según la Guía de Práctica Clínica sobre diagnóstico y tratamiento de Hepatitis B publicada por el Ministerio de Salud y protección Social, en Colombia no está establecida la genotipificación como herramienta de rutina en el manejo de la hepatitis B (160).

Estudios moleculares han demostrado que como resultado de una infección por el VHB, durante la replicación viral ocurren cambios genéticos como mutaciones puntuales, deleciones e inserciones. Estas alteraciones se generan durante el curso natural de la infección crónica y en respuesta a la presión que ejerce el sistema inmune del huésped, la vacunación, el tratamiento con inmunoglobulina anti-HBsAg o la terapia antiviral (51). Aunque la actividad de la transcriptasa reversa del VHB puede ser responsable de la alta tasa de sustitución de nucleótidos del virus en comparación con la de otros virus de ADN, la replicación del genoma del VHB no siempre depende de la transcripción inversa y, por lo tanto, la frecuencia de mutación del genoma viral durante la replicación puede no ser tan alta como el de un genoma retroviral.

Por ello hay una mayor tasa de mutación en partes no restringidas del genoma y una de tales regiones es la pre-S y especialmente la pre-S2. Teniendo en cuenta que la tasa de sustituciones sinónimas es más alta (10^4 veces más alta que el genoma del huésped y 10^{-2} menos que la de genes retrovirales) que la tasa de sustituciones no sinónimas para todos los ORF del VHB, se ha sugerido que la variación del genoma del VHB está limitada por los cambios de aminoácidos, por lo que cada proteína o cada dominio de un ORF tiene sus propias limitaciones funcionales y estructurales que conservan la secuencia de aminoácidos. La suposición es que la fuerza selectiva en cada ORF funciona independientemente de la región de superposición de genes y en el caso de existir intercambios de bases en las regiones superpuestas, estas serían el resultado de una doble selección por los dos ORF solapados. La aparición de mutaciones en la genes superpuestos como en el caso de los genes S y P pueden originar mutantes del VHB con

antigenicidad y / o replicación alterada y una historia natural diferente a la del tipo salvaje (184,185).

Actualmente el tratamiento antiviral en la infección por el VHB tiene como objetivo inicial intentar suprimir o al menos disminuir en lo posible la replicación viral, sin embargo, frente a esta presión selectiva, la alta tasa de sustitución del VHB (estimadas en $1,4$ a $3,2 \times 10^{-5}$ sustituciones de nucleótidos por sitio por año (nt / sitio / año) (186) y elevado grado de replicación (10^{12} viriones/día) surgen las mutantes de resistencia que se caracterizan por cambios selectivos de aminoácidos en varios dominios de la transcriptasa reversa / polimerasa del VHB además de exhibir niveles más bajos de replicación en comparación con los genomas de tipo salvaje (187).

Es así como en la muestra de un paciente proveniente del departamento de Cundinamarca se identificaron las mutaciones de resistencia (L180M y M204V) de forma simultánea, que hacen resistente a esta cepa a Telbivudina (LdT), Lamivudina (3TC), Entecavir (ETV). En particular, la resistencia a la lamivudina ha sido ampliamente estudiada y el tratamiento con este análogo de nucleósido en pacientes con infección crónica por el VHB produce cepas resistentes caracterizadas por mutaciones en el dominio catalítico C de la transcriptasa reversa, motivo tirosina, metionina, aspartato, aspartato (YMDD), que puede cambiar a YVDD (tirosina, valina, aspartato, aspartato; "M204V"). En el dominio B de la transcriptasa la mutación L180M restaura parcialmente la capacidad de replicación de las mutaciones del dominio C (154,188). Teniendo en cuenta que las muestras analizadas en el presente estudio fueron remitidas para diagnóstico, se puede deducir que se trata de una hepatitis aguda y ausencia de tratamiento antiviral y que posiblemente dicho paciente adquirió la infección a partir del contacto con un individuo previamente tratado con LdT, 3TC o ETV.

La mutación I169L en el dominio B de la RT de VHB fue identificada en una muestra procedente del departamento del Cesar; a pesar de que la presencia del aminoácido treonina en la posición 169 del dominio RT ha sido fuertemente asociado con resistencia a ETV, la presencia de leucina en dicha posición podría estar relacionada también con dicha resistencia y es así como fue interpretada por las herramientas en línea VHB DRI y Geno2Pheno (168).

Con respecto a las sustituciones puntuales de aminoácidos en el determinante “a” o en secuencias cercanas, estas impiden el reconocimiento del HBsAg y pueden llevar a la propagación del VHB en personas vacunadas y convertirse en un grave problema de salud pública, además de no poder ser reconocidas por pruebas convencionales para detectar HBsAg y de estar relacionadas con daño hepático avanzado, infección oculta por VHB, reactivación y reinfección en pacientes receptores de trasplante de hígado (86).

En el análisis de las secuencias del gen S del VHB se identificó la mutación P120Q en la muestra de un paciente proveniente del departamento del Guaviare, la cual fue reactiva para el HBsAg por el método de ELISA. Además P120Q está localizada cerca del determinante “a” dentro de la principal zona hidrofílica del HBsAg haciendo parte de un mini bucle (aa 120-123) (144,145) y fue reportada por primera vez en un paciente recién nacido en Corea hijo de madre infectada, al cual se le administró de forma simultánea la vacuna y el tratamiento profiláctico de inmunoglobulina (140). Esta mutación ha sido relacionada con reactividad disminuida frente a diferentes ensayos serológicos comerciales tales como: Vitros ECi HBsAg (Ortho-Clinical Diagnostics, Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido) y Auszyme Dynamic (Abbott Laboratories, North Chicago, EEUU) (141,142). De igual forma, mutaciones en la región comprendida entre los aminoácidos 120-147 pueden potencialmente evadir anticuerpos neutralizantes e infectar personas vacunadas (189).

En el presente estudio dos de las muestras correspondientes al periodo 2002-2003 presentaron una delección en la región preS1-preS2, que no compromete el HBsAg (S-HBsAg, antígeno de superficie pequeño), pero sí codones de la región codificante del antígeno S mediano (M-HBsAg) así como del antígeno S grande (L-HBsAg) y que no evidencia cambio en el marco abierto de lectura (es una delección múltiplo de tres). Aunque en la región PreS/S comúnmente se presentan delecciones y mutaciones puntuales en el codón de inicio de preS2, las cuales se encuentran asociadas con falla hepática aguda, cirrosis y hepatitis colestásica fibrosante (190,191) la delección observada en este estudio no ha sido reportada en otros estudios por lo cual no es posible hacer una correlación clínica puntual con alguna implicación clínica. Es importante anotar que se ha documentado que delecciones pre-S observadas tanto en regiones pre-S1 como pre-S2 provocan una disminución en la síntesis y secreción de antígeno de superficie pequeño que tiende a acumularse en los hepatocitos y especialmente en el retículo endoplásmico (RE), lo que

provoca estrés celular y a su vez daño oxidativo al ADN que induce mutagénesis y finalmente CHC (76,146,147,149,192–195).

