

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**ANÁLISIS METODOLÓGICO EN LA
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL VIRUS DE LA
HEPATITIS B: GENOTIPADO Y DETECCIÓN DE
RESISTENCIAS AL TRATAMIENTO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Sonia María Rodríguez Nóvoa

Bajo la dirección del Doctor:

Antonio Aguilera Guirao
Benito José Regueiro García
José Prieto Prieto

Madrid, 2003

ISBN: 84-669-1716-0



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS. DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA III

**ANÁLISIS METODOLÓGICO EN LA CARACTERIZACIÓN
MOLECULAR DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B: GENOTIPADO
Y DETECCIÓN DE RESISTENCIAS AL TRATAMIENTO.**

Memoria presentada por la Licenciada Dña. Sonia M^a Rodríguez Nóvoa para
optar al Grado de Doctor en Biología.



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS. DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA III

ANTONIO AGUILERA GUIRAO, Facultativo Especialista en Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, BENITO JOSÉ REGUEIRO GARCÍA, Catedrático del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela y JOSE PRIETO PRIETO, Catedrático de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICAN:

Que la presente memoria titulada: “Análisis metodológico en la caracterización molecular del virus de la hepatitis B: genotipado y detección de resistencias al tratamiento” ha sido realizada bajo nuestra dirección por Dña. Sonia M^a Rodríguez Nóvoa en el Servicio de Microbiología-Virología del Hospital Provincial de Conxo, CHUS y, estimando que se encuentra finalizada y en condiciones de optar al grado de Doctor en Biología, solicita sea admitida a trámite para su lectura y defensa pública.

Santiago de Compostela, a....de....de 2003.

Dr. Antonio Aguilera Guirao

Prof. Dr. Benito Regueiro García

Prof. Dr. Jose Prieto Prieto

Dra Josefina Rodríguez De Lecea

Este trabajo se ha realizado en el marco del proyecto de investigación titulado “Epidemiología molecular del virus de la hepatitis B” financiado por la *Consellería da Presidencia e Administración Pública* a través de la *Secretaría Xeral de Investigación y Desenvolvemento* y la presidencia del *Servicio Galego de Saúde* (PGIDT01SAN00002PR).

Agradecimientos:

A mis directores: Antonio Aguilera, por el planteamiento de este trabajo y por su inestimable ayuda. A Benito Regueiro por su confianza y apoyo. A Jose Prieto por mis comienzos.

A Francisco Javier Gude, Antonio Gómez Tato y Javier Castroagudín.

A mis compañeros del Laboratorio de Microbiología: a Dolores, Marisa, Mercedes, M^a José, Alicia, Eduardo, Tomás y Lourdes; a Petel, Marisa, Esperanza e Isabel; a Ramonita, Chari y Elvira.

A mis compañeras del Laboratorio Central del Hospital Clínico: Viki y Lorena.

Mi más sincero y cariñoso agradecimiento:

A mi padre Abelardo y a mi madre Elisa que ya no nos acompaña, por su
confianza y apoyo en todo momento.

A mis hermanos Jose, María y Susi, por su comprensión. A Auria.

A mis sobrinitos Artai e Ismael.

A Marina y a Javier.

A Mónica, Carlos y Javi.

A mis amigas por su paciencia : Rosa, Sita, Carmen y Ana.

Y sobre todo, a Fran.

ABREVIATURAS

AC: anticuerpo.

BCP: promotor básico del core.

BSA: albúmina sérica bovina.

DR: repeticiones directas.

ESLD: estadio terminal de enfermedad hepática.

HCC: hepatocarcinoma.

INF: interferón.

Kb: Kilobase.

NCBI: National Center for Biotechnology Information.

ng: nanogramos.

nm: nanómetro.

nt: nucleótido.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

pb: pares de bases.

RFLP: polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción.

URS: secuencia reguladora corriente arriba.

μL: microlitros.

VDHB: virus de la hepatitis B de pato.

VHB: virus de la hepatitis B.

INDICE

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	23
1. EL VIRUS DE LA HEPATITIS B (VHB)	23
1.1 CLASIFICACIÓN	23
1.2 ESTRUCTURA DEL VIRIÓN	25
1.2.1 EL GENOMA VIRAL.....	26
1.2.2 PROTEÍNAS VIRALES	29
1.2.2.1 <i>Productos del gen S</i>	29
1.2.2.2 <i>Productos del gen C</i>	29
1.2.2.3 <i>Productos del gen P</i>	31
1.2.2.4 <i>Producto del gen X</i>	31
1.2.3 REPLICACIÓN VIRAL	31
1.2.3.1 <i>Unión y entrada del virus a las células</i>	31
1.2.3.2 <i>Transcripción</i>	32
1.2.3.3 <i>Traducción</i>	33
1.2.3.4 <i>Replicación del genoma</i>	33
1.2.3.5 <i>Otras formas intracelulares del genoma viral</i>	35
1.2.3.6 <i>Ensamblaje y liberación de las partículas virales</i>	36
1.3 VARIETADES GENÓMICAS DEL VHB Y SU SIGNIFICADO	37
1.3.1 GENERACIÓN DE VARIANTES DEL VHB.....	37
1.3.2 VARIANTES	38
1.3.2.1 <i>Variantes con mutaciones en la región pre-core</i>	38
1.3.2.1.1 Biosíntesis del Ag-HBe y del Ag-HBc	38
1.3.2.1.2 Variantes con mutaciones en la región pre-core que impiden la síntesis de Ag-HBe. 39	
1.3.2.1.3 Mutación pre-core codón de parada.....	40
1.3.2.1.4 Mutaciones que alteran el marco de lectura	42
1.3.2.1.5 Mutaciones en el codón de inicio de pre-core	42
1.3.2.1.6 Implicaciones clínicas de las mutaciones en la región precore.	42
1.3.2.2 <i>Variantes con mutaciones en el gen C</i>	43
1.3.2.2.1 Variantes del promotor del core.....	44
1.3.2.3 <i>Variantes que cambian la estructura y función de la proteína X</i>	44
1.3.2.4 <i>Variantes del gen S</i>	45
1.3.2.4.1 Variantes con deleciones en la región pre-S1	45
1.3.2.4.2 Variantes con deleciones en la región pre-S2	46
1.3.2.4.3 Variantes defectivas en la expresión de la proteína pre-S2.	46
1.3.2.4.4 Variantes con mutaciones en el determinante "a".	46
1.3.2.5 <i>Mutaciones que alteran la estructura y función de la proteína P</i>	47
1.3.3 SEROTIPOS DEL VHB.....	48
1.3.4 GENOTIPOS DEL VHB	49
2. LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS B	52
2.1 PATOGÉNESIS Y PATOLOGÍA POR EL VHB	52
2.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA INFECCIÓN POR EL VHB	54
2.2.1 HEPATITIS AGUDA POR VHB	54
2.2.2 HEPATITIS CRÓNICA POR VHB.....	55
2.2.2.1 <i>Hepatitis crónica Ag-HBe positiva</i>	56
2.2.2.2 <i>Hepatitis crónica anti-HBe positiva</i>	58
3. PRUEBAS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN POR VHB E INTERPRETACIÓN	60

3.1	MARCADORES DE LA INFECCIÓN POR EL VHB.....	60
3.2	EVOLUCIÓN SEROLÓGICA DE LA HEPATITIS AGUDA Y CRÓNICA.....	63
4.	TRATAMIENTO	64
4.1	INTERFERÓN (INF).....	65
4.2	LAMIVUDINA (3TC).....	66
4.3	FAMCICLOVIR	67
4.4	ADEFOVIR.....	67
4.5	EMTRICITABINA Y CLEVUDINA	67
5.	RESISTENCIA DEL VHB AL TRATAMIENTO CON ANTIVIRALES	69
5.1	DEFINICIÓN DE RESISTENCIA	69
5.2	BASES MOLECULARES.....	70
5.3	DINÁMICA DE LAS MUTACIONES	71
6.	MÉTODOS DE ANÁLISIS MOLECULAR DEL VHB	72
6.1	MÉTODOS EMPLEADOS PARA EL GENOTIPADO DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B BASADOS EN EL ANÁLISIS DEL GENOMA.	72
6.1.1	SECUENCIACIÓN DIRECTA DE UNA PARTE O DE LA TOTALIDAD DEL GENOMA.	72
6.1.2	ANÁLISIS BASADOS EN LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA-POLIMORFISMOS DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (PCR-RFLP).	74
6.1.3	ANÁLISIS MEDIANTE AMPLIFICACIÓN CON CEBADORES ESPECÍFICOS DE GENOTIPO.....	76
6.1.4	ENSAYOS DE HIBRIDACIÓN CON SONDAS	76
6.2	OTROS MÉTODOS DE GENOTIPADO	76
6.2.1	DETECCIÓN SEROLÓGICA DE GENOTIPOS DEL VHB.....	76
6.3	MÉTODOS EMPLEADOS PARA LA DETECCIÓN DE MUTACIONES QUE CONFIEREN RESISTENCIA AL TRATAMIENTO CON ANTIVIRALES.....	76
6.3.1	SECUENCIACIÓN	76
6.3.2	AMPLIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (PCR-RFLP).....	77
6.3.3	HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.	77
6.3.4	CHIP DE ADN.....	77
7.	EPIDEMIOLOGÍA	78
II.	OBJETIVOS	87
III.	MATERIAL Y MÉTODOS	93
1.	PACIENTES:.....	93
2.	MATERIALES Y MÉTODOS	94
2.1	MATERIALES COMUNES EMPLEADOS EN LAS TÉCNICAS DE GENOTIPADO Y DETECCIÓN DE RESISTENCIAS:.....	94
2.2	METODOLOGÍA EMPLEADA EN EL GENOTIPADO DEL VHB	96
2.2.1	GENOTIPADO DEL VHB BASADO EN AMPLIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (PCR-RFLP).....	96

2.2.2	MÉTODO DE GENOTIPADO BASADO EN PCR ESPECÍFICA DE GENOTIPO.....	103
2.2.3	SISTEMA DE GENOTIPADO BASADO EN EL ANÁLISIS MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE PARTE DEL GEN QUE CODIFICA LA POLIMERASA DEL VIRUS.....	107
2.2.4	GENOTIPADO DEL VHB MEDIANTE HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.	114
2.2.5	SECUENCIACIÓN DEL GEN DE SUPERFICIE:.....	115
2.2.6	COMPROBACIÓN DEL GENOTIPO G MEDIANTE HEMI-NESTED PCR.....	118
2.3	METODOLOGÍA EMPLEADA EN EL ESTUDIO DE RESISTENCIAS AL TRATAMIENTO CON LAMIVUDINA:.....	119
2.3.1	SECUENCIACIÓN.....	119
2.3.2	INNOLIPA-HBV DR.	120
2.4	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	123
IV.	RESULTADOS	129
1.	GENOTIPADO DEL VHB	129
1.1	DESCRIPCIÓN DE LOS RESULTADOS DE GENOTIPADO OBTENIDOS POR LOS DISTINTOS MÉTODOS.	129
1.1.1	GENOTIPADO DEL VHB MEDIANTE RFLP	129
1.1.2	GENOTIPADO MEDIANTE PCR ESPECÍFICA.	135
1.1.3	SISTEMA DE GENOTIPADO BASADO EN EL ANÁLISIS POR SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN QUE INCLUYE EL MOTIVO YMDD DEL GEN DE LA POLIMERASA.	138
1.1.4	SISTEMA DE GENOTIPADO BASADO EN HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.	147
1.2	COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE GENOTIPADO.....	148
1.3	PREVALENCIA DE GENOTIPOS DEL VHB.....	151
1.3.1	PREVALENCIA TOTAL DE GENOTIPOS	151
1.3.2	PREVALENCIA DE GENOTIPOS EN BASE A LA SITUACIÓN SEROLÓGICA AG-HBE/ANTI-HBE.	152
1.3.3	PREVALENCIA DE GENOTIPOS POR SEXO.....	154
2.	DETECCIÓN DE RESISTENCIAS AL TRATAMIENTO CON LAMIVUDINA.....	156
2.1	SENSIBILIDAD DEL MÉTODO	156
2.2	COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS DE LIPA Y SECUENCIACIÓN.	156
2.2.1	RESULTADOS OBTENIDOS EMPLEANDO EL SISTEMA LIPA.....	157
2.2.2	RESULTADOS OBTENIDOS POR SECUENCIACIÓN	158
2.2.3	COMPARACIÓN DE LOS SISTEMAS DE DETECCIÓN DE RESISTENCIAS LIPA Y SECUENCIACIÓN.	159
2.3	DIVERGENCIAS NUCLEOTÍDICAS Y AMINOACÍDICAS EN LA REGIÓN DE LA POLIMERASA IMPLICADA EN LA RESISTENCIA AL TRATAMIENTO CON LAMIVUDINA.	162
V.	DISCUSION.....	169
1.	MÉTODOS DE GENOTIPADO DEL VHB.	169
1.1	MÉTODO BASADO EN PCR-RFLP.....	169
1.2	MÉTODO BASADO EN PCR ESPECÍFICA.....	171
1.3	MÉTODO BASADO EN SECUENCIACIÓN.....	171
1.4	MÉTODO BASADO EN LIPA	173
2.	PREVALENCIA DE GENOTIPOS DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B	176

3. RESISTENCIAS	179
VI. CONCLUSIONES	187
VII. BIBLIOGRAFÍA	195
VIII. ANEXOS	219

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. EL VIRUS DE LA HEPATITIS B (VHB)

Blumberg descubrió que una muestra de suero de un aborigen australiano contenía un antígeno que reaccionaba específicamente con un anticuerpo del suero de un paciente americano hemofílico. Estudios posteriores muestran que este "antígeno australiano (Au)" era relativamente raro en el Norte de América y Europa del Este pero prevalente en algunas poblaciones de África y Asia y entre pacientes con leucemia, lepra lepromatosa y síndrome de Down (Blumberg et al., 1967). En 1968 se estableció que el "antígeno Au" se encontraba específicamente en el suero de pacientes con hepatitis B (Prince et al., 1968; Okochi et al., 1968). Posteriormente se demostró la asociación del antígeno Australiano con la hepatitis B y se desarrollaron test específicos para la identificación de la infección por el VHB (Prince et al., 1982).

En 1970 se detectó el virión completo de la hepatitis B, una partícula de 42 nm de doble envuelta que consiste en una cubierta externa de 7 nm y un core interno de 27 nm llamada partícula de Dane (Dane et al., 1970). La nucleocápside contiene el antígeno core de la hepatitis B (Ag-HBc), un genoma de ADN pequeño, circular y parcialmente de doble cadena y una ADN polimerasa endógena. Al componente de superficie de la partícula de 42 nm se le llamó antígeno de superficie de la hepatitis B (Ag-HBs). En un principio, la presencia de Ag-HBs y de anticuerpos contra el Ag-HBs y el Ag-HBc se usó para clasificar a los pacientes que tenían infección aguda o crónica. Un tercer antígeno relacionado con la infectividad, el antígeno "e" (Ag-HBe) fue descrito por Magnius y Espmark en 1972 (Magnius et al., 1972).

1.1 CLASIFICACIÓN

En el momento actual el virus de la hepatitis B se clasifica dentro del grupo de los Hepadnavirus, junto a los virus de las hepatitis de la marmota americana, virus de la hepatitis de la ardilla y virus de la hepatitis del pato. Entre ellos existen caracteres ultraestructurales, antigénicos y del ADN marcadamente afines, así como fenómenos

biológicos comunes, tales como el hepatotropismo. Estos virus dan lugar a infecciones persistentes con concentraciones de virus muy altas y partículas incompletas en la sangre de los infectados.

Los hepadnavirus de mamíferos y de aves representan dos grupos separados o géneros separados dentro de los hepadnavirus debido a la existencia de diferencias en la homología entre secuencias.

Los hepadnavirus están filogenéticamente relacionados con miembros de otras dos familias de virus: virus del mosaico de la coliflor y Retroviridae y elementos transponibles relacionados.

Clasificación de la Familia Hepadnaviridae:

- Avihepadnavirus (virus de las hepatitis aviarias)
- Orthohepadnavirus (virus de la hepatitis B de mamíferos)
 - virus de la hepatitis de la ardilla
 - virus de la hepatitis de la ardilla / virus de la hepatitis de la marmota recombinante
 - Hepatitis B virus
 - Hepatitis B virus (STRAIN ALPHA1)
 - Hepatitis B virus (cepa LSH / aislado chimpanzé)
 - Hepatitis B virus subtipo ad
 - Hepatitis B virus subtipo adr
 - Hepatitis B virus subtipo adw
 - Hepatitis B virus subtipo adyw
 - Hepatitis B virus subtipo ar
 - Hepatitis B virus subtipo ayw
 - Hepatitis B virus 2
 - Hepadnavirus del Orangután
 - Virus de la hepatitis de la marmota
 - Virus de la hepatitis de la marmota 1
 - Virus de la hepatitis de la marmota 59
 - Virus de la hepatitis de la marmota 7
 - Virus de la hepatitis de la marmota 8
 - Virus de la hepatitis de la marmota 8 (clon infeccioso)
 - Virus de la hepatitis de la marmota w64 (aislado PWS23)

1.2 ESTRUCTURA DEL VIRIÓN

Los viriones son partículas esféricas de aproximadamente 42-47 nm de diámetro, estos viriones exhiben un core interno electrodensito de aproximadamente 22-25 nm de diámetro y una cubierta externa o envoltura de aproximadamente 7 nm de grosor. La envuelta lipídica contiene el antígeno viral de superficie (Ag-HBs) contra el cual se dirigen los anticuerpos neutralizantes del virus. Las partículas esféricas de 20 nm de diámetro que contienen el antígeno viral del core (Ag-HBc), el antígeno viral “e” (Ag-HBe), el ADN viral, la actividad ADN polimerasa y una actividad proteinkinasa que fosforila el polipéptido mayor del core del virión.