En cuanto a la alta frecuencia de sustituciones no sinónimas en la secuencia de la muestra identificada con el código 49791_Cauca_CO_2003 que sugiere la ocurrencia de una coinfección con dos diferentes cepas de VHB, lo cual debe ser confirmado o refutado mediante la clonación y secuenciación de los clones del producto de PCR, es importante mencionar que se han encontrado mezclas de genotipos de VHB con mayor frecuencia en pacientes con hepatitis crónica comparada con aquellos con hepatitis aguda y es que aunque la infección pasada con un genotipo confiere inmunidad contra otros genotipos, la protección contra las cepas superinfectantes bien puede estar ausente en la infección crónica, que se caracteriza por una respuesta inmune débil e ineficaz contra el VHB. Aunque la coinfección genotípica por VHB rara vez se ha observado en pacientes con hepatitis aguda, puede deberse a que es difícil que una cepa superinfectante se establezca cuando la infección por VHB ya está presente en el hígado. Observaciones in vivo y ensayos de transfección in vitro han demostrado que las infecciones con mezclas de genotipo se asocian con una mayor replicación del VHB y se correlacionan con patogenia y resultado clínico alterados que conducen a la exacerbación aguda de la hepatitis en portadores del VHB (196,197).

Estudios relacionados con la variabilidad genética de las cepas del VHB que circulan en el país harían posible identificar las mutantes de resistencia y de escape contribuyendo a la toma de decisiones que lleven a tratamientos antivirales más efectivos.

7 CONCLUSIONES

- El presente estudio confirmó la circulación en Colombia de los genotipos/subgenotipos F3 y A2, así como la circulación predominante del subgenotipo F3.
- El análisis bioinformático permitió la identificación de tres mutaciones asociadas a resistencia a antivirales y una mutación de escape en los genes P y S. Además de evidenciar una delección en la región codificante de los antígenos de superficie de VHB cuya la implicación clínica o biológica se desconoce.
- El presente estudio constituye un aporte en la epidemiología molecular del VHB en Colombia y la identificación de mutaciones asociadas a resistencia a antivirales y escape en los genes P y S, es una información valiosa en la toma de decisiones durante la elección de la terapia antiviral.
- Estudios relacionados con la variabilidad genética de las cepas del VHB que circulan en el país harían posible identificar cambios a nivel genómico relacionados con resistencia, escape viral o patogénesis contribuyendo a la toma de decisiones que lleven a tratamientos antivirales más efectivos.

8 PERSPECTIVAS

- Teniendo en cuenta que algunos genotipos del VHB están asociados con cuadros clínicos más severos y tienen implicaciones en el manejo y tratamiento, es importante caracterizar a nivel prospectivo los genotipos de HBV en Colombia incluyendo su distribución y resistencia a los antivirales.
- Los mecanismos de escape viral, no se encuentran exclusivamente asociado a los genes evaluados, por ello es pertinente extender la búsqueda de mutaciones en el genoma completo.
- En Colombia es necesario hacer estudios que permitan determinar la prevalencia de hepatitis B oculta en distintas regiones geográficas, así como la caracterización molecular de las cepas.

BIBLIOGRAFIA

1. World Health Organization. WHO - Hepatitis B [Internet]. WHO Fact sheet. World Health Organization; 2017. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>
2. Organización Panamericana de la Salud. La hepatitis B y C en las Américas [Internet]. 2016. Available from: <http://www.paho.org/hq/images/stories/AD/HSD/hepatitis/2016-cha-factsheet-worldhepday-es.jpg?ua=1>
3. Seeger C, Zoulim F, Mason WS. Hepadnaviruses. In: Knipe D, Howley P, editors. *Fields Virology*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins; 2013. p. 2185–221.
4. Devesa M, Loureiro CL, Rivas Y, Monsalve F, Cardona N, Duarte MC, et al. Subgenotype Diversity of Hepatitis B Virus American Genotype F in Amerindians From Venezuela and the General Population of Colombia. *J Med Virol*. 2008;80(12):20–6.
5. Lazarevic I. Clinical implications of hepatitis B virus mutations: Recent advances. *World J Gastroenterol*. 2014;20(24):7653–64.
6. Pawlotsky JM. The concept of hepatitis B virus mutant escape. *J Clin Virol*. 2005;34(SUPPL. 1):125–9.
7. Purdy MA. Hepatitis B virus S gene escape mutants. *Asian J Transfus Sci*. 2007 Jul;1(2):62–70.
8. Rodríguez-Frias F, Jardi R. Virología molecular del virus de la hepatitis B. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008;26:2–10.
9. Jaramillo CM, Navas M-C. Escape mutants of hepatitis B virus. *Rev Chil infectología*. 2015 Apr;32(2):190–7.
10. Romanò L, Paladini S, Galli C, Raimondo G, Pollicino T, Zanetti AR. Hepatitis B vaccination. *Hum Vaccin Immunother*. 2015 Jan 9;11(1):53–7.
11. Torresi J. The virological and clinical significance of mutations in the overlapping envelope and polymerase genes of hepatitis B virus. *J Clin Virol*. 2002;25(2):97–106.
12. Schweitzer A, Horn J, Mikolajczyk RT, Krause G, Ott JJ. Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013. *Lancet*. 2015 Oct;386(10003):1546–55.
13. Murray CJL, GBD 2015 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age–sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2015;385(9963):117–71.
14. Sivigila: Instituto Nacional de Salud. Boletín epidemiológico semanal semana 52 año 2016. Bogotá; 2016.
15. Alvarado-Mora MV, Gutierrez MF, Soares Gomes-Gouvêa M, Soares de Azevedo Neto R, Carrilho FJ, Rebello-Pinho JR. Hepatitis B (HBV), Hepatitis C (HCV) and Hepatitis Delta (HDV) Viruses in the Colombian Population—How Is the Epidemiological Situation? *PLoS One*. 2011 Apr 29;6(4):e18888.
16. Nelson NP, Easterbrook PJ, McMahon BJ. Epidemiology of Hepatitis B Virus Infection and Impact of Vaccination on Disease. *Clin Liver Dis*. 2016;20(4):607–28.
17. Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet (London, England)*. 1970 Apr 4;1(7649):695–8.

18. Blumberg BS, Gerstley BJ, Hungerford DA, London WT, Sutnick AI. A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis. *Ann Intern Med.* 1967 May;66(5):924–31.
19. International Committee on Taxonomy of Viruses., King A. *Virus taxonomy : ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Elsevier; 2011.
20. Luangsay S, Zoulim F. Hepatitis B Virus and Other Hepadnaviridae. In: Thomas HC, Lok ASF, Locarnini SA, Zuckerman AJ, editors. *Viral Hepatitis.* 4th Editio. Lyon, France: Wiley-Blackwell; 2013.
21. Ito K, Qin Y, Guarnieri M, Garcia T, Kwei K, Mizokami M, et al. Impairment of Hepatitis B Virus Virion Secretion by Single-Amino-Acid Substitutions in the Small Envelope Protein and Rescue by a Novel Glycosylation Site. *J Virol.* 2010;84(24):12850–61.
22. Yan H, Liu Y, Sui J, Li W. NTCP opens the door for hepatitis B virus infection. *Antiviral Res.* 2015 Sep;121:24–30.
23. Echevarría JM, Avellón A. Hepatitis B virus genetic diversity. *J Med Virol.* 2006;78(SUPPL. 1):446–64.
24. Weber B. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: Clinical and diagnostic impact. *J Clin Virol.* 2005;32(2):102–12.
25. Kramvis A, Kew M, François G. Hepatitis B virus genotypes. *Vaccine.* 2005;23(19):2409–23.
26. Wai C-TT, Fontana RJ. Clinical significance of hepatitis B virus genotypes, variants, and mutants. *Clin Liver Dis.* 2004;8(2):321–52, vi.
27. Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, et al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol.* 1988 Oct 1;69 (Pt 10(10):2575–83.
28. Jaramillo CM, Navas M-CC. Variantes de escape del virus de la hepatitis B. *Infectología al Día.* 2015 Apr;32(2):190–7.
29. Kurbanov F, Tanaka Y, Mizokami M. Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus. *Hepatol Res.* 2010;40(1):14–30.
30. Zehender G, Ebranati E, Gabanelli E, Sorrentino C, Lo Presti A, Tanzi E, et al. Enigmatic origin of hepatitis B virus: An ancient travelling companion or a recent encounter? *World J Gastroenterol.* 2014;20(24):7622–34.
31. Lin C, Kao J. The clinical implications of hepatitis B virus genotype : 2011;26.
32. Buti M, Rodriguez-Frias F, Jardi R, Esteban R. Hepatitis B virus genome variability and disease progression: The impact of pre-core mutants and HBV genotypes. *J Clin Virol.* 2005;34(S1):S79–82.
33. Pourkarim MR, Amini-Bavil-Olyaei S, Kurbanov F, Van Ranst M, Tacke F. Molecular identification of hepatitis B virus genotypes/subgenotypes: revised classification hurdles and updated resolutions. *World J Gastroenterol.* 2014 Jun 21;20(23):7152–68.
34. Alvarado Mora MV, Rebello Pinho JR, Alvarado-Mora M V, Rebello Pinho JR. Distribution of HBV genotypes in Latin America. *Int Soc Antivir Res.* 2013;18(3 Pt B):459–65.
35. Norder H, Couroucé A-M, Coursaget P, Echevarria JM, Lee S-D, Mushahwar IK, et al. Genetic Diversity of Hepatitis B Virus Strains Derived Worldwide: Genotypes, Subgenotypes, and HBV Ag Subtypes. *Intervirology.* 2004 Nov 26;47(6):289–309.
36. Rios-Ocampo WA, Cortes-Mancera F, Olarte JC, Soto A, Navas M-C. Occult Hepatitis B virus infection Among blood donors in Colombia. *Virol J.* 2014 Jan;11(1):206.

37. Cortes-Mancera F, Loureiro CL, Hoyos S, Restrepo J-C, Correa G, Jaramillo S, et al. Etiology and Viral Genotype in Patients with End-Stage Liver Diseases admitted to a Hepatology Unit in Colombia. *Hepat Res Treat*. 2011;2011(10):1–10.
38. Sánchez L V, Tanaka Y, Maldonado M, Mizokami M, Panduro A. Difference of hepatitis B virus genotype distribution in two groups of mexican patients with different risk factors. High prevalence of genotype H and G. *Intervirology*. 2007 Nov 24;50(1):9–15.
39. 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 Jan;81(Pt 1):67–74.
40. Vieth S, Manegold C, Drosten C, Nippraschk T, Günther S. Sequence and phylogenetic analysis of hepatitis B virus genotype G isolated in Germany. *Virus Genes*. 2002 Mar;24(2):153–6.
41. Alvarado-Mora MV, Romano CM, Gomes-Gouvêa MS, Gutierrez MF, Botelho L, Carrilho FJ, et al. Molecular characterization of the Hepatitis B virus genotypes in Colombia: A Bayesian inference on the genotype F. *Infect Genet Evol*. 2011 Jan;11(1):103–8.
42. Mendes-Correa MC, Pinho JRR, Locarnini S, Yuen L, Sitnik R, Santana RAF, et al. High frequency of lamivudine resistance mutations in Brazilian patients co-infected with HIV and hepatitis B. *J Med Virol*. 2010 Sep 15;82(9):1481–8.
43. Flichman D, Galdame O, Livellara B, Viaut M, Gadano A, Campos R. Full-Length Genome Characterization of Hepatitis B Virus Genotype H Strain Isolated from Serum Samples Collected from Two Chronically Infected Patients in Argentina. *J Clin Microbiol*. 2009 Dec 1;47(12):4191–3.
44. Sunbul M. Hepatitis B virus genotypes: global distribution and clinical importance. *World J Gastroenterol*. 2014 May 14;20(18):5427–34.
45. Rendón J-C, Cortés-Mancera F, Duque-Jaramillo A, Ospina MC, Navas MC, Navas MC. Analysis of hepatitis B virus genotypes by restriction fragment length polymorphism. *Biomédica*. 2016;36(Supl.2):79–88.
46. Ríos-Patiño D, Di-Filippo D, Insuasty M, Rendón J-C, Ríos W-A, Medina C, et al. Infección por el virus de la hepatitis B en individuos con factores de exposición en Quibdó y Apartadó, Colombia. *Rev Colomb Gastroenterol*. 2015;30(1):11–8.
47. Bautista-Amorocho H, Castellanos-Domínguez YZ, Rodríguez-Villamizar LA, Velandia-Cruz SA, Becerra-Peña JA, Farfán-García AE. Epidemiology, risk factors and genotypes of HBV in HIV-infected patients in the northeast region of Colombia: High prevalence of occult hepatitis B and F3 subgenotype dominance. *PLoS One*. 2014;9(12):1–14.
48. Moura IF, Lopes EP, Alvarado-Mora MV, Pinho JR, Carrilho FJ. Phylogenetic analysis and subgenotypic distribution of the hepatitis B virus in Recife, Brazil. *Infect Genet Evol*. 2013;14(1):195–9.
49. Alvarado Mora MV, Malta Romano C, Soares Gomes-Gouvê M, Fernanda Gutierrez M, José Carrilho F, Renato Rebello Pinho J. Molecular epidemiology and genetic diversity of hepatitis B virus genotype E in an isolated Afro-Colombian community. *J Gen Virol*. 2010;91(2):501–8.
50. Alvarado-Mora M V, Romano CM, Gomes-Gouvêa MS, Gutierrez MF, Carrilho FJ, Pinho JR. Phylogenetic analysis of complete genome sequences of hepatitis B virus from an Afro-Colombian community: presence of HBV F3/A1 recombinant strain. *Virol J*. 2012;9(1):244.
51. Venegas M, Villanueva R, Brahm J. Variabilidad genética del virus hepatitis B y su significado clínico. *Rev Hosp Clín Univ Chile*. 2010;21(1):154–61.