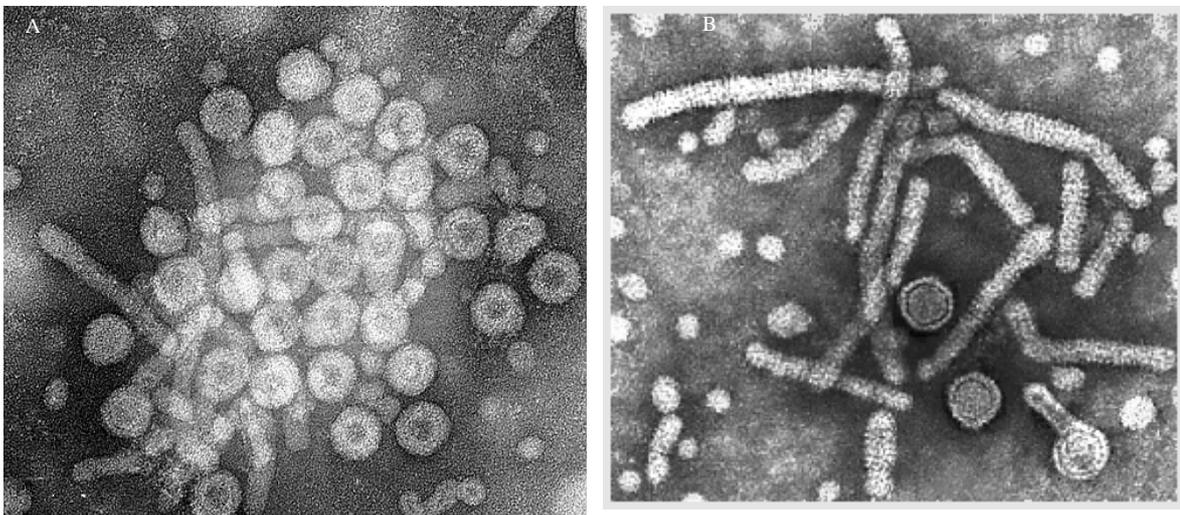


Figura 1. Micrografía electrónica del VHB después de tinción negativa. Se observan las tres formas morfológicas del virus: partículas esféricas de 20 a 22 nm de diámetro (A); formas tubulares; virus con la doble envuelta de 42 nm de diámetro (B).

1.2.1 EL GENOMA VIRAL

El virus de la hepatitis B es el virus con material genético de ADN más pequeño. Su genoma posee un tamaño de aproximadamente 3200 pares de bases de longitud y es parcialmente de doble cadena, organizado en patrón circular (Robinson et al., 1974).

El ADN de los Hepadnavirus consiste en una cadena larga llamada también cadena negativa. La secuencia de esta cadena es complementaria del ARNm y es de longitud constante en todas las moléculas (entre 3000 y 3300 bases en diferentes hepadnavirus). La cadena corta o positiva varía en longitud de 1700 a 2800 bases en diferentes moléculas. La actividad ADN polimerasa del virión repara la región de cadena sencilla en el ADN viral para hacer moléculas completas de doble cadena (Kaplan et al., 1976; Landers et al., 1977; Marison et al., 1980; Mason et al., 1980; Summers et al., 1975; Summers et al., 1978).

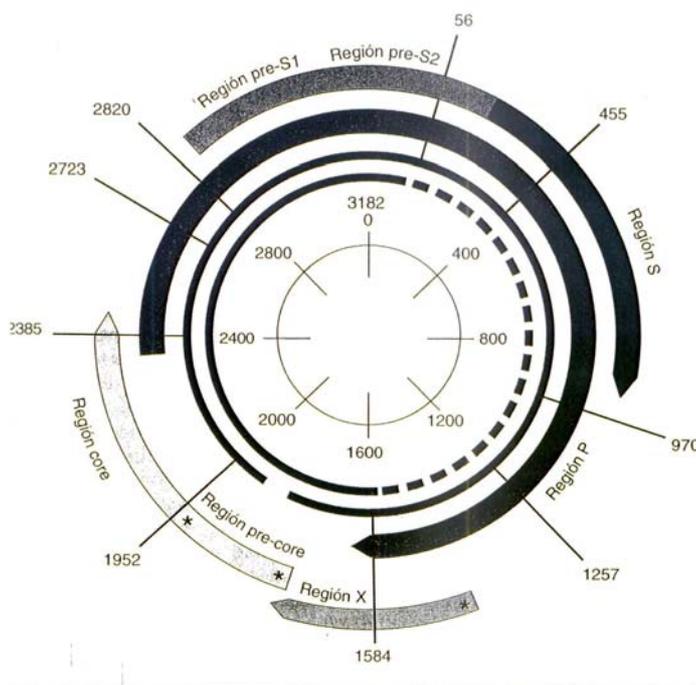


Figura 2. Representación esquemática de las pautas de lectura abiertas del VHB.

La cadena negativa no es un círculo cerrado, posee una mella en un sitio a 225 pb del 5' terminal de la cadena positiva en virus de mamíferos (Sattler et al., 1979; Seeger et al., 1986; Siddiqui et al., 1979; Molnar-Kimber et al., 1984). Existe un polipéptido covalentemente unido al extremo 5' de la cadena negativa del ADN del

VHB, y existen evidencias que indican que esta proteína funciona como cebador para la síntesis de esta cadena de ADN (Lien et al., 1986).

En el extremo 5' de la cadena positiva existe un fragmento de ARN covalentemente unido de 19 nucleótidos, este fragmento funciona como cebador para la síntesis de esta cadena (Lien et al., 1986; Seeger et al., 1986). La estructura inusual y asimétrica de ADN viral de estos virus da lugar a una estrategia especial de replicación del ADN y consiguiente empaquetamiento en viriones. Estos viriones se liberan de las células con moléculas de ADN incompletamente replicadas que consisten en cadenas negativas completas (que es la primera cadena que se sintetiza) y unas cadenas positivas variablemente completas, con el cebador para cada cadena que permanece covalentemente unido al extremo 5' respectivo.

El virus de la hepatitis B posee cuatro marcos de lectura abiertos en la cadena de ADN larga o negativa y estos tienen similares localizaciones en cada virus con respecto a los extremos cohesivos de los ADN. Los genes solapados se traducen en diferentes marcos de lectura. Estos marcos de lectura abiertos se corresponden con los cuatro genes:

- *Gen S* que codifica para la proteína de superficie.
- *Gen C* que codifica la proteína core.
- *Gen P* que codifica para la ADN polimerasa viral.
- *Gen X* que codifica la proteína X.

El gen C codifica la proteína principal viral o polipéptido de la nucleocápside de 21.000 dalton (Ag-HBc) y el polipéptido de 16.000 dalton con especificidad de Ag-HBe. Este marco abierto de lectura incluye una corta secuencia pre-C (precore).

El gen S, que incluye las regiones pre-S1, pre-S2 y S, con tres codones de iniciación, codifica los polipéptidos del antígeno de superficie de la envuelta del virión y formas virales incompletas (partículas antigénicas de superficie) encontradas en el suero e hígado de individuos infectados. Las tres regiones juntas codifican la proteína pre-S1, la región pre-S2 y S codifican la proteína pre-S2 y la región S codifica la proteína S. Estas proteínas consisten en formas glicosiladas y no glicosiladas de tres polipéptidos de 39.000, 33.000 y 24.000 dalton respectivamente. El promotor de pre-S1, situado corriente arriba del gen S, dirige la síntesis del ARNm de pre-S1. La transcripción de los ARNm de pre-S2 y de S está dirigida por el promotor de S

localizado dentro de la región pre-S1. La región pre-S solapa con el dominio espaciador del gen de la polimerasa, el cual es indispensable para la función de la proteína P y la región S con el dominio esencial de la reverso transcriptasa (Radziwill et al., 1990).

El gen P, abarca las tres cuartas partes del genoma y se solapa con la región C-terminal del gen C, con el gen S entero y con la porción amino-terminal del gen X, codificando un polipéptido de aproximadamente 90.000 daltons. Hay evidencias que sugieren que esta proteína contiene la actividad ADN polimerasa asociada al virión (o reversotranscriptasa) y la proteína cebadora para la síntesis de la cadena negativa del ADN (Bavand et al., 1989; Mandart et al., 1984; Miller et al., 1986; Toh et al., 1983; Yaginuma et al., 1987).

El gen X codifica un polipéptido de 154 aminoácidos que posee actividad transactivadora y una otras funciones reguladoras (Scheck et al., 1991).

Existen otros elementos funcionalmente importantes en el genoma de los hepadnavirus. Entre ellos destaca una secuencia de repeticiones directas de 11 pares de bases denominadas DR1 y DR2, las cuales parece que juegan un papel en la replicación del ADN. El 5' terminal de la cadena negativa del ADN está en el DR1 y el 5' terminal de la cadena positiva en el límite 3' del DR2 (Molnar-Kimber et al., 1984; Seeger et al., 1986).

En el genoma de los hepadnavirus existen cuatro elementos promotores uno de ellos se llama promotor de pre-S1, situado corriente arriba del codón de iniciación de pre-S1 y puede iniciar la síntesis de un mensajero de 2,4 kb de una proteína que contiene pre-S1, pre-S2 y S. Otro elemento promotor denominado promotor pre-S2, dentro de la región pre-S1 que dirige la síntesis de un transcrito de 2,1 kb que probablemente funcione como mensajero de polipéptidos especificados por el gen pre-S2 y gen S. Ambos se encuentran en la secuencia codificada por el gen P, y su acción no parece ser específica de célula o tejido. El promotor C se encuentra situado corriente arriba del codón de iniciación del gen C, dentro de la región codificadora del gen X y dirige la síntesis de un ARN transcrito de longitud más grande que el genoma (3,5 kb). Este transcrito podría funcionar como mensajero para la síntesis de los polipéptidos especificados por los genes C y P y también sirve como molde para la síntesis de la cadena negativa del ADN por reversotranscripción. Este promotor muestra

especificidad por las células hepáticas. Un cuarto elemento promotor situado corriente arriba del gen X y dentro del marco de lectura abierto de P, llamado promotor X, puede dirigir la síntesis de transcritos menores que funcionan como mensajeros del gen X.

Se ha localizado un elemento exaltador a 450 bp corriente arriba del promotor del gen C.

1.2.2 PROTEÍNAS VIRALES

1.2.2.1 Productos del gen S.

El antígeno superficial de la hepatitis B (Ag-HBs) aparece en el citoplasma del hepatocito y pasa al suero en tres formas diferentes (partículas esféricas, tubulares y de Dane). Corresponde al antiguamente llamado antígeno Australia. Se presenta muy precozmente en el suero, señal evidente de la infección, y desaparece o no, según la evolución del cuadro. Es un componente proteico, con nueve polipéptidos, que contiene fosfolípidos (22-30%) y carbohidratos (3-7%). Su peso molecular es de $3,5-4,5 \times 10^6$. Se ha identificado completamente la secuencia de 226 aminoácidos del polipéptido principal, que posee todas las propiedades inmunógenas, siendo codificado por el gen S; existe en dos formas, glicosilada (GP27) y no glicosilada (P24). La proteína media posee 281 aminoácidos y es codificada por las regiones S y pre-S2; tiene dos formas glicosiladas (GP33 y GP36). La proteína grande, codificada por las regiones pre-S1, pre-S2 y S, también presenta una forma glicosilada (GP42) y otra no glicosilada (P39). Un virión contiene 300-400 moléculas de proteína principal y 40-80 de las proteínas mediana y grande.

1.2.2.2 Productos del gen C

El Ag-HBc y el Ag-HBe son especificidades antigénicas diferentes de la proteína codificada por el gen C.

En el core de viriones altamente purificados y en derivados de hígado infectado por el VHB se ha encontrado este polipéptido (Ag-HBc) de forma predominante, con un tamaño de 22 kd y denominado p22^c y de 183-185 aminoácidos de longitud.

El Ag-HBe se descubrió en 1972 como un antígeno soluble en el suero de pacientes infectados por el VHB, y la forma sérica en el suero es física y antigénicamente diferente del antígeno de superficie y del antígeno core (Magnius et al., 1972). El Ag-HBe presente en el suero es de aproximadamente 16 kd y es una forma

truncada del p22^c en la cual se han perdido los 34 aminoácidos del extremo carboxiterminal (Galibert et al., 1979; Pasek et al., 1979). Este polipéptido (p16^c) contiene ciertos determinantes del Ag-HBc, pero se cree que están enmascarados debido a que el Ag-HBe se encuentra en el suero unido específicamente a la albúmina, α -antitripsina e inmunoglobulinas.

La especificidad antigénica del Ag-HBc depende de la conformación de la partícula intacta. Cuando p22^c se ensambla en partículas del core, los determinantes del Ag-HBe quedan enmascarados y sólo se exponen a los anticuerpos por rotura de las partículas core y liberación de las cadenas de polipéptidos.

La secuencia pre-C tiene un papel importante en el destino de los polipéptidos codificados por el gen C. La expresión de p22^c sin pre-C da lugar a la acumulación en las células de partículas semejantes al core, sugiriendo que este polipéptido tiene capacidad intrínseca para autoensamblarse en partículas con especificidad Ag-HBc y que el ácido nucleico no se requiere para este ensamblaje. La expresión de secuencias pre-C da lugar a la acumulación de la proteína en la membrana y a la secreción del polipéptido de 16 kd con especificidad Ag-HBe (Ou et al, 1986)

Por criomicroscopía electrónica se ha descubierto el plegamiento de la cadena polipeptídica de la proteína core (Böttcher et al., 1997; Conway et al., 1997). Según estos datos la proteína core posee cuatro α hélices, con las dos hélices internas formando una horquilla antiparalela. Dos monómeros de proteína core forman un dímero y de 90 a 120 dímeros ensamblados en la partícula core, junto con las horquillas de superficie expuestas, representan las espículas visibles por microscopía electrónica.

La proteína C puede dividirse en dos dominios:

- dominio de ensamblaje N-terminal
- dominio C-terminal rico en arginina, funcionalmente muy importante. Se requiere para la unión del ARN pregenómico, para la replicación del genoma y para el transporte de la proteína core al núcleo.

Parece que ambos dominios están conectados por una pequeña bisagra entre los aminoácidos de las posiciones 145 y 150 (Seifer and Standring, 1994).

1.2.2.3 Productos del gen P

El gen P codifica para la polimerasa viral que posee más 845 aminoácidos y contiene una secuencia que presenta homologías con secuencias del gen pol de los retrovirus (Toh et al., 1983). Codifica la proteína con actividad retrotranscriptasa.

Se ha sugerido que el gen P codifica para la síntesis de una proteína que actúa como cebador en la síntesis de la cadena del ADN.

1.2.2.4 Producto del gen X

El gen x codifica un polipéptido de 154 aminoácidos. Todavía no se conoce con certeza el papel de este gen pero parece que se expresa en el hígado de algunos pacientes infectados con el VHB (Moriarty et al., 1985). La única propiedad funcional que se ha visto para esta proteína x expresada en células en cultivo es la activación de un transcrito controlado por elementos exaltadores del interferón- β . La secuencia kB (secuencia de unión para el factor de transcripción celular NFkB) es una secuencia exaltadora común que regula el gen del interferón β . No se sabe si la proteína x interactúa directamente con la secuencia kB o activa un factor celular parecido a NFkB.

Se ha sugerido que es un gen esencial ya que deleciones en dicho gen, según se ha observado en otros hepadnavirus animales, bloquean la replicación. Es un transactivador de la transcripción viral y es posible que también de genes celulares.

1.2.3 REPLICACIÓN VIRAL

1.2.3.1 Unión y entrada del virus a las células

Se conoce poco sobre este proceso porque, hasta recientemente, no había sistemas de cultivo en los que se pudiese demostrar la infección de las células por el virus. Se han infectado cultivos de hígado fetal de pato con VDHB (Tuttleman et al., 1986) proporcionando un sistema importante para el estudio de la infección y replicación del VDHB. No se ha identificado el receptor de superficie del VHB requerido para la unión a las células a pesar de que se ha identificado una secuencia en la proteína pre-S1 que aparentemente está implicada en la unión del VHB a las células HepG2.

1.2.3.2 Transcripción

En tejido de hígados infectados con el VHB se han encontrado tres transcritos principales de longitudes de 3.400, 2.400 y 2.100 nucleótidos aproximadamente. Estos transcritos poseen la misma polaridad, los mismos extremos 3' y las mismas colas poli-A, pero con diferentes extremos 5' (Will et al., 1987).