52. Sanchez-Tapias JM, Costa J, Mas A, Bruguera M, Rodes J, Sánchez-Tapias MJ, et al. Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. *Gastroenterology*. 2002 Dec;123(6):1848–56.
53. Liu C-J, Kao J-H. Global Perspective on the Natural History of Chronic Hepatitis B: Role of Hepatitis B Virus Genotypes A to J. *Semin Liver Dis*. 2013;33:97–102.
54. Boglione L, D'Avolio A, Cariti G, Milia MG, Simiele M, De Nicolò A, et al. Sequential therapy with entecavir and PEG-INF in patients affected by chronic hepatitis B and high levels of HBV-DNA with non-D genotypes. *J Viral Hepat*. 2013;20(4).
55. Shi Y-H. Correlation between Hepatitis B Virus Genotypes and Clinical Outcomes. *Jpn J Infect Dis*. 2012;65(6):476–82.
56. Zhang Y, Wu Y, Ye S, Wang T, Zhao R, Chen F, et al. The response to interferon is influenced by hepatitis B virus genotype in vitro and in vivo. *Virus Res*. 2012;1–6.
57. Liu C-J, Kao J-H. Genetic variability of hepatitis B virus and response to antiviral therapy. *Antivir Ther*. 2008;13(5):613–24.
58. Wiegand J, Hasenclever D, Tillmann HL. Should treatment of hepatitis B depend on hepatitis B virus genotypes? A hypothesis generated from an explorative analysis of published evidence. *Antivir Ther*. 2008;13(2):211–20.
59. Park S, Kim Y, Park E, Ryu H. Fidelity of hepatitis B virus polymerase. *Eur J*. 2003;
60. Beck J, Nassal M. Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol*. 2007 Jan 7;13(1):48–64.
61. Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B Virus Resistance to Nucleos(t)ide Analogues. *Gastroenterology*. 2009;137(5):1593–1608.e2.
62. Kramvis A, Arakawa K, Yu MC, Nogueira R, Stram DO, Kew MC. Relationship of serological subtype, basic core promoter and precore mutations to genotypes/subgenotypes of hepatitis B virus. *J Med Virol*. 2008 Jan;80(1):27–46.
63. Kramvis A, Kew MC. Relationship of genotypes of hepatitis B virus to mutations, disease progression and response to antiviral therapy. *J Viral Hepat*. 2005 Sep;12(5):456–64.
64. Carman W, Hadziyannis S, McGarvey M, Jacyna M. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet*. 1989;
65. Lok AS, Akarca U, Greene S. Mutations in the pre-core region of hepatitis B virus serve to enhance the stability of the secondary structure of the pre-genome encapsidation signal. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Apr 26;91(9):4077–81.
66. Nordin M, Ingman M, Lindqvist B, Kidd-Ljunggren K. Variability in the precore and core promoter region of the hepatitis B virus genome. *J Med Virol*. 2014 Mar;86(3):437–45.
67. Ozasa A, Tanaka Y, Orito E, Sugiyama M, Kang J-H, Hige S, et al. Influence of genotypes and precore mutations on fulminant or chronic outcome of acute hepatitis B virus infection. *Hepatology*. 2006 Aug;44(2):326–34.
68. Liao Y, Hu X, Chen J, Cai B, Tang J, Ying B, et al. Precore Mutation of Hepatitis B Virus May Contribute to Hepatocellular Carcinoma Risk: Evidence from an Updated Meta-Analysis. Villa E, editor. *PLoS One*. 2012 Jun 1;7(6):e38394.
69. Tacke F, Gehrke C, Luedde T, Heim A, Manns MP, Trautwein C. Basal Core Promoter and Precore Mutations in the Hepatitis B Virus Genome Enhance Replication Efficacy of Lamivudine-Resistant Mutants. *J Virol*. 2004 Aug 15;78(16):8524–35.
70. Huy TTT, Ushijima H, Sata T, Abe K. Genomic characterization of HBV genotype F in Bolivia: Genotype F subgenotypes correlate with geographic distribution and T1858 variant. *Arch Virol*. 2006 Mar 2;151(3):589–97.
71. Franca PHC, Gonzalez JE, Munne MS, Brandao LH, Gouvea VS, Sablon E, et al.