El extremo 5' del transcrito de 3.4 kb se ha localizado dentro de la región pre-C, aproximadamente 6 nucleótidos corriente arriba de la secuencia DR1. Se cree que el promotor C regula la síntesis de este transcrito. El extremo 3' se localiza dentro del gen C y 120 nt corriente abajo de la posición de su extremo 5' (de este modo, tiene una redundancia terminal de 120 nt), y posee una cola de poli-A de aproximadamente 100 nt. La redundancia terminal de este transcrito indica que durante su síntesis, la ARN polimerasa II primero lee secuencias del ADN en cis que funcionan como terminadoras de la transcripción cuando esta secuencia se alcanza por segunda vez. El molde para este transcrito es el ADN circular cerrado el cual tiene una secuencia circular continua lo cual permitiría la síntesis del transcrito con una secuencia terminal repetida.

El transcrito mayor funciona como molde para la síntesis del ADN viral y sirve como mensajero para la proteína principal del core (p22) y para el producto del gen P.

El extremo 5' del transcrito de 2.4 kb del VHB, denominado transcrito pre-S1, se ha localizado a 38 nt corriente arriba del codón de iniciación de la secuencia pre-S1 (Will et al., 1987) y sirve como mensajero para la síntesis del polipéptido pre-S1 que contiene el antígeno de superficie (p39).

El extremo 5' del transcrito de 2.1 kb se encuentra en la región pre-S1, aproximadamente 17 nt corriente arriba del codón de iniciación de la secuencia pre-S2. Este transcrito, llamado transcrito pre-S2, sirve como mensajero para la síntesis de los polipéptidos pre-S2 (p31) y S (p24).

No está claro cual es el transcrito del cual se traduce la proteína X.

La primera forma detectada del ADN después de la infección es la de ADN circular cerrado y también es la única que se encuentra en el núcleo (Miller et al., 1984b) siendo el mejor candidato como molde para la transcripción viral durante la replicación del virus.

No se conocen bien los mecanismos que regulan la transcripción en los hepadnavirus, parece que existen factores celulares que la activan y es posible que

también esté implicado algún factor específico del hígado. El transcrito de 3.4 kb se expresa sólo en células de origen hepático (Will et al., 1987), mientras que el transcrito de 2.1 kb se expresa en diversas líneas celulares derivadas de tejidos no hepáticos en las cuales se había introducido ADN del VHB (Dubois et al., 1980) sugiriendo que la expresión de este transcrito no es dependiente de las células hepáticas.

Se han descrito al menos cuatro factores celulares que se unen a secuencias específicas en la región exaltadora del VHB (Ben-Levy et al., 1989). Alguno de ellos parece estar relacionado con factores de transcripción identificados en otros sistemas de transcripción y ninguno de ellos parece ser específico del hígado. La secuencia de unión de los factores por sí sola no parece que presente actividad exaltadora, sugiriéndose que se necesita más de uno para la función exaltadora.

1.2.3.3 Traducción

El Ag-HBc (p22) y el producto del gen P se traducen a partir del mismo mensajero (el transcrito de 3,4 kb), sin embargo, su marco de traducción es diferente y no está claro como se traducen en proteínas discretas o como una única proteína de fusión es dividida después en p22 y productos del gen P.

La síntesis de los polipéptidos del Ag-HBs no está bien estudiada. Los tres codones de iniciación del gen S se usan para la traducción de los tres polipéptidos con el mismo carboxi-terminal pero diferente amino-terminal (p24, p33 y p39). Se traducen como polipéptidos discretos a partir de al menos dos mensajeros solapados de tamaños diferentes de los que se habían formado por rotura de la proteína mayor. Estos polipéptidos se detectan intracelularmente.

1.2.3.4 Replicación del genoma

Después de la entrada del virus en las células hepáticas, el genoma del VHB se convierte en un ADN viral covalentemente cerrado (ADNcc), que puede detectarse en el núcleo de las células hepáticas. La conversión del ADN viral en un círculo covalentemente cerrado requiere:

- Completar la síntesis de la cadena positiva del ADN.

- Retirar la proteína cebadora de la molécula de ADN negativa y retirar el cebador oligoribonucleótido de la cadena positiva.
- Eliminar la redundancia terminal de la cadena negativa.
- Unión de los extremos del ADN.

El ADN_{cc} en el núcleo de las células hepáticas sirve como molde para la síntesis del transcrito de 3,4 kb, y este a su vez, es el molde para (a) la reversotranscripción y mensajero para la proteína estructural principal del core del virión (p22), (b) la proteína reversotranscriptasa, y (c) el polipéptido cebador para la síntesis de la cadena negativa del ADN. Por lo tanto este ARN se empaqueta en partículas víricas que contienen (a) actividad reversotranscriptasa, (b) el polipéptido cebador para la síntesis de la cadena negativa del ADN y (c) la proteína p22. La síntesis de la cadena negativa se inicia dentro de la secuencia de DR1 (Seeger et al., 1986). No se conoce el mecanismo de reconocimiento del sitio de iniciación para la síntesis de la cadena negativa del ADN, pero es posible que la proteína con actividad reversotranscriptasa o la proteína cebadora codificada por el gen pol (Bosh et al., 1988) o un único precursor de las dos, podría reconocer una secuencia apropiada de ARN dentro o cerca de DR1.

La actividad RNasa-H degrada el ARN molde según va avanzando la síntesis del ADN.

El cebador para la síntesis de la cadena positiva del ADN es un oligoribonucleótido de 19 o 20 kd con una secuencia que corresponde a aquella del fragmento 5' terminal del molde de ARN que contiene la secuencia DR1 (Seeger et al., 1986; Lien et al., 1986). La síntesis de la cadena de ADN positiva se inicia en el último nucleótido de DR2 cerca del extremo 5' del molde de la cadena de ADN negativa. Esto sugiere que el cebador oligoribonucleótido es generado a partir del 5' terminal del ARN por acción de la ribonucleasa y que el fragmento de ARN, después se disocia del extremo completo 3' de la cadena negativa de ADN recién sintetizada y es translocado al extremo 5' de la cadena negativa, donde se emparejan las bases con la secuencia DR2 en la cadena negativa para la iniciación de la síntesis de la cadena positiva en las cercanías de la secuencia DR2. Cuando el extremo 3' de la cadena positiva que se está elongando alcanza el extremo 5' del molde de ADN de cadena negativa, cambia de molde al extremo 3' de la cadena negativa formando una molécula circular. El extremo

3' de la nueva cadena positiva se disocia del extremo 5' de la cadena negativa conteniendo una secuencia complementaria de la repetición corta terminal (r) de la cadena negativa. Esta secuencia complementaria de la cadena positiva podría después emparejarse con r en el extremo 3' de la cadena negativa dando lugar a una circularización del ADN y a una colocación del extremo 3' de la cadena negativa para ser usada como molde para continuar la elongación de la cadena positiva.

El core de los Hepadnavirus se ensambla en viriones completos con Ag-HBs y envuelta que contiene lípidos de la membrana celular. En el caso del VHB, la formación de los virus y la liberación de la célula puede tener lugar en casi un paso después del ensamblaje intracelular de la partícula core. Una pequeña fracción de viriones se puede encontrar en la sangre, conteniendo moléculas híbridas de ADN-ARN (Miller et al., 1984c) o cadenas negativas completas sin asociarse a cadenas positivas (Scotto et al., 1985), aunque, la mayor parte de los viriones contienen moléculas de ADN parcialmente de cadena sencilla, con una cadena negativa completa y una cadena parcial positiva. Por otra parte, la actividad endógena de la ADN polimerasa cataliza la incorporación de nucleótidos en la cadena negativa tanto como en la cadena positiva dentro del virión, (Miller et al., 1984c; Miller et al., 1984a).

1.2.3.5 Otras formas intracelulares del genoma viral

En linfocitos de sangre de pacientes portadores crónicos se encontraron formas oligoméricas de ADN viral no integrado (Yahinuma et al., 1987), pero el origen y función de estas formas de ADN es desconocido.

En algunas células hepáticas infectadas y en muchos hepatocarcinomas se han encontrado secuencias integradas de ADN del VHB. Este ADN viral se integra en el mismo sitio en células diferentes del hígado de cada paciente infectado crónico (así, estas células tienen el mismo origen clonal), sin embargo este sitio es diferente en diferentes pacientes, y es diferente en cada nódulo regenerativo individual en el mismo hígado cirrótico. Este patrón clonal en hígados cirróticos parece estar relacionado con el origen de los nódulos regenerativos que se producen debido a la proliferación de una o de unas pocas células en el hígado (Aoki et al., 1989).

La integración de los hepadnavirus en el genoma celular es esporádica, se acumulan en el hígado durante la infección persistente y puede producir daño hepático y

degeneración; por otra parte, reordenamientos y deleciones (al menos en el hepatocarcinoma) son frecuentes en los genomas virales integrados.

1.2.3.6 Ensamblaje y liberación de las partículas virales

Las partículas virales se forman en el interior de las células y estas pueden verse por microscopía electrónica en el interior de las cisternas del retículo endoplasmático (Patzer et al., 1986). Existen evidencias de la localización transmembrana de secuencias señal de nuevos polipéptidos S sintetizados que regulan la secreción del polipéptido S y también regulan la habilidad intrínseca del polipéptido S de ensamblarse en partículas de membrana (Eble et al., 1986). El core viral adquiere la envuelta que contiene el Ag-HBs en el interior de la célula.

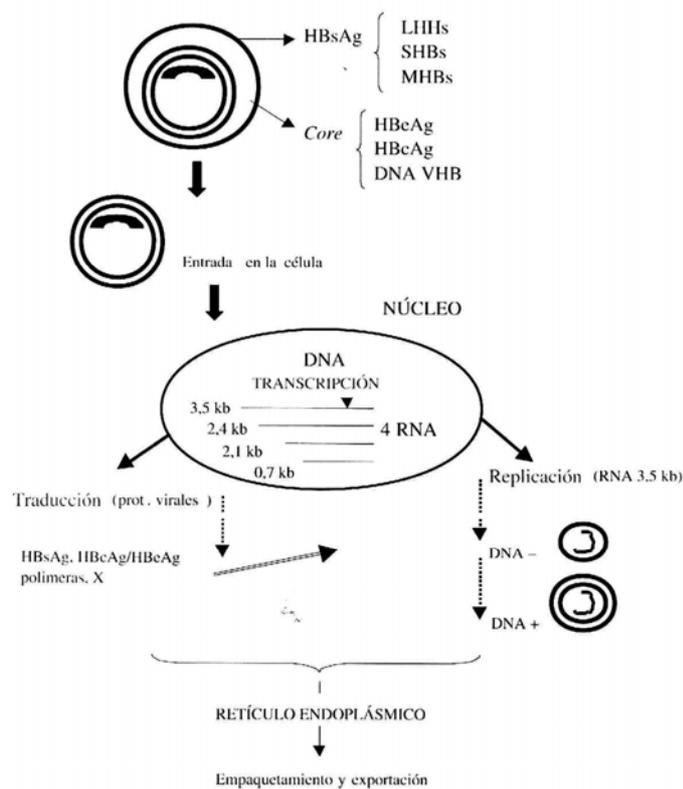


Figura 3. Esquema del ciclo vital del VHB.

1.3 VARIEDADES GENÓMICAS DEL VHB Y SU SIGNIFICADO

1.3.1 GENERACIÓN DE VARIANTES DEL VHB

La mayoría de las mutaciones se generan durante la replicación viral (durante la reversotranscripción) pero también pueden ocurrir durante la síntesis del pregenoma ARN por actividad de la ARN polimerasa celular. Como otras reversotranscriptasas la polimerasa probablemente carece de función correctora de pruebas. Esta especulación está de acuerdo con la existencia de una hipermutación G→A en los genomas del VHB (Günther et al. 1997). Esta mutación se genera por una incorporación errónea de T en lugar de C durante la reversotranscripción del pregenoma, dando lugar a la mutación G→A en la cadena de ADN positiva. Este tipo de hipermutación también se ha observado en las retrotranscriptasas de retrovirus y parece estar relacionada con alteraciones intracelulares del pool dTTP/dCTP (Vartanian et al., 1994). Esto hace hincapié en la posible importancia de las condiciones de la célula hospedadora para la frecuencia y tipo de mutaciones puntuales en el VHB. En portadores con alta viremia, se reemplaza al día entre un 25 y un 50% del virus circulante, con lo que se produciría gran cantidad de genomas mutantes al día. Además de las mutaciones puntuales también se producen deleciones e inserciones que se pueden haber generado por un cambio de molde durante la reversotranscripción (una propiedad intrínseca de la proteína pol), por empalme del ARN pregenómico (Su et al., 1989; Suzuki et al., 1989), por la rotura/ligación de la topoisomerasa I (Wang HP., and Rogler, 1991), o, por recombinación no homóloga de las moléculas de ADN lineal durante la replicación aberrante del genoma (Yang and Summers, 1995; Yang et al., 1996). Se ha propuesto que la estructura secundaria del ARN facilita el cambio de molde (Kidd and Kidd-Ljunggren, 1996). Es posible que sucedan cambios simultáneos en diversas posiciones del genoma en la población dominante debido a la selección de una cepa en un paciente coinfectado con cepas drásticamente divergentes del VHB, a veces de diferente genotipo o subtipo (Sugauchi F., et al., 2002). Una fuente de cambios pueden ser las variantes del virus que residen en distintos compartimentos del hígado o de tejidos extrahepáticos.

Una variante generada puede replicar autónomamente, replicar después de complementarse con el tipo salvaje u otro virus parcialmente defectivo, o ser completamente defectivo. La complementación es probablemente esencial para la

propagación de muchas variantes. Variantes del VHB que son defectivas en producción de proteína P, proteínas de la envuelta o proteína del core pueden complementarse con otras en cultivos celulares (Horwich et al., 1990; Okamoto et al., 1993).

Hay muchas razones posibles por las que las variantes específicas no se propagan o lo hacen ineficazmente. Poca o ninguna propagación se puede esperar de genomas que codifican la proteína p y que son defectivos en la encapsidación del ARN pregenómico o en actividades enzimáticas debido a la encapsidación preferencial cis y al papel crucial de la proteína p en la síntesis del ADN del VHB. Probablemente el mayor obstáculo para la propagación de las variantes sean el tamaño de la proteína polimerasa, su sensibilidad a las mutaciones y la encapsidación preferencialmente en cis. Esto también restringe la evolución filogenética del genoma del VHB. Durante la filogenia sólo unas pocas sustituciones sinónimas se dan en el gen S que se solapa con el gen P, un proceso llamado "evolución restringida" (Mizokami et al., 1997). Por otro lado, para la síntesis del pregenoma de ARN, para la encapsidación del ARN y para la replicación del genoma se requieren diversas secuencias que actúan en cis, lo cual permite pocas o ninguna variación de secuencia sin afectar a la replicación (Pollack and Ganem, 1993; Seeger and Managos, 1991). Los pocos cambios neutros de nucleótidos (mutaciones que aparentemente no suponen ventaja ni desventaja) observados en las genomas circulantes durante el alto grado de replicación del virus en vivo están de acuerdo con las restricciones postuladas de la flexibilidad genética. Estos datos sugieren que gran cantidad de variantes del genoma generadas por errores de la polimerasa no se propagan eficientemente.

1.3.2 VARIANTES

1.3.2.1 Variantes con mutaciones en la región pre-core

1.3.2.1.1 Biosíntesis del Ag-HBe y del Ag-HBc

El gen C posee dos codones de iniciación. La región entre el primer codón (ATG pre-C) y el segundo (ATG C) se denomina región pre-C. El promotor del gen C dirige la síntesis de dos ARN mensajeros, el ARNm del de pre-C y el ARNm de C pregenómico. La señal de encapsidación localizada en la región pre-C y que forma una estructura en bucle es funcional en el mensajero pregenómico C pero no en el ARNm

pre-C. La transcripción de la región pre-C impide el reconocimiento de la señal de encapsidación del ARN en el ARNm del pre-C. La transcripción para formar el mensajero del C pregenómico se inicia dentro de la región pre-C. La transcripción iniciada en el ATG del gen C dará lugar a la proteína de la nucleocápside que se ensambla en la partícula core (Ag-HBc). La transcripción del mensajero del pre-core se inicia corriente arriba del ATG del pre-C. Este ARNm se traduce en la proteína precore, que se diferencia de la proteína core por una señal adicional en su extremo N-terminal. Esta secuencia contiene una señal que dirige la proteína core al interior del retículo endoplasmático. Una rotura cotraduccional de la secuencia precore da lugar a la proteína precore de 22-kdalton. Una fracción de esta proteína precore de 22-kdalton parece que es regurgitada del RE hacia el citoplasma (García et al., 1989). La fracción que permanece en el RE sufre una rotura adicional en el C-terminal en el compartimento del Golgi (Wang et al., 1991). La proteína resultante de 17-kDalton es secretada y se detecta en la circulación como Ag-HBe (Takahashi et al, 1983).

1.3.2.1.2 Variantes con mutaciones en la región pre-core que impiden la síntesis de Ag-HBe.

Tres tipos de mutaciones dan lugar a variantes defectivas pre-C; primero mutaciones que inactivan el ATG pre-C; segundo inserciones o deleciones en la región pre-C que modifican el marco de lectura; y tercero, mutaciones que generan un codón de parada en la región pre-C. Como se ha visto in vitro los tres tipos de mutaciones impiden la traducción de la proteína precore mientras que la traducción de la proteína core a partir del ARNm pregenómico/C no se ve afectada (Tong et al., 1991a). Los pacientes infectados con esta variante carecen de Ag-HBe en el suero y en los hepatocitos, mientras la proteína core puede ser detectada en las células infectadas (Naoumov et al., 1992). Existen datos experimentales que sugieren que el virus pre-core defectivo genera consecuencias en la expresión de genes y replicación del VHB ya que bloquea la síntesis del Ag-HBe. En contraste con la situación del virus salvaje, las proteínas core y P pueden traducirse a partir del pre-C ARNm de las variantes con la mutación de parada pre-core. (Fouillot et l., 1993). Algunos estudios in vitro indican que el defectivo pre-core produce un aumento de la encapsidación del ARN y/o replicación, lo cual se ha atribuido a la carencia de la función reguladora de la proteína pre-core. Esta interpretación se basa en experimentos en las cuales la exaltación de la

expresión de la proteína inhibe la síntesis del ADN VHB en células de hepatoma humanas y en ratones transgénicos (Lamberts et al., 1993). Una posible explicación de esto es la interferencia de la proteína precore de 22-kDa con el ensamblaje. Sin embargo no hay efecto del pre-core defectivo en la replicación viral y en la ARN encapsidación según otros estudios.

1.3.2.1.3 Mutación pre-core codón de parada.

La mutación que causa un pre-core defectivo encontrada con más frecuencia es el cambio en la posición 1896 de G→A que convierte el penúltimo codón de la región pre-core en un codón de parada. La alta prevalencia de esta mutación se puede explicar por la hipermutación G→A. Este tipo de mutaciones sucede preferencialmente al comienzo de una serie de residuos de G (Vartanian et al., 1994). La mutación en el 3' terminal de la región pre-core evita la síntesis de la proteína pre-core pero permite la traducción de un péptido pequeño pre-C.

Estudios inmunohistológicos sugieren que este péptido es efectivamente expresado in vivo y localizado en el citoplasma y el núcleo de hepatocitos infectados (Dienes et al., 1995). Además de la mutación 1896-A, sólo otras tres mutaciones crean codones de parada en otras tres posiciones (1817, 1874 y 1897), sin embargo un total de 10 codones en la región pre-C se podría convertir teóricamente en un codón de parada mediante una sola mutación. Como se esperaba las tres mutaciones encontradas in vivo encapsidan el pregenoma de ARN y replican, mientras que algunas mutaciones generadas que crean codón de parada en pre-C interfieren severamente con la función de la señal de encapsidación del ARN solapada (Tong et al., 1992; Yuan et al., 1995). Esto podría explicar porque estas variantes no suceden in vivo.

La estructura de la señal de encapsidación es importante para las mutaciones que originan un codón de parada en las posiciones 1896 y 1897. Los nucleótidos en las posiciones 1896 y 1897 se localizan en el bucle menor de la estructura del ARN y forma emparejamiento de bases con los nucleótidos en las posiciones 1858 y 1857, respectivamente. Si hay una T en la posición 1858, como en la mayoría de los genotipos, la mutación 1896-A es compatible con la encapsidación y replicación. Sin embargo, si hay una C en la posición 1858 como se encuentra en el genotipo A y F, y en muchos aislados de VHB en China y África del Sur, la 1896-A es incompatible con la

encapsidación (Li et al., 1993) probablemente porque se impide el emparejamiento de bases 1858-1896.

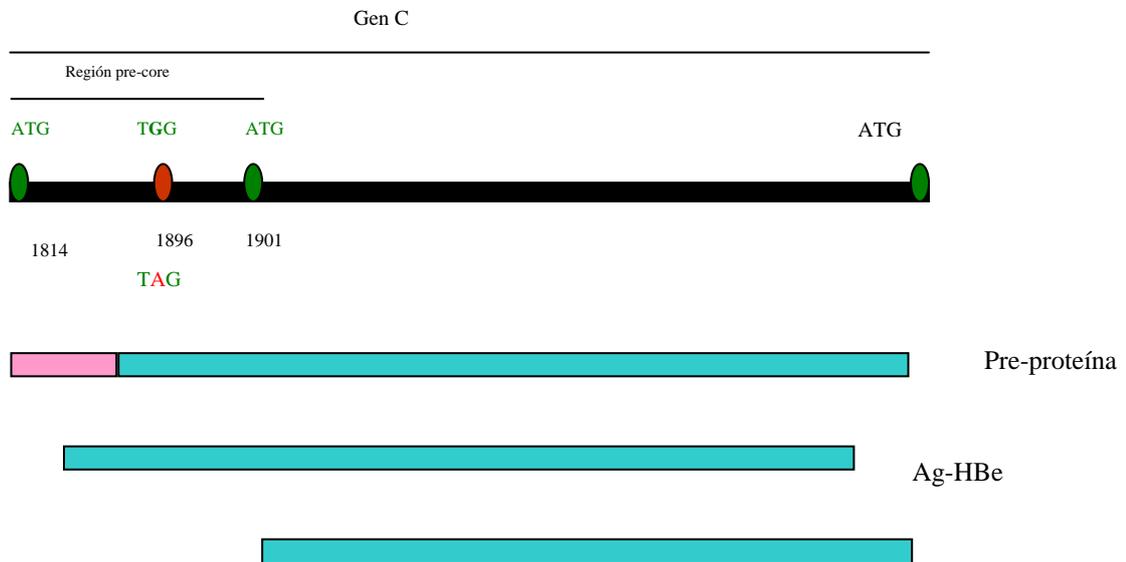


Figura 4. Representación esquemática de la región precore/core. La evolución de la mutación depende sobre todo del nt 1858 el cual forma pareja con el nt 1896 en el bucle del pregenoma ARN, que puede ser una **T-1858** (CCT) o una **C-1858** (CCC) para prolina en el codón 15 del precore(nt 1856-1858). La U-1858 es decir la **T-1858** en el ADN, puede formar pareja con ambas G-1898 y A-1896 y permitir la mutación G→A en el nt 1896.

De acuerdo con los datos experimentales el 1896-A no se ha encontrado en las cepas 1858-C in vivo. En las pocas cepas 1858-C con la mutación 1896-A se observó la emergencia de una T en la posición 1858 (Laskus et al., 1994; Lindh et al., 1995; Rodríguez-Frías et al., 1995, Talbodec et al., 1995). En las cepas 1858-C la incompatibilidad de la mutación 1896-A con la viabilidad del virus parece ser parcialmente compensada por una frecuente adquisición de otros tipos de mutaciones pre-C defectivos (Lindh et al., 1996). La mutación G→A en la posición 1897 es compatible con la encapsidación y replicación sólo si hay una T mejor que una C en la posición opuesta 1857. En contraste con la variación genotipo-específica en la posición 1858, se encuentra una C en todos los genotipos en la posición 1857. Por lo tanto, la introducción de la mutación 1897-A siempre requiere la introducción de una mutación compensatoria 1857-T, la cual ofrece una explicación de la infrecuente selección de esta

variante. Los pocos aislados encontrados con 1897-A contienen esta mutación compensatoria (Blum et al., 1991).

1.3.2.1.4 Mutaciones que alteran el marco de lectura

Estas mutaciones se observan rara vez. Casi todas las inserciones y deleciones (uno o dos nucleótidos) se localizan fuera de la señal de encapsidación, DR1, y 3' terminal del gen X, lo cual es consistente con la importancia de estas secuencias estructurales y reguladoras. Hay una mutación que es una excepción interesante la cual es un ejemplo de la restricción que ejerce la estructura de ARN sobre la señal de encapsidación. Este mutante contiene la inserción de un solo nucleótido en el brazo corto de la señal de encapsidación (entre las posiciones 1899 y 1900) junto con un cambio de nucleótido en el lado opuesto del brazo (Li et al., 1990). Mientras que la inserción sola produce un drástico descenso del empaquetamiento del ARN y replicación, la introducción adicional del cambio de nucleótido restaura completamente la capacidad de encapsidación (Tong et al., 1993). Algunas inserciones afectan al gen X y crean un gen de fusión X-C.

1.3.2.1.5 Mutaciones en el codón de inicio de pre-core

La falta de expresión del antígeno "e" puede deberse a diversas mutaciones dentro del codón de inicio de pre-C. Estas mutaciones en el codón de inicio de pre-C no evitan completamente la traducción de la proteína pre-C (Tong et al., 1991). Se cree que la mutación en el codón de inicio de pre-C da lugar a la encapsidación del ARNm pregenómico.

1.3.2.1.6 Implicaciones clínicas de las mutaciones en la región precore.

El VHB defectivo en pre-C está ausente en pacientes que son Ag-HBe-positivos con pocos signos de inflamación hepática y con niveles normales de ALT. Sin embargo las variantes pre-C defectivas se han encontrado en un número considerable de pacientes que son Ag-HBe-positivos con evidencia bioquímica e histológica de inflamación hepática. Esto indica que la secuencia preC salvaje está altamente conservada durante la fase de inmunotolerancia y que el VHB preC defectivo emerge en los pacientes Ag-HBe-positivos siguiendo a una activación de la hepatitis. En estos pacientes el VHB preC defectivo supone una subfracción de la población viral

(Hamasaki et al., 1994). La prevalencia del preC defectivo se correlaciona de forma inversa con la prevalencia de virus con Citosina en la posición 1858, como se ha encontrado en virus del genotipo A. Esto, probablemente esté relacionado con la incompatibilidad de la mutación 1896-A con la función de la señal de encapsidación en las cepas 1858-C.

Respecto a la relevancia clínica del VHB defectivo pre-C durante la infección crónica no está claro que produzca mayor daño hepático el mutante del core que el salvaje.

VHB pre-C defectivo y terapia con INF- α : en pacientes anti-HBe-positivos con sintomatología se ha observado VHB pre-C defectivo con más frecuencia en pacientes no respondedores que en los respondedores, lo cual sugería que los pre-C defectivos eran ligeramente más resistentes al tratamiento con IFN- α . Pero, se ha visto en algunos estudios que la terapia con interferón produce el aclaramiento del virus en la mitad de los pacientes anti-HBe-positivos infectados exclusivamente con VHB pre-C defectivo (Aikawa et al., 1995).

1.3.2.2 Variantes con mutaciones en el gen C

El 75% de todos los cambios de aminoácidos de esta región están localizados en 36 posiciones (puntos calientes). Los más frecuentes son los cambios producidos en el dominio central de la proteína core. También se han localizado la mayoría de las deleciones en esta región central del gen C. Las deleciones en el gen C afectan a la regulación de la expresión de la proteína P. En la regulación de la traducción del gen P intervienen dos codones de iniciación denominados J y C2 ATG (Fouillot et al., 1993). Las deleciones del gen C se dividen en tres clases según interfieran en esta regulación. La primera clase, la cual comprende la mayoría de las variantes, los ATG J y C2 están deleccionados pero se conserva el ATG P. En la segunda clase, los ATG C2 y P están deleccionados y el ATG J sirve para la iniciación de la traducción del gen P. En la tercera clase se delecciona el ATG P y el ATG C2 sirve para iniciar la traducción del gen P.

Las inserciones dentro del gen C son muy raras.

1.3.2.2.1 Variantes del promotor del core

El promotor del core está compuesto por el promotor básico del core (BCP), suficiente para iniciar la transcripción, y por una secuencia reguladora corriente arriba (URS). Las mutaciones más frecuentes ocurren en el BCP, y unas pocas afectan al URS. La mutación más frecuente en el BCP es un cambio de A por T en la posición 1762 combinado con un cambio G por A en la posición 1764 (mutaciones 1762/64-T-A). Diversos estudios demuestran que estas mutaciones disminuyen el nivel de ARNm pre-C en un 50-70% y por consiguiente la secreción del Ag-HBe (Buckwold et al., 1996; Günther et al., 1998). Pero actualmente no está claro si la mutación 1762/64-T/A aumenta o no el nivel de replicación y el papel en su selección y patogenicidad.

Las mutaciones 1762/64-T-A son prevalentes tanto en pacientes Ag-HBe positivos como en negativos con hepatitis activa, es decir que emergen en la mayoría de los casos con la activación de la hepatitis y previo a la seroconversión a anti-HBe y emergencia del VHB precore defectivo (Asahina et al., 1996; Maruyama et al., 1998). En los pacientes asintomáticos anti-HBe positivos la prevalencia de las mutaciones 1762/64-T/A parece ser más baja que en otros grupos de pacientes con hepatitis activa.

Es posible que estas mutaciones surjan para adaptar el VHB a la respuesta inflamatoria en los hepatocitos o para facilitar la replicación en células extrahepáticas (Bückwold et al., 1997; Laskus et al., 1997).

1.3.2.3 Variantes que cambian la estructura y función de la proteína X.

La proteína X interactúa con un cierto número de proteínas en el núcleo y en el citoplasma de la célula implicadas en diversos procesos celulares como proteólisis, transcripción, regulación del ciclo celular y reparación del ADN (Lee et al., 1995; Lin et al., 1997). Las mutaciones en el promotor del core a menudo afectan al gen X debido a que están solapados. Casi todas las deleciones/inserciones en el BCP ocasionan una proteína X truncada. Estas proteínas X carecen de un dominio en C-terminal (alrededor de las posición 130-140) que está altamente conservado en el VHB y que es esencial para la actividad de transactivación y media la interacción con otras proteínas celulares (Arii et al., 1992). En contraste con las deleciones/inserciones en el promotor del core, existen otros cambios de aminoácido que se introducen en la proteína X debido a

mutaciones en el promotor del core que no afectan a la función transactivadora de la proteína X in vitro.

1.3.2.4 Variantes del gen S

1.3.2.4.1 Variantes con deleciones en la región pre-S1

Cerca de todas las deleciones en pre-S1 están en pauta de lectura, y las pocas que la cambian aparecen acompañadas por otras mutaciones adicionales que lo reestablecen. Las deleciones en pre-S1 se pueden agrupar en cuatro tipos según su localización. Las deleciones de tipo A están localizadas en el 5' terminal de la región pre-S1. Estas deleciones retiran el auténtico ATG pre-S1, el cual de forma predecible cambia la iniciación de la traducción de la proteína pre-S1 hasta un ATG localizado 11 codones corriente arriba. Esto sucede con formas reducidas de proteína pre-S1 que son expresadas con regularidad por los VHB del genotipo D el cual carece de estos 11 codones. Las deleciones de tipo B pueden extenderse desde el 5' terminal hasta la parte central de la región pre-S1. La secreción del Ag-HBs no está reducida en estos mutantes. Las deleciones de tipo C se localizan en la parte central de la región pre-S1 y frecuentemente se extienden hacia el extremo 3'. Estos mutantes no sintetizan el ARNm de pre-S2 y S debido a que se han retirado secuencias importantes para la actividad del promotor de S. Por lo tanto, las variantes tipo C se caracterizan por un defecto parcial o total de la expresión del Ag-HBs (Melegari et al., 1994). Las deleciones de tipo D se encuentran en los límites de pre-S1 y pre-S2 por lo que es probable que algunas de estas mutaciones tengan consecuencias similares a las de tipo C.

Las subpoblaciones de virus con deleciones en la región pre-S1 pueden constituir el 5 % de la población viral (Fiordalisi et al., 1994) o pueden representar la población predominante (Gerken et al., 1991; Melegari et al., 1994). Las variantes delecionadas en pre-S1 parece que son igual de frecuentes en todos los estadios de la hepatitis crónica. Su emergencia se observa durante el curso natural de la infección en pacientes con hepatitis activa, algunos de los cuales han sido tratados con IFN- α (Takayanagi et al., 1993). Además las deleciones pre-S1 emergen bajo condiciones de inmunosupresión después de trasplante de hígado o de corazón (Trautwein et al., 1996).

1.3.2.4.2 Variantes con deleciones en la región pre-S2

Las deleciones de pre-S2 se encuentran en un pequeño segmento en el amino terminal de pre-S2 y no afectan a la secuencia de la proteína pre-S2 más allá del aminoácido en la posición 23. Debido a que estas deleciones mantienen la pauta de lectura las correspondientes variantes expresan las proteínas pre-S1, pre-S2 y P internamente delecionadas. En contraste con las deleciones de pre-S1, en muchos pacientes las variantes pre-S2 delecionadas representan el único virus detectable (Fernholz et al., 1993; Yamamoto et al., 1994), indicando que estas variantes pueden replicar autónomamente in vivo. Estas deleciones son raras en pacientes Ag-HBe positivos, frecuentes en pacientes con anti-HBe y más prevalentes en los pacientes con Ag-HBs negativo que en aquellos con anti-HBs. También son más frecuentes en pacientes que desarrollan ESLD o HCC.

1.3.2.4.3 Variantes defectivas en la expresión de la proteína pre-S2.

Algunas mutaciones impiden la traducción de la proteína S2: deleciones pre-S1/S2 que se solapan con el ATG de pre-S2; deleciones cortas que retiran el ATG de pre-S2 y mutaciones puntuales dentro del ATG de pre-S2. El VHB defectivo en pre-S2 es raro en pacientes Ag-HBe positivos y en pacientes con HCC y ESLD. Se han encontrado muy rara vez en pacientes Ag-HBs negativos o anti-HBs positivos. En contraste con las variantes con deleciones en pre-S1 y pre-S2 los defectivos en pre-S2 con mutaciones puntuales se han encontrado en pacientes con hepatitis fulminante (Pollicino et al., 1997; Sterneck et al., 1998).