- Strong Association between Genotype F and Hepatitis B Virus (HBV) e Antigen-Negative Variants among HBV-Infected Argentinean Blood Donors. *J Clin Microbiol*. 2004 Nov 1;42(11):5015–21.
72. Chan H, Sung J. Hepatocellular Carcinoma and Hepatitis B Virus. *Semin Liver Dis*. 2006 May;26(2):153–61.
 73. Bertoletti A, Ferrari C, Fiaccadori F, Penna A, Margolskee R, Schlicht HJ, et al. HLA class I-restricted human cytotoxic T cells recognize endogenously synthesized hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(23):10445–9.
 74. Gerken G, Kremsdorf D, Capel F, Petit MA, Dauguet C, Manns MP, et al. Hepatitis B defective virus with rearrangements in the preS gene during chronic HBV infection. *Virology*. 1991 Aug;183(2):555–65.
 75. Fernholz D, Stemler M, Brunetto M, Bonino F, Will H. Replicating and virion secreting hepatitis B mutant virus unable to produce preS2 protein. *J Hepatol*. 1991;13 Suppl 4:S102-4.
 76. Fan Y, Lu CC, Chen WC, Yao WJ, Wang HC, Chang TT, et al. Prevalence and significance of hepatitis B virus (HBV) pre-S mutants in serum and liver at different replicative stages of chronic HBV infection. *Hepatology*. 2001 Jan;33(1):277–86.
 77. Gerken G, Kremsdorf D, Petit MA, Manns M, zum Büschenfelde K-HM, Bréchet C. Hepatitis B defective virus with rearrangements in the preS gene during HBV chronic infection. *J Hepatol*. 1991 Jan;13:S93–6.
 78. Gerner PR, Friedt M, Oettinger R, Lausch E, Wirth S. The Hepatitis B Virus Seroconversion to Anti-HBe Is Frequently Associated with HBV Genotype Changes and Selection of preS2-Defective Particles in Chronically Infected Children. *Virology*. 1998 May;245(1):163–72.
 79. Melegari M, Bruno S, Wands JR. Properties of Hepatitis B Virus Pre-S1 Deletion Mutants. *Virology*. 1994 Mar;199(2):292–300.
 80. Fernholz D, Galle PR, Stemler M, Brunetto M, Bonino F, Will H. Infectious Hepatitis B Virus Variant Defective in Pre-S2 Protein Expression in a Chronic Carrier. *Virology*. 1993 May;194(1):137–48.
 81. Chen Y, Qian F, Yuan Q, Li X, Wu W, Guo X, et al. Mutations in hepatitis B virus DNA from patients with coexisting HBsAg and anti-HBs. *J Clin Virol*. 2011;52(3):198–203.
 82. Jang J, Kim H, Kim H, Shin W. Association of concurrent hepatitis B surface antigen and antibody to hepatitis B surface antigen with hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B virus infection. *J Med*. 2009;
 83. Sugauchi F, Ohno T, Orito E, Sakugawa H, Ichida T, Komatsu M, et al. Influence of hepatitis B virus genotypes on the development of preS deletions and advanced liver disease. *J Med Virol*. 2003 Aug;70(4):537–44.
 84. Tai P-C, Suk F-M, Gerlich WH, Neurath AR, Shih C. Hypermodification and Immune Escape of an Internally Deleted Middle-Envelope (M) Protein of Frequent and Predominant Hepatitis B Virus Variants. *Virology*. 2002 Jan;292(1):44–58.
 85. Carman W, Karayiannis P, Waters J, Thomas H. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet*. 1990;
 86. Weinberger KM, Bauer T, Böhm S, Jilg W. High genetic variability of the group-specific a-determinant of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) and the corresponding fragment of the viral polymerase in chronic virus carriers lacking detectable HBsAg in serum. *J Gen Virol*. 2000;81(5):1165–74.
 87. Mateos M, Tato M, Casado J, Moreira V. Hepatitis crónica B por mutante G145R del virus de la hepatitis B. *Med Clin (Barc)*. 2006;

88. Sheldon J, Soriano V. Hepatitis B virus escape mutants induced by antiviral therapy. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61(4):766–8.
89. Jaramillo C. Genotipificación de aislados e identificación de variantes de escape del virus de la hepatitis B (VHB) provenientes de individuos de comunidades indígenas del Departamento del Amazonas, Colombia. Tesis Maestría (Información no publicada); 2013.
90. Delaney W, Yang H, Westland C, Das K. The hepatitis B virus polymerase mutation rtV173L is selected during lamivudine therapy and enhances viral replication in vitro. *J Virol.* 2003;
91. Sayan M. Antiviral drug-associated potential vaccine-escape mutants (ADAPVEMs) in chronic hepatitis B patients: A multicenter, controlled, prospective study in Turkey. Vol. 7, *Hepatology International.* 2013. p. S188–9.
92. Sayan M, Akhan S. Antiviral drug-associated potential vaccine-escape hepatitis B virus mutants in Turkish patients with chronic hepatitis B. *Int J Infect Dis.* 2011;
93. Locarnini S a., Yuen L. Molecular genesis of drug-resistant and vaccine-escape HBV mutants. *Antivir Ther.* 2010;15(3 PART B):451–61.
94. Hoofnagle JH, Doo E, Liang TJ, Fleischer R, Lok ASF. Management of hepatitis B: Summary of a clinical research workshop. *Hepatology.* 2007 Apr;45(4):1056–75.
95. Stuyver LJ, Locarnini SA, Lok A, Richman DD, Carman WF, Dienstag JL, et al. Nomenclature for antiviral resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. *Front Viral Hepat.* 2003;335–51.
96. Angus P, Vaughan R, Xiong S, Yang H, Delaney W, Gibbs C, et al. Resistance to adefovir dipivoxil therapy associated with the selection of a novel mutation in the HBV polymerase. *Gastroenterology.* 2003 Aug;125(2):292–7.
97. Kim K-H, Kim ND, Seong B-L. Discovery and Development of Anti-HBV Agents and Their Resistance. *Molecules.* 2010 Aug 27;15(9):5878–908.
98. Ali As, Abdel-Hafiz H, Suhail M, Al-Mars A. Hepatitis B virus, HBx mutants and their role in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2014;20(30).
99. European Association for the Study of the Liver. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 2017;
100. Mallory M-A, Page S-R, Hillyard D-R. Development and validation of a hepatitis B virus DNA sequencing assay for assessment of antiviral resistance, viral genotype and surface antigen mutation status. *J Virol Methods.* 2011;177(1):31–7.
101. Madan K, Tyagi P. Hepatitis B Virus Genotyping: Is the Time Ripe for Routine Clinical Use? *J Clin Exp Hepatol.* 2012;2(2):174–80.
102. Cooksley WGE. Do we need to determine viral genotype in treating chronic hepatitis B? *J Viral Hepat.* 2010;17(9):601–10.
103. Bartholomeusz A, Schaefer S. Hepatitis B virus genotypes: comparison of genotyping methods. *Rev Med Virol.* 2004 Jan;14(1):3–16.
104. Lowe C-F, Merrick L, Harrigan P-R, Mazzulli T, Sherlock C-H, Ritchie G. Implementation of Next-Generation Sequencing for Hepatitis B Virus Resistance Testing and Genotyping in a Clinical Microbiology Laboratory. *J Clin Microbiol.* 2016 Jan;54(1):127–33.
105. Datta S, Chatterjee S, Veer V. Recent advances in molecular diagnostics of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol.* 2014 Oct 28;20(40):14615–25.
106. Ouneissa R, Bahri O, Ben Yahia A, Touzi H, Azouz MM, Ben Mami N, et al. Evaluation of PCR-RFLP in the Pre-S Region as Molecular Method for Hepatitis B Virus Genotyping. *Hepat Mon.* 2013;13(10):e11781.
107. Song Y, Dai E, Wang J, Liu H, Zhai J, Chen C, et al. Genotyping of hepatitis B virus (HBV) by oligonucleotides microarray. *Mol Cell Probes.* 2006;20(2):121–7.