1.3.2.4.4 Variantes con mutaciones en el determinante "a".

El dominio central del determinante "a" está formado por tres bucles denominados: bucle I en posiciones 124-124; bucle II en 125-136; bucle III en 140-146. Estos bucles están rodeados y salpicados por varios residuos de cisteína los cuales mantienen este dominio en su conformación formando puentes disulfuro. Mutaciones en estas cisteínas afectan mucho a la antigenicidad del determinante "a" pero en la mayoría de los casos no influye en el ensamblaje y secreción de partículas subvirales (Mangold et al., 1995). Las mutaciones en el determinante "a" se definen como aquellos cambios en la secuencia de la proteína S (posiciones 120-147) comparada con la secuencia consenso del correspondiente genotipo. Durante la infección crónica las

mutaciones en el determinante a se agrupan particularmente en el bucle II. Las inserciones se observan sólo en el primer bucle, mientras que los cambios de aminoácido se encuentran en los bucles II y III. El VHB con mutaciones en el determinante "a" es menos frecuente en pacientes Ag-HBe positivos que en pacientes con anti-HBe o en aquellos que desarrollan ESLD o HCC, y es más prevalente en pacientes con Ag-HBs negativos o anti-HBs positivos.

Como inmunoprofilaxis para prevenir el rechazo del injerto después de un trasplante por una hepatitis B en estadio terminal se utilizan anticuerpos anti-HBs. La reinfección del injerto a pesar de los títulos protectores se ha visto asociada con mutaciones en el determinante "a". Estas mutaciones se encuentran en la posición 145. Esto sólo ocurre en el 36% de los pacientes que se han reinfectado durante el tratamiento con inmunoglobulina anti-HBs policlonal (Protzer-Knolle et al., 1998).

1.3.2.5 Mutaciones que alteran la estructura y función de la proteína P

Diversas mutaciones pueden alterar la función y estructura de la proteína P como las deleciones en el gen C, deleciones en las regiones pre-S1 y pre-S2 que retiran secuencias de la región espaciadora; mutaciones en el determinante "a" que dan lugar a cambios de aminoácidos o inserciones en el dominio con actividad reversotranscriptasa. Estas mutaciones, probablemente no interfieren de manera seria con la actividad de la proteína P.

En pacientes tratados con los análogos de nucleósidos como lamivudina y famciclovir se han observado mutaciones que alteran la función de la proteína de forma significativa. Estos análogos se usan para tratar pacientes con reinfección del injerto después del trasplante y también para reducir la carga viral en pacientes inmunocompetentes con infección crónica. Se han encontrado recaídas en ambos casos asociadas a cambios de aminoácidos en el motivo YMDD (tirosina, metionina, aspartato, aspartato) (Ling et al., 1996; Bartholomew et al., 1997;). Además de estas mutaciones, también se observaron otras corriente arriba del motivo YMDD, en el dominio B de la polimerasa. En pacientes inmunocompetentes se ha estimado que la incidencia de estas mutaciones es del 39% después de un año de tratamiento (Honkoop et al., 1997) y del 57-64% después de dos años de tratamiento. En pacientes con recaída en la infección durante el tratamiento con famciclovir, la región YMDD permanece intacta. Sin embargo, tres cambios de aminoácidos aparecen en el dominio B, los cuales

probablemente son los responsables de la baja susceptibilidad a este análogo de nucleósido en los ensayos in vitro (Aye et al., 1997). A pesar de la recaída en la infección que producen estas variantes, sólo se elevan un promedio del 10% los niveles de viremia respecto a los niveles pretratamiento y después de retirar el tratamiento con lamivudina emerge rápidamente el virus salvaje.

1.3.3 SEROTIPOS DEL VHB

Todos los virus de la hepatitis B poseen un determinante común, llamado “a”, y diversos subdeterminantes y variantes, de interés epidemiológico. Así los determinantes “d”, “y” y los “w”, “r” son grupos alelos (mutuamente excluyentes d/y y w/r) con lo cual aparecen cuatro grandes grupos de Ag-HBs: *adw*, *adr*, *ayr* y *ayw* (Le Bouvier et al., 1971; Bancroft et al., 1972). Los determinantes t/i del Ag-HBs son la base para un sistema de subtipado adicional. Por lo tanto, el estudio de la heterogeneidad serológica del antígeno de superficie del VHB ha dado como resultado la clasificación del virus en diferentes subtipos de acuerdo con los determinantes antigénicos de sus antígenos de superficie: *ayw1*, *ayw4*, *ayr*, *adw2*, *adw4*, *adrq-* y *adrq+*.

Existe una relación entre los subtipos antigénicos mayores y el aminoácido en las posiciones 122 y 160 de la proteína S. Los determinantes de subtipo *d* y *w* poseen una Lisina en ambas posiciones (122 y 160) mientras que los determinante de subtipo “y” y “r” poseen Arginina en estas posiciones.

Aminoácido 122	Aminoácido 160	
	Lys	Arg
Lys	<i>dw</i>	<i>dr</i>
Arg	<i>yw</i>	<i>yr</i>

Los determinantes t/i están definidos por treonina/isoleucina en la posición 126 de la región que codifica para el antígeno de superficie. Existen otros determinantes en las posiciones 127, 144, 145, 158, 159, 177 y 178 (Okamoto et al., 1989; Norder et al., 1992a).

El empleo del subtipado del virus se usa para estudios epidemiológicos y en algunos casos para estudiar la relación del subtipo viral con la enfermedad.

1.3.4 GENOTIPOS DEL VHB

Aunque el subtipado del virus basado en el Ag-HBs permite una clasificación rápida y fácil del VHB, sólo se reflejan parcialmente las relaciones filogenéticas de los genomas del VHB. Por ello se ha establecido una clasificación genética basada en la comparación de genomas completos que define, en base a las similitudes de la secuencia, siete genotipos del VHB denominados A,B,C,D,E,F y G (Okamoto et al., 1988; Norder et al., 1994; Stuyver et al., 2000a). Muy recientemente se ha descrito un octavo genotipo el genotipo H encontrado en Nicaragua, México y California (Arauz-Ruiz et al., 2002).

Las diferencias de secuencias de nucleótidos entre genotipos distintos varían de 8,8% a 14,5% mientras que las diferencias dentro de cada grupo son considerablemente menores (1,5% a 4,2%). Hay algunas diferencias características entre los distintos genotipos. Por ejemplo, los genomas del genotipo A se caracterizan por una inserción en el 3' final del gen C, y los genomas del genotipo D carecen de 33 nucleótidos en la región pre-S1, dando lugar a una proteína pre-S1 truncada en el N-terminal y a una delección en la proteína P.

La distribución geográfica de los genotipos y serotipos indica una transmisión estable en la población hospedadora, aunque se han descrito excepciones. Ambos muestran una distribución geográfica similar consecuente con sus relaciones de secuencias. Genomas de genotipo A (serotipo adw2) son prevalentes en los EEUU, Europa del Norte y Central (Gray et al., 1997). Se han encontrado aislados del genotipo A en Filipinas (Norder et al., 1993; Kidd-Ljunggren et al., 1995) que posiblemente reflejo del contacto cercano con Norteamérica sobre todo en el último siglo. También se han aislado genotipos A en Hong Kong (Lok et al., 1994) y en África del Sur y del Este (Minami et al., 1996; Bowyer et al., 1997). El análisis de los aislados de genotipo A encontrados en Sudáfrica da como resultado un subgrupo dentro de los A que se denominó A'. Las diferencias entre los A y los A' radican en su mayor parte en la región preS2 (Bowyer et al., 1997).

Los genotipos B y C pertenecen a poblaciones indígenas del Sudeste de Asia (Okamoto et al., 1988; Kidd-Ljunggren et al., 1995; Theamboonlers et al., 1999). Su distribución está bastante mezclada con tendencia a encontrar más genotipos C en las regiones continentales del noreste y en Japón (Orito et al., 2001). Sin embargo, el genotipo C también se encuentra en poblaciones de las islas del Sur del Pacífico en las que la prevalencia de portadores del VHB es en algunos puntos muy alta (Gust et al., 1984). Resulta interesante diferenciar los aislados del genotipo C geográficamente por subtipo. Así, en las islas del Pacífico se encuentran más frecuentemente subtipos *adrq* que en el sudeste de Asia (Norder et al., 1993).

El genotipo D es el más frecuente y se ha encontrado en todo el mundo, con una prevalencia más alta en la banda comprendida entre el sur de Europa y el Norte de África (Norder et al., 1993; Bocharni-Chabchoub et al., 2000) extendiéndose hasta la India; en el oeste y sur de África (Bowyer et al., 1997); y entre drogodependientes por vía intravenosa en todos los continentes.

El genotipo E es el más similar genéticamente al D (Norder et al., 1993) y se ha considerado como una variación del genotipo D cuando se realiza análisis filogenético con el gen X (Kidd-Ljunggren et al., 1995). Se encuentra en el oeste y sur de África y una de las principales diferencias con el genotipo D es que no posee la delección de 33nt en el comienzo de la región preS1 que es común a todos los genotipos D (Bowyer et al., 1997; Norder et al., 1994; Odemuyiwa et al., 2001).

El genotipo más diferenciado, el F, se encuentra en Sudamérica y Centroamérica (Norder et al., 1993; Arauz-Ruiz et al., 1997; Blizt et al., 1998; Mbayed et al., 1998; Nakano et al., 2001; Telenta et al., 1997). Aunque comparte algunas características genéticas con el genotipo A se cree que es un genotipo originario de América. Presenta menos homologías que los otros genotipos con respecto a los diferentes aislados de primates.

El genotipo G se ha encontrado en Francia y los Estados Unidos (Stuyver et al., 2000) estando ausente en otras regiones como en Japón (Kato et al., 2001).

Actualmente no se conoce con certeza el papel que juegan los genotipos en el curso clínico de la infección, aunque la infección por el genotipo A muestra algunas peculiaridades. Mientras que en Francia, España y los Estados Unidos el genotipo A es

observado más frecuentemente en los pacientes Ag-HBe positivos y menos en los pacientes anti-HBe-positivos (Li et al., 1993; Rodríguez-Frías et al., 1995; Mangia et al., 1996). Esto se podría explicar asumiendo que durante la infección con el genotipo A, la tasa de seroconversión anti-HBe es reducida comparada con la infección por otros genotipos.

El residuo C específico del genotipo A en la posición 1858 previene la introducción del pre-C defectivo mutante en la posición 1896 (Li et al., 1993). Esto explicaría la baja prevalencia de esta mutación en regiones endémicas para el genotipo A comparadas con otras regiones geográficas. La situación puede ser similar para el genotipo F, el cual también lleva el residuo 1858-C (Naumann et al., 1993; Norder et al., 1994; Arauz-Ruiz et al., 1997a).

Alternativamente la aparición de anti-HBe puede estar asociada con un cambio de genotipo de la población predominante del virus. Se ha descrito el reemplazo del VHB de genotipo A por virus que llevan secuencias características del genotipo D con pérdida del Ag-HBe o Ag-HBs (Bahn et al., 1997; Gerner et al 1998).

Se ha descrito una clara relación entre los 9 subtipos serológicos y los genotipos que queda reflejada en la siguiente tabla:

Genotipo	A	B	C	D	E	F	G
Subtipo asociado	adw2 (ayw1)	adw2 ayw1	adr adrq- ayr	ayw2 ayw3 ayw4	ayw4 (adw2)	adw4q-	adw2

La clasificación en genotipos del virus de la hepatitis B se basa en una divergencia del genoma completo de un 8% o mayor (Okamoto et al., 1988). Otras regiones del genoma también se utilizan para agrupar los virus en los grandes grupos como la región del gen de la polimerasa (Orito et al., 1989). También se emplea para este propósito el gen de superficie o la región del core. Según estudios realizados, la región pre-core y del core proporciona una diferencia de secuencia intergrupo que varía de 5,6 a 13,2% siendo el genotipo F el más divergente (Norder et al., 1994). La diferencia intragrupo varía de 0,7 a 5,7 siendo el más variable en esta región el genoma

del grupo B. En el análisis de la región pre-S, que es la región más variable del genoma (con sólo un 49,9% de nucleótidos conservados según estudios de Norder H. et al), se encuentra una diferencia intergrupo en la región pre-S1 de 8,4-25,5% y en la región pre-S2 de 6,9-21,7%, siendo los genomas del grupo F los más divergentes. Las diferencias intragrupo varían de 1,4-4,9% y de 1,8-7,3% en el grupo B y A respectivamente que son los más variables. En la región del gen S que codifica para el antígeno de superficie la diferencia intergrupo es de 4,2-7,9%, siendo los más divergentes los genomas del grupo F. La diferencia intragrupo en esta región es de 0,7-1,7% siendo los genomas del grupo D los más variables.

2. LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS B

2.1 PATOGÉNESIS Y PATOLOGÍA POR EL VHB

El hepatocito es la célula diana del VHB pero también puede infectar linfocitos y células del sistema reticuloendotelial, que pueden facilitar la llegada del virus al hígado. Las características patológicas de la hepatitis B aguda o crónica incluyen necrosis hepatocelular, respuesta inflamatoria, infiltración linfocítica y degeneración de las células hepáticas (Peters et al., 1975; Milich et al., 1990). El daño celular en los hepatocitos se debe al mecanismo inmunológico del hospedador y en particular a la respuesta de las células T citotóxicas.

Hay factores que se correlacionan con la severidad de la enfermedad como es la dosis de virus infecciosa, la edad a la que sucede el contagio, diversos factores del hospedador que parecen estar relacionados con el desarrollo de la infección, etc. Se ha encontrado cierta asociación entre el alelo DRB1*1302 del complejo mayor de histocompatibilidad II y la eliminación espontánea de la infección (Oler et al., 1997). También se asocian con la eliminación espontánea de la infección otros factores del hospedador como son los polimorfismos encontrados en el gen del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) o en gen de la Interleukina 10 (IL-10), que dan lugar a distintos niveles de expresión de sus productos correspondientes (Oler et al., 1998). Se cree que la estimulación del receptor de la vitamina D, que se expresa en monocitos y en

linfocitos, influye en la respuesta inmune. Parece que ciertos polimorfismos del receptor de la vitamina D influyen en la eficiencia de la transcripción de este gen. Se ha asociado uno de estos alelos del receptor de la vitamina D con el control de la replicación del VHB (Bellamy et al., 1999).

Se ha sugerido que el Ag-HBc que se encuentra en la superficie de los hepatocitos infectados puede ser la diana antigénica para las células T citotóxicas, y, por lo tanto, el daño se debe al efecto citotóxico de estas células sobre los hepatocitos (Eddleston et al., 1982). Otro mecanismo de daño celular podría ser un efecto citopático directo del virus cuando se expresa el Ag-HBc (Yoakum et al., 1983). Algunos autores han propuesto un mecanismo de daño celular hepático basado en la sobreproducción de Ag-HBs y acumulación en los hepatocitos (Chisari et al., 1987). Cuando la respuesta inmune es adecuada se destruyen todas las células infectadas por el VHB y los viriones que se liberan debido a la necrosis de los hepatocitos son neutralizados por los anticuerpos anti-HBs. Esto impide su penetración en los hepatocitos y produce la resolución de la infección. Si la respuesta inmune es inadecuada, la infección persiste ya que el VHB continua replicándose en los hepatocitos que no son destruidos. La formación de inmunocomplejos Ag-HBs/anti-HBs parece desempeñar un papel importante en la aparición de las manifestaciones extrahepáticas asociadas a la infección aguda o crónica por el VHB.

Existe una clara asociación entre la infección crónica por VHB y el desarrollo de hepatocarcinoma (HCC) sobre todo cuando la infección se ha producido en la infancia. Se ha hablado de la potencial acción oncogénica del gen X debido a su capacidad de activar ciertos genes celulares (Tsu et al., 1989). Este gen a menudo se interrumpe o se pierde en HCC al producirse la integración viral porque el gen X abarca la región de extremos cohesivos (DR1, DR2) la cual es el sitio de unión al ADN celular durante la integración viral. Por lo tanto no es habitual la expresión del gen X en casos de HCC. En la integración viral a menudo se conserva el exaltador, el promotor de X y una parte del gen X y puede que a veces se posicione de tal manera que tengan alguna influencia sobre la expresión de genes celulares o incluso que se produzca una proteína de fusión (Nagaya et al., 1987).

No parece que los hepadnavirus se integren en el genoma celular en regiones de proto-oncogenes, aunque existen excepciones. Los virus integrados encontradas en los tumores se encuentran siempre en diferentes sitios del ADN celular y casi nunca en los dominios de proto-oncogenes conocidos, por lo que la persistencia del material genético viral o el efecto de su integración no parece ser la responsable de las alteraciones neoplásicas observadas en el HCC.

2.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA INFECCIÓN POR EL VHB.

2.2.1 HEPATITIS AGUDA POR VHB

El periodo de incubación de la hepatitis por VHB puede verse afectado por variaciones en la respuesta del hospedador. El corto periodo prodrómico o preictérico tiene una duración de varios días a más de una semana y precede al comienzo de la ictericia. La mitad de los pacientes en este periodo se caracterizan por ligera fiebre, fatigabilidad, malestar, mialgia, anorexia, náuseas y vómitos. Jóvenes y adultos pueden quejarse de dolor en el cuadrante superior derecho como consecuencia de la hepatomegalia, la cual normalmente precede a la ictericia en 1 o 2 semanas.

La fase de ictericia se anuncia con la aparición de orina oscura debido a la bilirrubina seguido en uno o varios días más tarde por heces pálidas y coloración amarillenta de las membranas mucosas, conjuntiva, esclerótica y piel. Esta fase comienza en los primeros 10 días después del inicio de los síntomas en el 85% de los casos de VHB. La ictericia se reconoce clínicamente cuando los niveles de bilirrubina total exceden 2.0-4.0mg/dL. Los pacientes requieren atención médica en este estadio de su enfermedad. Si existe fiebre, esta normalmente desaparece después de los primeros días de ictericia.

En ocasiones, durante la hepatitis viral aguda puede desarrollarse una necrosis del hígado que puede bloquear seriamente las funciones hepáticas. Este fenómeno se denomina hepatitis fulminante y se caracteriza por fiebre alta repentina, dolor abdominal, vómitos e ictericia, seguido de desarrollo de encefalopatía hepática (Trey C., 1972). Afortunadamente la hepatitis fulminante es poco frecuente, menos de 1% de los pacientes ictericos hospitalizados por una hepatitis viral aguda.

Normalmente la bilirrubina sérica total permanece por debajo de 10mg/dL pero en ocasiones puede alcanzar niveles de 20mg/dL. Después del alcanzar el pico en una o

dos semanas, su descenso es más gradual, sucediendo la recuperación en las 6 semanas siguientes en la mayoría de los pacientes. La alanina aminotransferasa sérica (ALT o GPT) y la aspartato aminotransferasa (AST o GOT) son indicadores sensibles de daño hepatocelular. La AST se encuentra en las mitocondrias (80%) y en el citosol (20%) mientras que la ALT está limitada al citosol. Los niveles de ALT son significativamente mayores que los de AST en la hepatitis viral aguda no complicada, siendo la relación AST/ALT <0.7 en la mayoría de los casos. Una excepción es cuando se desarrolla necrosis tisular dando lugar a la liberación de AST mitocondrial a la sangre. Actualmente los niveles de ALT por encima de 400 UI/L discriminan mejor que la relación AST/ALT. La fosfatasa alcalina nos informa del grado de colestasis y la 5' nucleotidasa es útil para confirmar el origen hepático de su elevación. Generalmente los pacientes con hepatitis aguda viral tienen un número normal o ligeramente reducido de segmentados y una relativa linfocitosis. Aunque se puede observar una moderada reducción de la supervivencia de los glóbulos rojos el hematocrito permanece dentro de los límites normales.

No hay un tratamiento específico para la hepatitis aguda. La terapia se basa en el mantenimiento del bienestar del paciente y conseguir un balance nutricional adecuado.

2.2.2 HEPATITIS CRÓNICA POR VHB

Aproximadamente de un 2 a un 10% de las hepatitis agudas por VHB derivan en una enfermedad hepática crónica. La enfermedad hepática crónica puede permanecer silenciosa durante años o progresar a cirrosis o muerte en un corto periodo de tiempo. La hepatitis crónica se define como la presencia de un proceso inflamatorio difuso del hígado, que se prolonga por seis meses o más. La denominación de hepatitis crónica se fundamenta en criterios histológicos específicos y por lo tanto la biopsia hepática es un examen indispensable para establecer este diagnóstico.

De acuerdo a sus alteraciones histológicas, la hepatitis crónica se clasifica en:

Hepatitis crónica persistente: se caracteriza por un infiltrado inflamatorio leve en los tractos portales, mientras que la arquitectura lobular y la placa limitante están conservadas.

Hepatitis crónica lobulillar: se manifiesta con rasgos de hepatitis aguda con inflamación, extendiéndose dentro del lóbulo, con necrosis aislada de hepatocitos; la placa limitante está intacta.

Hepatitis crónica activa: en ella existe un infiltrado inflamatorio crónico, que expande las áreas portales y se extiende a los lóbulos, con erosión de la placa limitante y aparición de fibrosis.

Esta clasificación tiene importancia en el pronóstico, ya que las dos primeras formas histológicas, en general, no evolucionan hacia la cirrosis, a diferencia de la hepatitis crónica activa, en especial aquella con alteraciones intensas, que con mucha frecuencia evoluciona a la cirrosis hepática (80% de los casos). Sin embargo, cada forma histológica no es una entidad propia, ya que distintas etiologías pueden producir un daño histológico similar.

En la evolución natural de la infección por el VHB se pueden definir dos situaciones dependiendo del estatus Ag-HBe/anti-HBe de los pacientes:

2.2.2.1 Hepatitis crónica Ag-HBe positiva

La infección crónica por el virus de la hepatitis B presenta tres fases evolutivas bien definidas:

- Fase inicial de alta replicación: las aminotransferasas están elevadas como expresión de daño hepatocelular; es característica la existencia de Ag-HBc en el núcleo y citoplasma de los hepatocitos cuando se procede al examen inmunohistoquímico. Esta fase tiene una duración variable, pero en general prolongada (años).
- Fase de aclaramiento o seroconversión: desaparición gradual del Ag-HBe (pérdida de Ag-HBe y desarrollo de anti-HBe). Esta fase es más frecuente en adultos o niños que han adquirido la infección de forma horizontal y menos frecuente en los que la han adquirido de forma vertical o en pacientes inmunodeprimidos. Esta fase se caracteriza por un ascenso en la cifra de transaminasas y una disminución o desaparición del ADN del VHB, lo que quiere decir una recuperación de la capacidad inmunitaria del paciente o una expresión más eficiente de antígenos en la superficie de los hepatocitos. Probablemente ello favorecería la acción citolítica de los linfocitos T citotóxicos contra aquellos

hepatocitos que expresan en su membrana antígenos víricos asociados a los antígenos del sistema HLA. Los pacientes con baja replicación vírica, transaminasas elevadas y lesiones hepáticas más activas son los que tienen mayores posibilidades de presentar una seroconversión anti-HBe en un plazo breve (Brook MG. Et al., 1989).

- Fase no replicativa: desaparece del suero el Ag-HBe, el ADN del VHB no se detecta por hibridación (aunque la reacción en cadena de la polimerasa puede detectar viremia). La mayoría de los pacientes se convierten en portadores crónicos del Ag-HBs, con un tejido hepático normal o con cambios cicatrizales secundarios a una hepatitis crónica de larga evolución. Sin embargo, en algunos casos en el momento de la seroconversión ya existen lesiones graves (cirrosis hepática) y persistirá la hepatopatía aunque haya cesado la replicación. El motivo por el que persiste la síntesis del Ag-HBs en la mayoría de los pacientes después de la fase de seroconversión es la integración del genoma del VHB en los hepatocitos. A pesar de este hecho, un 1-2% anual de los pacientes con hepatitis crónica B que han presentado una seroconversión anti-HBe acaban eliminando el Ag-HBs tras unos años de baja o nula replicación.

La hepatitis crónica B es una enfermedad con tendencia a la remisión clínica e histológica pero en una proporción no despreciable de casos la enfermedad progresará pudiéndose desarrollar una cirrosis hepática (Fattovich et al., 1991). El riesgo de desarrollarla depende de muchos factores, como la persistencia de replicación vírica durante un periodo prolongado, la edad en el momento del diagnóstico (los pacientes mayores desarrollan cirrosis con más frecuencia que los jóvenes) y el grado de lesión hepática en la biopsia inicial. La presencia durante el curso de la enfermedad de exacerbaciones agudas o reactivaciones después de una seroconversión anti-HBe son también factores que incrementan el riesgo de evolución a cirrosis. Una vez se ha instaurado, los pacientes pueden permanecer compensados durante muchos años, pero a largo plazo pueden presentar complicaciones relacionadas con la enfermedad. Se cree que aproximadamente un 20% de los pacientes con cirrosis por VHB se descompensarán en forma de ascitis, hemorragia digestiva alta o encefalopatía hepática tras cinco años de seguimiento (Liaw et al., 1989). La mortalidad a los cinco años una vez desarrollada la cirrosis se estima en un 15%. El riesgo de desarrollar hepatocarcinoma en portadores

crónicos del VHB es de 30 a 100 veces superior con relación a la población no infectada por dicho virus (Beasley et al., 1981)

2.2.2.2 Hepatitis crónica anti-HBe positiva

En algunos países mediterráneos existe una elevada proporción de pacientes con hepatitis crónica B en los que no se detecta del Ag-HBe en el suero a pesar de presentar lesiones hepáticas y replicación viral activa. La causa de esta infección es un mutante del VHB que, a diferencia del VHB salvaje es incapaz de sintetizar el antígeno y que se denomina "*e menos*" (Carman et al., 1989). Esta mutación aparece en el curso de la evolución natural de la infección por VHB y tiene gran importancia patogénica. Es responsable de aproximadamente la mitad de los casos de hepatitis crónica B en los pacientes del área mediterránea. La mutación A1896 es la que se ha detectado con más frecuencia en pacientes anti-HBe positivos de diferentes partes del mundo, aunque se han descrito otras mutaciones que impiden la expresión del Ag-HBe. En los pacientes infectados con la mutante "*e menos*" se puede observar un amplio espectro de actividad histológica, desde una hepatitis crónica leve hasta una cirrosis hepática. Durante la evolución, en estos pacientes se pueden apreciar grandes fluctuaciones en la replicación vírica y en la actividad de la enfermedad, con períodos de hipertransaminemia marcada que alternan con fases de remisión transitoria y que simulan la fase de seroconversión espontánea de pacientes Ag-HBe positivos. La enfermedad tiene una escasa o nula tendencia a la remisión espontánea y la progresión a cirrosis parece más rápida que en pacientes infectados por el virus salvaje (Brunetto et al., 1989). La razón de la persistencia de la infección y la ausencia de remisión espontánea de la hepatitis crónica en los pacientes anti-HBe positivos (mutante e menos) parece atribuible a la ausencia de Ag-HBe en la membrana de los hepatocitos que contienen el VHB; ello produciría una disminución en la eficiencia de la eliminación por los linfocitos T citotóxicos y, por consiguiente la persistencia de la infección. Los mutantes pueden estar en bajas concentraciones en la fase temprana de la infección y su número aumenta progresivamente con relación al virus salvaje debido al efecto negativo de la selección de Ag-HBe, que actúa como diana en la respuesta inmune para el aclaramiento de las células infectadas. En los pacientes infectados con la mutante "e menos" la respuesta al tratamiento con interferón suele ser escasa, debido a la gran tendencia a la recidiva tras la suspensión de la medicación. También hay algunos enfermos con la mutación

precore que no presentan daño hepático y que en la biopsia hepática muestran práctica ausencia de lesiones histológicas. Se supone que las divergencias entre estos grupos de pacientes pueden explicarse por diferencias en la eficiencia de la respuesta inmune frente al virus o en el balance entre la población mutante y salvaje. Hasta el momento no puede asociarse el mutante precore con mayor o menor gravedad del curso de la infección (Günther et al., 1999).

3. PRUEBAS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN POR VHB E INTERPRETACIÓN

3.1 MARCADORES DE LA INFECCIÓN POR EL VHB.

Como los síntomas de una infección por VHB son indistinguibles de otras formas de hepatitis virales el diagnóstico clínico definitivo de una hepatitis por VHB depende de los resultados de la serología del paciente.

En los ensayos empleados por el laboratorio se usan anticuerpos específicos contra varias proteínas del VHB y pueden detectar las proteínas del Ag-HBs a niveles tan bajos como 0,25 ng/mL y anticuerpos anti-HBs a niveles de 1 mIU/mL. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) también se ha usado para la detección de bajos niveles de ADN del VHB presente en muestras de sangre y de tejidos.

La secuencia de aparición de los marcadores de infección por el VHB es la siguiente: ADN-VHB, Ag-HBs, Ag-HBe, anti-HBc (IgM e IgG), anti-HBe y anti-HBs. Otros marcadores como la determinación de los antígenos Pre-S y sus anticuerpos pueden ser de utilidad para establecer un pronóstico pero no existen pruebas comerciales para su exploración.

Marcadores serológicos:

Ag-HBs

Este antígeno se encuentra en el citoplasma del hepatocito, de donde sale a la sangre encontrándolo durante el periodo de incubación, la fase aguda de la enfermedad y en el estadio crónico. La concentración de este antígeno en la sangre oscila entre 50 y 300 ug/mL. Si la evolución es favorable, desaparece a los 3 ó 6 meses de la enfermedad. Por el contrario, el mantenimiento de títulos elevados durante más de 6-8 semanas, o si no existe una disminución significativa de su título en el primer mes de enfermedad es indicio de mal pronóstico y de evolución a la cronicidad. Por ello la positividad de este marcador más allá del sexto mes de la enfermedad define la situación clínica de hepatitis crónica.

Anti-HBc:

Es el marcador de infección por autonosiasia. Es el primer anticuerpo que aparece siendo ya detectable con los primeros síntomas de la enfermedad, antes de la elevación de las ALT, y persiste en el suero durante toda la enfermedad. Se encuentran

en títulos elevados durante la fase aguda y la convalescente, mientras que en los estadios crónicos las concentraciones son habitualmente inferiores. Su presencia en solitario nos permite localizar la "fase de ventana" de la enfermedad que conduce al diagnóstico erróneo de hepatitis no A no B. El diagnóstico de la fase de ventana puede hacerse determinando los anticuerpos de la clase IgM frente al Ag-HBc (marcador de fase aguda). En la enfermedad autolimitada la persistencia de estos anticuerpos puede prolongarse de 3 a 4-6 meses pero siempre a títulos decrecientes. En las reactivaciones de la enfermedad crónica también puede detectarse aunque a títulos inferiores a los encontrados en la fase aguda. Es por lo tanto un marcador de actividad inflamatoria.

Antígeno "e":

Es una proteína no estructural y tienen secuencias de aminoácidos que son idénticas a las que forman la nucleocápside de Ag-HBc cuando ésta es proteolíticamente degradada y desplegada. Existe de forma monomérica y es detectable en pacientes Ag-HBs positivos ya sea en fase aguda o crónica de la enfermedad. En el caso de hepatitis crónica las concentraciones de este marcador son paralelas a las del ADN. Su reactividad declina con el tiempo haciéndose indetectable antes de la desaparición del Ag-HBs.

Anti-HBe:

La seroconversión temprana para este marcador indica, casi siempre, recuperación de la enfermedad. En los casos de hepatitis crónica persistente en los que anti-HBe coexiste con Ag-HBs, indica escasa actividad replicativa de la enfermedad viral. En muchos casos de evolución crónica activa, el enfermo seroconvierte a anti-HBe pasados varios años, con lo que la enfermedad pasa a un estadio no replicativo. Si esta mutación y selección viral sucede en el seno de una hepatitis crónica activa la seroconversión a anti-HBe puede ocurrir, pero en estos casos la enfermedad no se detiene y la seroconversión no tiene el buen pronóstico que parece indicar.

Anti-HBs:

Estos anticuerpos están dirigidos frente a varios lugares antigénicos del Ag-HBs y todos ellos son denominados genéricamente anti-HBs. Algunos anticuerpos son únicos para determinadas cepas de virus pero, en todos los pacientes y personas vacunadas, el anticuerpo predominante es el anti-HBs/a dirigido frente al determinante común "a". Estos anticuerpos también son detectados, con diferente sensibilidad, por

las pruebas serológicas comerciales. Estos anticuerpos subtipoespecíficos probablemente solo producen protección contra la cepa a la que van dirigidas. El anti-HBs es el último marcador en aparecer. La seroconversión a anti-HBs sucede poco después de la desaparición del Ag-HBs. El espacio de tiempo que transcurre entre el aclaramiento de este y la aparición de anti-HBs se denomina periodo de ventana. La presencia de este marcador indica inmunidad para toda la vida frente a la reinfección. En las personas vacunadas es el único marcador de VHB positivo y se considera que un individuo está protegido si la concentración de este anticuerpo supera las 10-20 mUI/mL. Se ha descrito la presencia simultánea de Ag-HBs y anticuerpo anti-HBs así como la existencia de reacciones anti-HBs falsamente positivas. Las pruebas comerciales detectan principalmente los subtipos anti-ad y anti-ay. La presencia de inmunocomplejos circulantes Ag-HBs/anti-HBs ha permitido postular que la aparición de anti-HBs sea muy precoz en el curso de la infección pero que no son detectables por la formación de estos y también implicar al VHB en procesos de base inmunológica tales como la poliartritis nodosa, la glomerulonefritis membranosa en niños y la crioglobulinemia mixta esencial. Es muy posible sin embargo que en la patogenia de estas enfermedades intervengan otros factores, puesto que dada la alta incidencia de formas crónicas de hepatitis B, cabría esperar una mayor presencia de estos procesos.

Otros marcadores:

Ag-HBc (antígeno de la cápside):

El core del VHB se sintetiza en pocos hepatocitos del hígado infectado y es ensamblado en núcleo formando una nucleocápside de 27 nm de diámetro. Una vez ensamblado se recubre con el antígeno de superficie en el citoplasma celular. Es extraordinariamente antigénico y solo es posible hallarlo en el suero del enfermo formando parte de la partícula de Dane o por separación de su anticuerpo con el que puede formar inmunocomplejos circulantes. En las hepatitis crónicas persistentes, se ha encontrado este antígeno casi exclusivamente en el núcleo del hepatocito, mientras que en las formas crónicas activas puede encontrarse también en el citoplasma de las células hepáticas.