108. Mangia A, Antonucci F, Brunetto M, Capobianchi M, Faggioli S, Guido M, et al. The use of molecular assays in the management of viral hepatitis. *Dig Liver Dis*. 2008;40(6):395–404.
109. Wang Y-Z. Oligonucleotide chip, real-time PCR and sequencing for genotyping of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol*. 2007;13(31):4260.
110. Guirgis BSS, Abbas RO, Azzazy HME. Hepatitis B virus genotyping: current methods and clinical implications. *Int J Infect Dis*. 2010 Nov;14(11):e941–53.
111. Canfield E. Sanger Method for DNA Sequencing. 2003;(Figure 2):1–5.
112. Innogenetics. INNO-LiPA HBV Genotyping. 2007. p. 1–24.
113. Mizokami M, Nakano T, Orito E, Tanaka Y, Sakugawa H, Mukaide M, et al. Hepatitis B virus genotype assignment using restriction fragment length polymorphism patterns. *FEBS Lett*. 1999 Apr 30;450(1–2):66–71.
114. Naito H, Hayashi S, Abe K. Rapid and Specific Genotyping System for Hepatitis B Virus Corresponding to Six Major Genotypes by PCR Using Type-Specific Primers. *J Clin Microbiol*. 2001 Jan;39(1):362–4.
115. Zhang R, Deng Y, Muller C, Ou Z-Y. Determination of hepatitis B virus genotype by flow-through reverse dot blot- ClinicalKey. *J Clin Virol*. 2007;39(2):94–100.
116. Lee JM, Ahn SH, Chang HY, Shin JE, Kim DY, Sim MK, et al. [Reappraisal of HBV genotypes and clinical significance in Koreans using MALDI-TOF mass spectrometry]. *Korean J Hepatol*. 2004 Dec;10(4):260–70.
117. Tadokoro K, Kobayashi M, Yamaguchi T, Suzuki F, Miyauchi S, Egashira T, et al. Classification of hepatitis B virus genotypes by the PCR-Invader method with genotype-specific probes. *J Virol Methods*. 2006;138(1):30–9.
118. Liu W-C, Mizokami M, Buti M, Lindh M, Young K-C, Sun K-T, et al. Simultaneous quantification and genotyping of hepatitis B virus for genotypes A to G by real-time PCR and two-step melting curve analysis. *J Clin Microbiol*. 2006 Dec;44(12):4491–7.
119. Yan Q. Bioinformatics databases and tools in virology research: an overview. *Silico Biol*. 2008;8:71–85.
120. Moriconi F, Beard MR, Yuen LK. Bioinformatics methods for the analysis of hepatitis viruses. *Antivir Ther*. 2013;18(3 Pt B):531–9.
121. Neumann-Fraune M, Beggel B, Kaiser R, Obermeier M. Hepatitis B virus drug resistance tools: one sequence, two predictions. *Intervirol*. 2014 Jan;57(3–4):232–6.
122. Simon B, Kundi M, Puchhammer E. Analysis of mutations in the S gene of hepatitis B virus strains in patients with chronic infection by online bioinformatics tools. *J Clin Microbiol*. 2013;51(1):163–8.
123. Hayer J, Jadeau F, Deléage G, Kay A, Zoulim F, Combet C. HBVdb: a knowledge database for Hepatitis B Virus. *Nucleic Acids Res*. 2013 Jan;41(Database issue):D566–70.
124. Walter H. HIV-grade HBV drug resistance interpretation: HBVseq sequence analysis. Max von Pettenkofer-Institute, Munich, Germany. [Internet]. 2007. Available from: http://www.hiv-grade.de/hbv_grade/deployed/grade.pl?program=hbvalg.
125. Beggel et al. B. Geno2pheno [HBV]. Max Planck Institute for Informatics, Saarbrücken, Germany. [Internet]. 2009. Available from: <http://hbv.geno2pheno.org/>
126. Stanford_University. Stanford HBVseq sequence analysis. [Internet]. 2009. Available from: <http://hivdb.stanford.edu/HBV/HBVseq/development/hbvseq.pl?action=showSequenceForm>.

127. Gnaneshan S, Ijaz S, Moran J, Ramsay M, Green J. HepSEQ: International public health repository for Hepatitis B. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(SUPPL. 1):367–70.
128. Bell TG, Kramvis A. Bioinformatics tools for small genomes, such as hepatitis B virus. *Viruses.* 2015 Mar;7(2):781–97.
129. Ferrari C, Missale G, Boni C, Urbani S. Immunopathogenesis of hepatitis B. *J Hepatol.* 2003;39.
130. Wieland S, Thimme R, Purcell RH, Chisari F V. Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection. *PNAS.* 2004;
131. Chisari F, Isogawa M, Wieland S. Pathogenesis of Hepatitis B virus infection. *Pathol Biol.* 2010;58(4):258–66.
132. Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology.* Sixth Edit. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. 2185-2225 p.
133. Kew MC. Hepatitis B virus x protein in the pathogenesis of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011 Jan;26 Suppl 1:144–52.
134. Feitelson MA, Lee J. Hepatitis B virus integration, fragile sites, and hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett.* 2007 Jul 18;252(2):157–70.
135. Balanzó-Tintoré J, Enríquez J. Hepatitis B. Primera. Barcelona, España.: Marge Books; 2007. 104-120 p.
136. Ríos-Ocampo W, Restrepo J, Cortés F, Correa G, Navas MC. Infección oculta por el virus de la hepatitis B Aspectos clínicos epidemiológicos y moleculares. *Acta Médica Colomb.* 2013;38(1).
137. De-La-Vega Bueno A. Hepatitis agudas y crónicas. *Pediatr Integr.* 2003;7(3):203–12.
138. Devesa M, Loureriro C. Variabilidad genética del virus de la hepatitis B y sus implicaciones. *Acta Científica la Soc Venez Bioanalistas Espec.* 2000;6(1–2):13–28.
139. Zanetti AR, Tanzi E, Manzillo G, Maio G, Sbreglia C, Caporaso N, et al. Hepatitis B variant in Europe. *Lancet (London, England).* 1988 Nov 12;2(8620):1132–3.
140. Myung Lee K, Soo Kim Y, Yoon Ko Y, Moo Yoo B. Emergence of vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus with multiple surface gene mutations in a Korean child. *J Korean Med Sc.* 2001;16.
141. Kfoury Baz EM, Zheng J, Mazuruk K, Van Le A, Peterson DL. Characterization of a novel hepatitis B virus mutant: Demonstration of mutation-induced hepatitis B virus surface antigen group specific “a” determinant conformation change and its application in diagnostic assays. *Transfus Med.* 2001;11(5):355–62.
142. Avellón A, Echevarria JM. Frequency of hepatitis B virus “a” determinant variants in unselected Spanish chronic carriers. *J Med Virol.* 2006 Jan;78:24–36.
143. Zhang Z-H, Li X, Li J, Wu C-C, Chen X-W, Lu M-J, et al. Genetic variation of hepatitis B virus and its significance for pathogenesis 2016 Hepatitis B virus: Global view. *World J Gastroenterol January World J Gastroenterol.* 2016;7(221):126–44.
144. Wallace LA, Echevarria JE, Echevarria JM, Carman WF. Molecular characterization of envelope antigenic variants of hepatitis B virus from Spain. *J Infect Dis.* 1994 Nov;170(5):1300–3.
145. Navika Yamani L, Yano Y, Utsumi T, Wandono H, Widjanarko D, Triantanoe A, et al. Ultradeep Sequencing for Detection of Quasispecies Variants in the Major Hydrophilic Region of Hepatitis B Virus in Indonesian Patients. *J Clin Microbiol.* 2015;53(10).
146. Chen BF, Liu CJ, Jow GM, Chen PJ, Kao JH, Chen DS. High Prevalence and Mapping of Pre-S Deletion in Hepatitis B Virus Carriers With Progressive Liver Diseases. *Gastroenterology.* 2006;130(4):1153–68.
147. Caligiuri P, Cerruti R, Icardi G, Bruzzone B. Overview of hepatitis B virus mutations

- and their implications in the management of infection. *World J Gastroenterol*. 2016;22(1):145–54.
148. Besharat S, Katoonizadeh A, Moradi A. Potential mutations associated with occult hepatitis B virus status. *Hepat Mon*. 2014;14(5).
 149. Chen CH, Hung CH, Lee CM, Hu TH, Wang JH, Wang JC, et al. Pre-S Deletion and Complex Mutations of Hepatitis B Virus Related to Advanced Liver Disease in HBeAg-Negative Patients. *Gastroenterology*. 2007;133(5):1466–74.
 150. Ling R, Mutimer D, Ahmed M, Boxall EH, Elias E, Dusheiko GM, et al. Selection of mutations in the hepatitis B virus polymerase during therapy of transplant recipients with lamivudine. *Hepatology*. 1996 Sep;24(3):711–3.
 151. Tipples GA, Ma MM, Fischer KP, Bain VG, Kneteman NM, Tyrrell DL. Mutation in HBV RNA-dependent DNA polymerase confers resistance to lamivudine in vivo. *Hepatology*. 1996 Sep;24(3):714–7.
 152. Walsh AW, Langley DR, Colonno RJ, Tenney DJ. Mechanistic characterization and molecular modeling of hepatitis B virus polymerase resistance to entecavir. *PLoS One*. 2010;5(2):e9195.
 153. Brunelle MN, Jacquard AC, Pichoud C, Durantel D, Carrouée-Durantel S, Villeneuve JP, et al. Susceptibility to antivirals of a human HBV strain with mutations conferring resistance to both lamivudine and adefovir. *Hepatology*. 2005;41(6):1391–8.
 154. Paik Y-H, Han K-H, Hong SP, Lee HW, Lee KS, Kim S-O, et al. The clinical impact of early detection of the YMDD mutant on the outcomes of long-term lamivudine therapy in patients with chronic hepatitis B. *Antivir Ther*. 2006;11(4):447–55.
 155. Sharon A, Chu CK. Understanding the Molecular Basis of HBV Drug Resistance by Molecular Modeling. *Antiviral Res*. 2008 Dec;80:339–53.
 156. He X, Wang F, Huang B, Chen P, Zhong L. Detection and analysis of resistance mutations of hepatitis B virus. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(6):9630–9.
 157. Lok AS, Zoulim F, Locarnini S, Bartholomeusz A, Ghany MG, Pawlotsky J-M, et al. Antiviral Drug-Resistant HBV: Standardization of Nomenclature and Assays and Recommendations for Management and the Hepatitis B Virus Drug Resistance Working Group. *Hepatology*. 2007;46(1).
 158. Valsamakis A. Molecular testing in the diagnosis and management of chronic hepatitis B. *Clin Microbiol Rev*. 2007 Jul;20(3):426–39, table of contents.
 159. Terrault NA, Bzowej NH, Chang K-M, Hwang JP, Jonas MM, Murad MH. AASLD guidelines for treatment of chronic hepatitis B. *Hepatology*. 2016 Jan;63(1):261–83.
 160. Ministerio de Salud y Protección Social. Guía de Práctica Clínica Diagnóstico y tratamiento de Hepatitis B crónica Adopción Sistema General de Seguridad. 2016;(56).
 161. Invitrogen. PureLink ® Viral RNA / DNA Kits For rapid , efficient purification of viral nucleic acids. Life technologies; 2015.
 162. Sayan M, Şentürk Ö, Akhan SÇ, Hülal S, Çekmen MB, Şentürk O, et al. Monitoring of hepatitis B virus surface antigen escape mutations and concomitantly nucleos(t)ide analog resistance mutations in Turkish patients with chronic hepatitis B. *Int J Infect Dis*. 2010 Sep 9;14(SUPPL. 3):136–41.
 163. Sugauchi F, Mizokami M, Orito E, Ohno T, Kato H, Suzuki S, et al. A novel variant genotype C of hepatitis B virus identified in isolates from Australian Aborigines : complete genome sequence and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol*. 2001;82:883–92.
 164. Santorum JM, Darriba D, Taboada GL, Posada D. jmodeltest.org: selection of nucleotide substitution models on the cloud. *Bioinformatics*. 2014 May