ADN-VHB:

Es el marcador más temprano pudiéndose detectar desde el periodo de incubación hasta que el aumento de las ALT se detiene, momento en el que su concentración comienza a declinar. Los niveles de ADN se correlacionan con la evolución de la lesión hepática y la respuesta al tratamiento. El ADN del VHB solo ha sido detectado de forma excepcional en algunos pacientes con todos los marcadores negativos y la PCR es tan sensible que puede detectar secuencias de ADN-VHB en el hígado de pacientes ya curados.

3.2 EVOLUCIÓN SEROLÓGICA DE LA HEPATITIS AGUDA Y CRÓNICA

En un caso típico de hepatitis aguda por VHB, el Ag-HBs aparece de 2-6 semanas antes del comienzo de los síntomas o de la evidencia bioquímica de hepatitis. Los niveles se hacen indetectables en los siguientes 4-6 meses. También aparecen niveles elevados de anticuerpos de tipo Ig-M contra la proteína del core de 27 nm que coincide con el comienzo de la elevación de los niveles de ALT (Gerlich et al., 1980). La aparición de Ig-M anti-HBc es indicativo de replicación viral y desaparece con la recuperación, al contrario que la IgG anti-HBc que generalmente persiste toda la vida. Durante el estadio temprano de convalecencia y antes de que el Ag-HBs desaparezca, el anti-HBe reemplaza al Ag-HBe y nos indica que hay una reducción de la replicación viral y es el comienzo de la recuperación de la enfermedad. Al final de la infección desaparece el Ag-HBs y aparece el anti-HBs que generalmente persiste toda la vida en el 80% de los pacientes.

Aquellos pacientes con hepatitis aguda que mantienen en su suero el Ag-HBs dentro de un estrecho rango durante toda la infección o a aquellos en los cuales el Ag-HBe persiste de 8 a 10 semanas después de que los síntomas desaparezcan se convierten en los pacientes llamados portadores. El riesgo de desarrollar enfermedad crónica en este grupo es alto. Por consenso los portadores se definen por la persistencia del Ag-HBs y anti-HBc más allá de 6 meses en presencia o ausencia de Ag-HBe o anti-HBe. En aproximadamente el 3-5% de los portadores el anti-HBs también se puede detectar en bajas concentraciones. Algunos de estos pacientes tienen una enfermedad hepática más seria.

4. TRATAMIENTO

Los propósitos del tratamiento de la hepatitis crónica B son: eliminar la infectividad y por lo tanto impedir la transmisión; detener la progresión del daño hepático, mejorar el cuadro histológico y evitar que se desarrolle el carcinoma hepatocelular.

No está claro si se puede llegar a erradicar el virus totalmente debido a la dificultad para eliminar el ADNccc (ADN circular covalentemente cerrado) en el hígado y debido a la existencia de reservorios extrahepáticos del VHB. Tampoco se sabe bien si la erradicación viral es necesaria para evitar la progresión de la enfermedad a cirrosis y al desarrollo de hepatocarcinoma. Actualmente existen algunas terapias aprobadas en la mayoría de los países: interferón alfa (IFN- α), Lamivudina (3TC) y famciclovir. Existen otras terapias nuevas que todavía se están evaluando en ensayos clínicos (adefovir).

Tradicionalmente las indicaciones para tratar la infección crónica son la evidencia de replicación viral (Ag-HBe positivo, ADN-VHB positivo por técnicas de hibridación) y la presencia de enfermedad hepática (niveles anormales de ALT). Se excluyen pacientes con replicación viral pero con niveles normales de ALT (pacientes en fase de inmunotolerancia o que adquirieron la infección perinatal) y pacientes con el VHB mutante precore porque el interferón es menos efectivo en estos pacientes. Tampoco se recomienda el tratamiento en pacientes con cirrosis o en aquellos con Child B o C debido a la baja respuesta y a efectos perjudiciales que se pueden producir.

La disponibilidad de lamivudina ha ampliado las indicaciones para el tratamiento abarcando pacientes con cirrosis clínica o hepatitis recurrente después de un transplante hepático. Aunque la tasa de recaída post-tratamiento es muy alta, los beneficios clínicos e histológicos del tratamiento con lamivudina merecen la pena en pacientes con Ag-HBe negativo que poseen un daño hepático significativo (Tassopoulos et al., 1999).

4.1 INTERFERÓN (INF).

Los interferones son una familia de proteínas que el organismo produce como mecanismo defensivo de primera línea frente a la infección vírica. Sólo el INF alfa, tanto el natural (linfoblastoide) como el recombinante, muestra eficacia terapéutica frente a los virus B y C de la hepatitis. Posee propiedades antiviral, inmunomoduladora y antifibrogénica, las cuales desempeñan una función importante en el tratamiento de la hepatitis crónica viral. En líneas generales, se considera que el efecto predominante del INF en la hepatitis crónica B es inmunomodulador.

Estudios realizados a mediados de los años 1970 muestran los efectos beneficiosos del tratamiento con interferón (Greenberg et al., 1976). Aproximadamente el 25-40% de los pacientes Ag-HBe positivos tratados con interferón de 6 a 12 meses, eliminan de su suero tanto el ADN como el Ag-HBe. El 6 % de estos pacientes pierde el antígeno de superficie. Los pacientes inicialmente respondedores continúan sin evidencia de replicación viral varios años mas tarde (Wong et al., 1993). Los pacientes con Ag-HBe negativo no responden al interferón tan favorablemente como los que presentan Ag-HBe e positivo (Brunetto et al., 1989). Se han encontrado diversos factores que pueden predecir la respuesta favorable al interferón en pacientes antígeno “e” positivos. Entre estos factores se encuentran presencia de niveles altos de ALT y bajos niveles de ADN del VHB, sexo femenino y mayor grado de actividad y fibrosis en la biopsia hepática. Los factores que predicen la respuesta en los pacientes que presentan antígeno “e” negativos están menos claros. El 40-60% de los pacientes antígeno “e” negativo son respondedores durante la terapia pero al menos la mitad de ellos recae cuando se retira el tratamiento, e incluso pueden recaer al cabo de unos meses e incluso años después de la terapia (Lok et al, 2001). En niños mayores de 2 años está aprobado el empleo del interferón y se produce la pérdida del antígeno “e” en un 23% de los niños tratados respecto a un 11% en los no tratados. La pérdida del antígeno de superficie sucede en 1,5% de los niños tratados. Los factores que correlacionan con una mejor respuesta son similares a los de los adultos es decir altos niveles de ALT, bajos niveles de ADN y sexo femenino (Sokal et al., 1998).

Las diferencias en la tasa de respuesta al tratamiento con interferón que se han observado en las distintas partes del mundo podrían deberse a diferencias en la

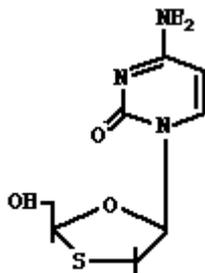
respuesta del hospedador, al genotipo viral o depender del momento en el que se ha adquirido la infección (infancia o adulto). Estos aspectos todavía no están claros.

4.2 LAMIVUDINA (3TC)

El tratamiento de la hepatitis B crónica con interferón solo resulta efectiva en el 30-50% de los pacientes. Es más, la terapia con interferón tiene una aplicabilidad limitada y presenta efectos secundarios indeseables. Se ha descubierto un nuevo análogo de nucleósido con potente actividad contra el virus de la hepatitis B y con baja toxicidad en el hombre denominado 3TC.

3TC (2',3'-didesoxi-3'-tiacitidina) es un análogo de nucleósido con capacidad para inhibir la replicación del VHB y del VIH. Es el enantiómero negativo de la 2'-desoxi-3'-tiacitidina.

Su mecanismo de acción es igual al de los otros análogos nucleósidos, necesitando una trifosforilación intracelular para alcanzar su forma activa. Posee una semivida intracelular de unas 12 h, y actúa inhibiendo a la polimerasa viral de un modo competitivo, haciendo que termine precozmente la elongación de las cadenas de ADN viral.



3TC

Figura 5. Estructura molecular de 3TC.

Los niveles elevados de ALT y el ADN-VHB bajo al inicio del tratamiento correlacionan con la pérdida del Ag-HBe. No está muy clara la duración de la respuesta al tratamiento. Aquellos pacientes que no negativizan su Ag-HBe durante el tratamiento con lamivudina recaen cuando se interrumpe la terapia, con el consiguiente aumento de los niveles de ADN viral e incremento de los valores de ALT al nivel pretratamiento.

La terapia con lamivudina antes y después del trasplante es una buena terapia pero se ha asociado con recaídas en mutantes de la polimerasa del VHB.

Al igual que el interferón, la lamivudina no está indicada en pacientes con replicación viral alta con niveles de ALT normales debido a la baja tasa de respuesta.

En los pacientes infectados con la variante mutante pre-core, la terapia con lamivudina durante 12 meses también está asociada con la supresión del ADN del VHB, normalización de los niveles de ALT y mejoría de la histología hepática en aproximadamente el 60% de los pacientes (Tassopoulos et al., 1999). En los pacientes con trasplante hepático y recidiva viral, la terapia con lamivudina durante 52 semanas permite suprimir la replicación viral en un 60% de los pacientes (Perrillo et al., 1999).

4.3 FAMCICLOVIR

Estructura: diacetil ester del 9-(4-hidroxi-3-hidroximetil-but-1-yl)-6-deoxiguanidina (FCV), Famvir. Mecanismo de acción: es la prodroga oral del penciclovir, en la cual se convierte por hidrólisis de los dos grupos acetilo y oxidación en la posición 6. Se administra oralmente a 750, 1500 o 2250 mg al día.

El famciclovir inhibe la replicación del VHB pero sus efectos suelen ser transitorios y el efecto antiviral comparado con otros tratamientos como Lamivudina y adefovir dipivoxil es más débil.

4.4 ADEFOVIR

El adefovir dipivoxil es un análogo de nucleótido con potente actividad contra el VHB, buena absorción oral y una vida media que permite una dosificación única. Presenta actividad contra el VHB salvaje y contra el mutante resistente a lamivudina (Ono-Nita et al, 1999), pero todavía permanece por determinar la duración de la respuesta y la seguridad de una terapia prolongada.

4.5 EMTRICITABINA Y CLEVUDINA

La emtricitabina (FTC) es un análogo de nucleósido con actividad antiviral contra el VHB y el VIH (Korba et al., 2000). Posee estructura química similar a lamivudina por lo que se podrían esperar resistencias cruzadas.

Clevudina (L-FMAU) es un análogo de pirimidina con marcada actividad in vitro contra el VHB pero no contra el VIH. El trifosfato activo inhibe la ADN

polimerasa del VHB pero no es un terminador de cadena obligatoriamente. El L-enantiómero de la clevidina, que no es la forma natural, no presenta toxicidad celular o mitocondrial. Pero todavía se están planeando los estudios pilotos sobre este antiviral (Marcellin et al., abstract, 2001).

5. RESISTENCIA DEL VHB AL TRATAMIENTO CON ANTIVIRALES

5.1 DEFINICIÓN DE RESISTENCIA

Un problema importante de la terapia antiviral contra el VHB es la persistencia viral y resistencia a los análogos de nucleósidos. Uno de los mecanismos implicados en la persistencia viral es la variabilidad del genoma del virus. El VHB replica su genoma mediante un paso de reversotranscripción (Summers and Mason, 1982) y la tasa de error espontáneo de la reversotranscriptasa da lugar a la producción de mutaciones que pueden acumularse y seleccionarse durante el curso de la infección. Debido a la cinética de la replicación viral con una alta tasa de producción de virus, la relativamente larga vida media del virus en el suero y en hepatocitos infectados, y la persistencia del ADN circular covalentemente cerrado (ADNccc) en el núcleo de los hepatocitos, es necesaria una terapia de larga duración con un inhibidor de la reversotranscriptasa para erradicar la infección viral (Nowak et al., 1996; Moraleda et al., 1997; Mason et al., 1998). La terapia con lamivudina se asocia con la resistencia viral y se describió por primera vez en pacientes que recibían terapia inmunosupresora después de un trasplante ortotópico de hígado (Ling et al., 1996; Tipples et al., 1996).

En los pacientes inmunocompetentes la selección de cepas resistentes a lamivudina causantes del fallo en la terapia antiviral en la hepatitis crónica B se observa en aproximadamente 16-43% de los pacientes tratados durante un año (Lai et al, 1998; Dienstag et al., 1999). La resistencia se asocia con una elevación del ADN del virus por encima del límite de detección de la técnica, lo cual se denomina comúnmente resistencia fenotípica. La aparición de la resistencia del virus puede aparecer después de los 6 meses de tratamiento y se incrementa con la duración del tratamiento. A pesar de la resistencia fenotípica, los niveles del ADN del VHB y los niveles de ALT permanecen bajos en comparación con los niveles basales. En la mayoría de estos pacientes, la resistencia a lamivudina no se asocia con empeoramiento clínico o histológico (Lai et al., 1998). Sin embargo, algunos pacientes muestran deterioro clínico con fallo hepático, especialmente en el marco del trasplante hepático (Locarnini et al., 1997 de Man et al., 1998).

5.2 BASES MOLECULARES

Se ha detectado un VHB mutante en el gen de la ADN polimerasa asociado al tratamiento prolongado con lamivudina (Bartholomew et al., 1997). La base molecular de este hallazgo es una mutación en el motivo YMDD (tirosina, metionina, aspartato, aspartato) del dominio C de la ADN polimerasa del VHB (Tipples et al., 1996). Este dominio también está presente en las polimerasas de retrovirus y se considera altamente conservado. La sustitución del aminoácido Metionina por Isoleucina o por Valina provoca la indeseada resistencia al tratamiento con Lamivudina y Famciclovir.

Genotipo	Dominio C	Nucleótidos
SALVAJE	YMDD	TAT ATG GAT GAT
MUTANTE (M552V)	YVDD	TAT GTG GAT GAT
MUTANTE (M552I)	YIDD	TAT ATT GAT GAT

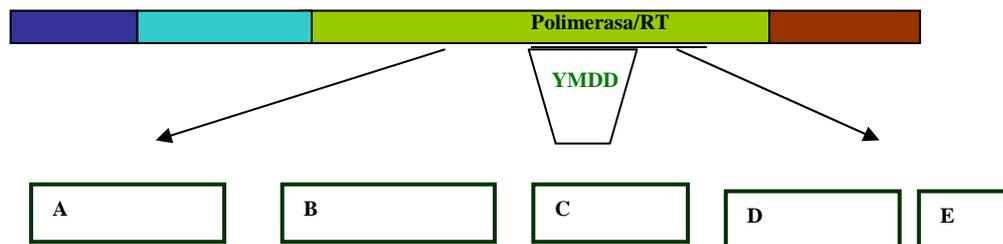


Figura 6. Representación esquemática del gen de la polimerasa del VHB. Dominios A-E de la polimerasa del VHB.

Asociada a esta mutación se encuentra otra en el aminoácido 528 del gen de la polimerasa que se produce por una sustitución de Leucina por Metionina. Esta mutación se encuentra localizada dentro del dominio B de la polimerasa viral.

El dominio YMDD está implicado en la unión del nucleótido al sitio catalítico de la polimerasa (Poch et al., 1989). Por este motivo los mutantes YVDD e YIDD muestran reducida capacidad de replicación en comparación con el genotipo salvaje YMDD (Melegari et al., 1998) debido a que estas mutaciones alteran las propiedades de la reverso transcriptasa.

Los mutantes resistentes a Lamivudina se han clasificado en dos grupos:

- Grupo I : este grupo presenta mutaciones solamente en el dominio C del gen de la polimerasa (M552I)
- Grupo II : presentan mutaciones en el dominio C y B del gen de la polimerasa (M552V + L528M) (Fabien et al., 1998).

La sustitución de la Metionina por Isoleucina en la posición 552 (M552I) aparece independientemente de otros cambios, mientras que la sustitución M552V se asocia siempre con la L528M. La combinación de L528M y de M552V produce un nivel intermedio de replicación comparada con otras mutaciones aisladas (Ling and Harrison 1999). Se ha sugerido que la aparición de las dos mutaciones asociadas se debe a que las dos regiones se encuentran sometidas a restricciones funcionales o estructurales. La mutación M552I presenta un bajo nivel de replicación (Hubert et al., 1998).

Se ha propuesto una nomenclatura no dependiente del genotipo viral para numerar estas mutaciones (Stuyver et al., 2001). La mutación M552V/I se denomina rtM204V/I y la mutación L528M se denomina rtL180M.

5.3 DINÁMICA DE LAS MUTACIONES

Se pueden detectar mutaciones silentes en los pacientes al principio del tratamiento con lamivudina. Sin embargo, pueden pasar hasta 68 semanas hasta la detección de las mutaciones asociadas realmente con la resistencia al tratamiento. Algunos autores sostienen que la mutación M552I es la primera en aparecer y que resulta ser un paso intermedio durante la emergencia de la resistencia, es decir, de la mutación M552V. Por lo tanto, debería considerarse como una señal de alarma en el seguimiento de los pacientes sometidos a tratamiento con lamivudina (Bernhard et al., 2000).