- 1;30(9):1310–1.
165. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013 Dec;30(12):2725–9.
166. Obermeier M, Pironti A, Berg T, Braun P, Däumer M, Eberle J, et al. HIV-GRADE: A Publicly Available, Rules-Based Drug Resistance Interpretation Algorithm Integrating Bioinformatic Knowledge. *Intervirology.* 2012;55(2):102–7.
167. Liu TF, Shafer RW. Web resources for HIV type 1 genotypic-resistance test interpretation. *Clin Infect Dis.* 2006 Jun 1;42(11):1608–18.
168. Kim DY, Chang HY, Lim SM, Kim SU, Park JY, Kim JK, et al. Quasispecies and pre-existing drug-resistant mutations of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B. *Gut Liver.* 2013;7(3):329–34.
169. Abbas Z, Elewaut A, Ferenci P, Isakov V, Khan AG, Lim SG, et al. Guía Mundial de la Organización Mundial de Gastroenterología: Hepatitis B. 2015.
170. Raimondo G, Allain J-P, Brunetto MR, Buendia M-A, Chen D-S, Colombo M, et al. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 2008 Oct;49(4):652–7.
171. Hu K-Q. Occult hepatitis B virus infection and its clinical implications. *J Viral Hepat.* 2002;9(4):243–57.
172. Ospina ML, Martínez M, Pacheco O, Bonilla H. Protocolo de Vigilancia en Salud Pública: Hepatitis B, C Y coinfección Hepatitis B-Delta. Bogotá; 2016.
173. Beltrán M, Berrío-Pérez M, Bermúdez MI, Rey-Benito G, Camacho B, Forero P, et al. Detección de hepatitis B oculta en donantes de bancos sangre , Colombia 2008-2009. *Biomédica.* 2011;31:580–9.
174. Espinal C. Perfil epidemiológico de la hepatitis B y D en Colombia. *Biomedica.* 1998;18(3): 223.
175. Buitrago B, Hadler SC, Popper H, Thung SN, Gerber MA, Purcell RH, et al. Epidemiologic aspects of Santa Marta hepatitis over a 40-year period. *Hepatology.* 1986;6(6):1292–6.
176. Di Filippo Villa D, Cortes-Mancera F, Payares E, Montes N, De La Hoz F, Arbelaez M-PP, et al. Hepatitis D virus and hepatitis B virus infection in Amerindian communities of the Amazonas state, Colombia. *Virol J.* 2011;12.
177. Padilla JC, Arriaga AL, Arriaga AL. Hepatitis A, B y D en Chocó. *Biomédica.* 1997 Dec 1;17(4):286.
178. Michel M-L, Tiollais P. Hepatitis B vaccines: protective efficacy and therapeutic potential. *Pathol Biol (Paris).* 2010;58(4):288–95.
179. Livingston SE, Simonetti JP, McMahon BJ, Bulkow LR, Hurlburt KJ, Homan CE, et al. Hepatitis B Virus Genotypes in Alaska Native People with Hepatocellular Carcinoma: Preponderance of Genotype F. *J Infect Dis.* 2007 Jan;195(1):5–11.
180. Matsuura K, Tanaka Y, Hige S, Yamada G, Murawaki Y, Komatsu M, et al. Distribution of hepatitis B virus genotypes among patients with chronic infection in Japan shifting toward an increase of genotype A. *J Clin Microbiol.* 2009;47(5):1476–83.
181. Tong S, Revill P. Overview of viral replication and genetic variability. *J Hepatol.* 2016;64.
182. Mohanty K. The first case of criminalization of transmission of hepatitis B in the UK: defendant sentenced to two years' imprisonment on the grounds of hepatitis B deoxyribonucleic acid sequencing. *Int J STD AIDS.* 2009;20(8):667.
183. Tolosa Pérez N, Cuéllar Espitia C, Quijada Bonilla H, Peláez D, Usme Ciro JA. Estudio de conglomerado de casos de hepatitis B en el Establecimiento Penitenciario de Mediana y AltaSeguridad (EPMAS) “Doña Juana”, municipio La

- Dorada (Caldas), año 2014. IQEN - Inf Quinc Epidemiológico Nac. 2016;21(6):216–37.
184. Jazayeri S-M, Alavian S-M, Carman WF. Hepatitis B virus: Origin and evolution. *J Viral Hepat.* 2010;17(4):229–35.
 185. Miller R, Kaneko S, Chung CT, Girones R, Purcell RH. Compact organization of the hepatitis B virus genome. *Hepatology.* 1989;9(2):322–7.
 186. Ganem D, Prince AM. Hepatitis B Virus Infection — Natural History and Clinical Consequences. *N Engl J Med.* 2004 Mar 11;350(11):111–21.
 187. Girones R, Miller RH. Mutation rate of the hepadnavirus genome. *Virology.* 1989;170(2):595–7.
 188. Baumert T, Thimme R, von Weizsäcker F. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol.* 2007;3(13 (1)):82–90.
 189. Cao G-W. Clinical relevance and public health significance of hepatitis B virus genomic variations. *World J Gastroenterol.* 2009 Dec 14;15(46):5761–9.
 190. Pollicino T, Amaddeo G, Restuccia A, Raffa G, Alibrandi A, Cutroneo G, et al. Impact of hepatitis B virus (HBV) preS/S genomic variability on HBV surface antigen and HBV DNA serum levels. *Hepatology.* 2012 Aug;56(2):434–43.
 191. Huang C-H, Yuan Q, Chen P-J, Zhang Y-L, Chen C-R, Zheng Q-B, et al. Influence of mutations in hepatitis B virus surface protein on viral antigenicity and phenotype in occult HBV strains from blood donors. *J Hepatol.* 2012 Oct 1;57(4):720–9.
 192. Zhang D, Dong P, Zhang K, Deng L, Bach C, Chen W, et al. Whole genome HBV deletion profiles and the accumulation of preS deletion mutant during antiviral treatment. *BMC Microbiol.* 2012 Dec 28;12(1):307.
 193. Santantonio T, Jung MC, Schneider R, Fernholz D, Milella M, Monno L, et al. Hepatitis B virus genomes that cannot synthesize pre-S2 proteins occur frequently and as dominant virus populations in chronic carriers in Italy. *Virology.* 1992 Jun;188(2):948–52.
 194. Huy TT-T, Ushijima H, Win KM, Luengrojanakul P, Shrestha PK, Zhong Z-H, et al. High prevalence of hepatitis B virus pre-s mutant in countries where it is endemic and its relationship with genotype and chronicity. *J Clin Microbiol.* 2003 Dec;41(12):5449–55.
 195. Lee S-A, Kim K-J, Kim H, Choi W-H, Won Y-S, Kim B-J, et al. Hepatitis B virus preS1 deletion is related to viral replication increase and disease progression. *World J Gastroenterol.* 2015;21(16):5039–48.
 196. Toan NL, Song LH, Kremsner PG, Duy DN, Binh VQ, Koeberlein B, et al. Impact of the hepatitis B virus genotype and genotype mixtures on the course of liver disease in Vietnam. *Hepatology.* 2006;43(6):1375–84.
 197. Hannoun C, Krogsgaard K, Horal P, Lindh M. Genotype Mixtures of Hepatitis B Virus in Patients Treated with Interferon. *J Infect Dis.* 2002 Sep 15;186(6):752–9.