6. MÉTODOS DE ANÁLISIS MOLECULAR DEL VHB

6.1 MÉTODOS EMPLEADOS PARA EL GENOTIPADO DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B BASADOS EN EL ANÁLISIS DEL GENOMA.

La forma más fidedigna de genotipar el virus es por secuenciación directa de todo el genoma y análisis filogenético de las secuencias ya descritas.

Además de la secuenciación del genoma completo se han diseñado diversos métodos de genotipado más sencillos y rápidos que permiten realizar estudios a gran escala. Algunos de estos métodos se comentan a continuación.

6.1.1 SECUENCIACIÓN DIRECTA DE UNA PARTE O DE LA TOTALIDAD DEL GENOMA.

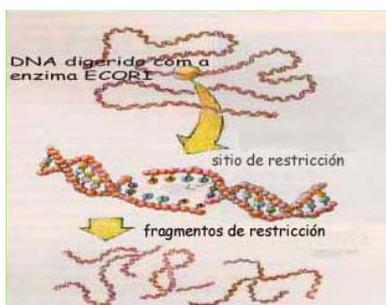
La clasificación del virus de la hepatitis B en sus distintos genotipos se debe al desarrollo de las técnicas de secuenciación. Para ello se realiza la secuenciación del genoma completo. Esta clasificación se estableció mediante la observación del alineamiento de las secuencias correspondientes a los genomas completos una divergencia intergrupo de más del 8% del genoma total. También se pueden diferenciar los distintos genotipos del virus en base a sus divergencias nucleotídicas en el gen de superficie, considerándose como pertenecientes al mismo genotipo aquellos virus cuya secuencia de nucleótidos del gen de superficie no difiera en más del 4% (Arauz-Ruiz et al., 1997). Secuenciar el genoma completo del virus o incluso secuenciar un solo gen, como el gen de superficie (Sánchez et al., 2002; López et al., 2002), es una tarea laboriosa y costosa, por lo tanto, habitualmente se emplea en menor medida la secuenciación directa para estudios a gran escala.

La técnica más empleada para la secuenciación, denominada método enzimático o de los dideoxynucleótidos, fue puesta a punto por Sanger, Nicklen y Coulson (Sanger et al., 1977). En este método, una ADN polimerasa sintetiza las cadenas complementarias de una de las hebras del ADN problema, en cuatro reacciones enzimáticas distintas. En cada reacción, junto con el oligonucleótido utilizado como cebador de la reacción de polimerización y la mezcla de los cuatro nucleótidos (dATP+dCTP+dGTP+dTTP), se encuentran presentes cantidades no saturantes del 2'-3'-dideoxynucleótido (ddNTP) correspondiente (ddATP, ddCTP, ddGTP o ddTTP) que al carecer de radical hidroxilo en la posición 3', no permitirá la incorporación de otro

6.1.2 ANÁLISIS BASADOS EN LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA-POLIMORFISMOS DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (PCR-RFLP).

Esta técnica se basa en el empleo de enzimas de restricción. Existen dos tipos de enzimas de restricción: enzimas de restricción de tipo I y enzimas de restricción de tipo II. En biología molecular se usan las enzimas de restricción de tipo II ya que la secuencia de reconocimiento y restricción es la misma. Estas enzimas reconocen secuencias específicas formadas por cuatro, cinco o seis pares de bases. Algunas pueden reconocer secuencias más largas o secuencias degeneradas. Estas secuencias son palindrómicas y alguna de las bases puede estar metilada por una metilasa bacteriana. Cuando dos enzimas de restricción reconocen la misma secuencia se denominan isoesquizómeros.

Los enzimas de restricción pueden producir diferentes tipos de corte. Algunas enzimas cortan ambos extremos exactamente en la misma posición sobre las dos cadenas de ADN, generando fragmentos que tendrán extremos romos. Estos extremos se pueden unir mediante la acción de otro enzima, la ADN ligasa del bacteriófago T4. La eficacia de la reacción es algo más baja que para extremos cohesivos. Los extremos romos pueden unirse a otros extremos romos y también a extremos protuberantes 3' o 5'. Otras enzimas de restricción cortan cada cadena en posiciones similares en sitios opuestos al eje de simetría, creando fragmentos de ADN que tendrán extremos de cadena simple complementaria, *extremos cohesivos o pegajosos*. La unión de ADN con extremos protuberantes que no son compatibles se puede llevar a cabo rellenando el extremo 3' (por el fragmento Klenow de la ADN polimerasa de E. Coli).



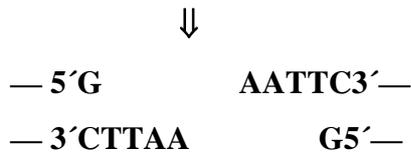


Figura 8. Ejemplo de corte con el enzima de restricción EcoRI.

Para establecer un patrón de digestión se digiere el ADN después de realizar una amplificación del fragmento de interés con el enzima o enzimas de restricción. Posteriormente se realiza una electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida para visualizar los diferentes fragmentos producidos en la digestión. A cada genotipo le corresponde un patrón de digestión que es característico de la región de estudio.

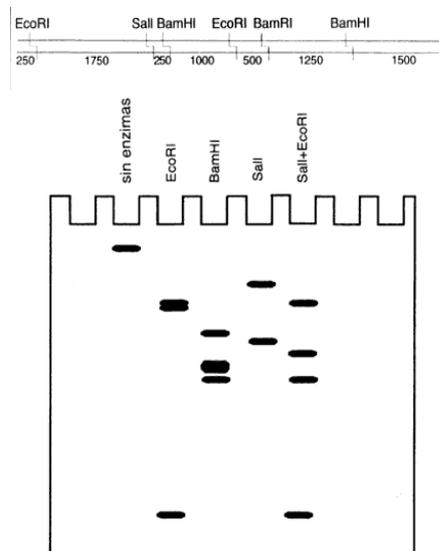


Figura 9. Proceso de digestión del ADN con varios enzimas de restricción y electroforesis de los fragmentos obtenidos.

El sistema de genotipado basado en el análisis de polimorfismos de fragmentos de restricción es el método empleado con más frecuencia por los investigadores ya que es rápido y está al alcance de cualquier laboratorio ya que no requiere una tecnología costosa.

Son varios los autores que han diseñado métodos de genotipado basados en el análisis de fragmentos de restricción (Lindh et al.,1996; 1998). Estos métodos son revisados con frecuencia ya que se han ido describiendo nuevos genotipos del virus y no todos los sistemas de genotipado basados en RFLP nos permiten genotipar el 100% de los virus.

6.1.3 ANÁLISIS MEDIANTE AMPLIFICACIÓN CON CEBADORES ESPECÍFICOS DE GENOTIPO.

Se han descrito diversos métodos basados en la amplificación de una región del genoma del virus empleando cebadores específicos de cada genotipo viral diseñados en base a divergencias de secuencias en la región seleccionada para el estudio (Repp et al., 1993; Naito et al., 2001). Algunos de estos análisis se centran en el estudio de la región pre-S del genoma o del gen S y para el diseño de los cebadores específicos se basan en diferencias de tamaño del amplificado. Estos métodos no requieren instrumentación específica y se pueden realizar en cualquier laboratorio.

6.1.4 ENSAYOS DE HIBRIDACIÓN CON SONDAS

Este sistema se basa en el principio de hibridación reversa. Está designado para identificar siete genotipos del VHB (A-G) detectando regiones específicas dentro de la región que codifica para la polimerasa viral mediante el empleo de sondas específicas situadas en paralelo absorbidas a una membrana (INNO-LiPA HBV genotyping).

6.2 OTROS MÉTODOS DE GENOTIPADO

6.2.1 DETECCIÓN SEROLÓGICA DE GENOTIPOS DEL VHB

Este sistema se basa en el empleo de ELISA (enzimoinmunoanálisis) para detectar los genotipos de la A a la F del VHB. Se emplean anticuerpos monoclonales, marcados con peroxidasa, contra epítopes específicos de genotipo producidos por la expresión de la región pre-S2 (Sadakazu et al., 1999). Se evalúa la actividad de los anticuerpos monoclonales específicos de genotipo. Este sistema de genotipado se evaluó de acuerdo con el genotipo determinado mediante el análisis del gen S.

6.3 MÉTODOS EMPLEADOS PARA LA DETECCIÓN DE MUTACIONES QUE CONFIEREN RESISTENCIA AL TRATAMIENTO CON ANTIVIRALES

6.3.1 SECUENCIACIÓN

Los mutantes resistentes al tratamiento con lamivudina se pueden detectar secuenciando directamente las regiones implicadas en la aparición de la resistencia. La región implicada en la aparición de resistencias está perfectamente localizada. Se trata

de una región en el dominio C del gen que codifica para la polimerasa viral denominado motivo YMDD (tirosina, metionina, aspartato, aspartato). Una sustitución en un nucleótido origina un cambio de aminoácido. Se produce el cambio de la metionina por Isoleucina o por Valina, lo cual induce la resistencia al tratamiento con lamivudina. Corriente arriba de esta región se encuentra asociada otra mutación en el aminoácido 528 de la polimerasa. Así pues, con la secuenciación de un corto fragmento del gen de la polimerasa viral podemos detectar los mutantes resistentes.

La base para la separación de los distintos fragmentos en la secuenciación son los geles de poliacrilamida y los secuenciadores automáticos que poseen sistemas láser para la detección de estos fragmentos. Algunos instrumentos permiten realizar gran cantidad de reacciones de secuencia en relativamente poco tiempo, con lo se facilita el uso de estas técnicas en el diagnóstico clínico.

6.3.2 AMPLIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (PCR-RFLP).

Diversos autores han diseñado métodos para la detección de resistencias al tratamiento basados en los cortes específicos producidos por los enzimas de restricción (Jardi et al., 1999; Allen et al., 1999, Chayama et al., 1998). En el método descrito por Jardi et al., 1999, se emplean los enzimas de restricción *FolKI* para identificar la variante salvaje (YMDD), *SspI* para identificar la variante mutante YIDD y *Alw44I* para identificar la variante mutante YVDD. De la misma manera, otros autores emplean enzimas de restricción diferentes con el mismo propósito.

6.3.3 HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

Se trata de un sistema de hibridación con sondas (Stuyver et al., 2000b) que se emplea actualmente para la detección de resistencias al tratamiento con lamivudina.

Este método estudia las posiciones correspondientes al aminoácido 528, 552 y 555 del gen de la polimerasa viral que son los lugares en donde asientan las mutaciones que confieren resistencia al tratamiento con lamivudina. También se detectan cambios en las posiciones 171, 172, 195, 196, 198 y 199 del antígeno de superficie.

6.3.4 CHIP DE ADN

El Chip de ADN o DNA-Microarray consiste en una superficie pequeña, habitualmente de cristal o de silica de aproximadamente 1 cm², la cual está recubierta

por cientos de oligonucleótidos diferentes, cada uno localizado en un lugar específico del Chip. Cada oligonucleótido está representado en el Chip como millones de copias. Estos chips se usan en reacciones de hibridación para detectar los ácidos nucleicos generados a partir de una muestra mediante una técnica de amplificación (RT-PCR, PCR). El empleo de Chips de ADN se está extendiendo en el campo del diagnóstico microbiológico debido a la rapidez de obtención de resultados. Debido a la aparición de resistencias durante la terapia antiviral esta técnica resulta ser una herramienta muy útil en la detección de mutaciones. Todavía no se está usando esta metodología en el estudio del VHB, pero sí para detectar resistencias del VIH (Gunthard et al., 1998).

7. EPIDEMIOLOGÍA

▪ Vías de transmisión del VHB.

La fuente de infección del virus es normalmente la sangre, pero se ha detectado en otras secreciones y excreciones, incluidas semen, saliva o fluidos nasofaríngeos y fluido menstrual. No existe evidencia de que puedan suceder las infecciones por el aire. Las heces no se han considerado como fuente de infección, posiblemente porque el virus es inactivado por los enzimas presentes en la mucosa intestinal o derivados de la flora bacteriana. Por lo tanto las principales vías de transmisión son las siguientes:

- Percutánea:
 - Agujas contaminadas (uso de drogas vía parenteral y exposición por la actividad profesional).
 - Hemodiálisis.
 - Mordedura humana.
 - Transplante o transfusión de sangre o productos hemoderivados no seleccionados.
 - Acupuntura, tatuajes y perforación corporal (piercing).
- A través de las mucosas:
 - Relaciones sexuales.
 - Perinatal-niños nacidos de madres infectadas por el VHB.
 - Contacto con objetos domésticos infectados.

A veces el virus está presente en la orina, pero, su presencia probablemente sea de importancia epidemiológica limitada. Puede haber excepciones cuando la persona se ha expuesto crónicamente a pañales infectados o a la orina de pacientes urémicos Ag-HBs positivos bajo hemodiálisis. Los jugos gástricos no son una fuente de VHB, pero se ha detectado el Ag-HBs tanto en la bilis como en el jugo pancreático, a pesar de que estas secreciones inhiben la reactividad del Ag-HBs. También han sido positivas para el Ag-HBs el líquido pleural, cefalorraquídeo, lágrimas y leche materna. Debería asumirse que todos los líquidos biológicos de personas infectados con VHB pueden resultar infecciosos y capaces de transmitir el VHB.

Las mayores concentraciones del VHB se han encontrado en sangre e hígado, con menores cantidades presentes en saliva y semen. También se ha detectado en los acinos pancreáticos, epitelio de los conductos biliares, endotelio y células de músculo liso, tejido corneal, células linfoblastoides y células mononucleares de sangre periférica. La ruta más eficiente de transmisión es la introducción percutánea del virus. Por el contrario, la transmisión oral o sexual probablemente requiere grandes cantidades del virus (ej. portadores Ag-HBe positivos).

▪ **Grupos de riesgo**

- Contactos sexuales con personas infectadas de forma aguda o crónica.
- Drogadictos por vía parenteral (ADPV).
- Personas con múltiples parejas sexuales o con historia de enfermedades de transmisión sexual.
- Niños nacidos de madres infectadas por el VHB.
- Individuos que tienen contactos con sangre por motivos profesionales (trabajadores en el ámbito médico y dental, personal de laboratorio y de mantenimiento, empleados de servicios públicos).
- Receptores de sangre no seleccionada o productos hemoderivados inactivados.
- Pacientes en hemodiálisis (debido a una esterilización insuficiente del equipo, no a la sangre).
- Contactos domésticos de individuos infectados por el VHB.

- Poblaciones reclusas (prisiones e instituciones para personas discapacitadas).
- Personas nacidas en áreas endémicas para el VHB (es decir, África, Asia, Europa del Este y Sudamérica).

▪ **Incidencia y prevalencia.**

El virus de la hepatitis B es un organismo que se encuentra mundialmente distribuido. Aunque el Ag-HBs se ha detectado en el suero de ciertas especies de primates no humanos, los humanos continúan siendo el principal reservorio para el VHB.

La tasa de portadores Ag-HBs varía de una ciudad a otra. La prevalencia del Ag-HBs es menor en ciudades con alto nivel de vida, como Canadá, Estados Unidos, Escandinavia y algunas naciones europeas. Por el contrario tasas muy altas (5-20%) se encuentran en China, África, Oceanía y Sur del Pacífico, Oriente Medio y algunas partes de América del Sur.

En áreas endémicas de Asia y África, los patrones epidemiológicos de infección son bastante diferentes de los observados en América del Norte y Europa Occidental. La mayoría de las infecciones en estas áreas geográficas ocurren en niños como resultado de la transmisión materno-neonatal y el contacto cercano en la infancia.

Aproximadamente el 45% de la población vive en áreas donde la prevalencia de la infección crónica es alta, el 43% vive en áreas donde la prevalencia es moderada (2 al 7% de la población es Ag-HBs positiva), y el 12% vive en áreas de baja endemicidad (<2% de la población es Ag-HBs positiva).

En áreas de alta endemicidad, el riesgo de infección es mayor del 60% y la mayoría de las infecciones ocurren al nacer o durante la infancia, cuando el riesgo de la infección crónica es mayor. Debido a que la mayoría de las infecciones en la niñez son asintomáticas, hay poca detección de la fase aguda, pero las tasas de enfermedad hepática crónica y de cáncer hepático son altas. Áreas de alta endemicidad incluyen la mayoría de Asia (excepto Japón y la India).

La detección de marcadores serológicos muestra que la prevalencia del VHB varía enormemente entre las áreas geográficas y subgrupos de población. Pueden distinguirse 3 patrones principales de endemicidad:

- **Endemicidad elevada** – La hepatitis B es altamente endémica en regiones en desarrollo con densidades de población elevadas como el sureste asiático, zonas de China, África sub-Sahariana y la cuenca del Amazonas. En estas áreas, el 70-95% de la población muestra evidencia serológica de infección por VHB actual o previa. La mayoría de las infecciones ocurren durante la lactancia o infancia; por lo tanto, las tasas de portadores son también elevadas, en un 8–20% de la población (Dienstag et al., 1984).

- **Endemicidad intermedia** – En áreas de Europa del sur y oriental, Medio Oriente, Japón, África del Norte, América Central y Latinoamérica, el 20–55% de la población tiene marcadores de infección por el VHB, y el 2–7% son portadores. Existe una proporción elevada de infección en los niños, pero la infección en adultos también es bastante común (Toukan et al., 1990).

- **Endemicidad baja** – La endemicidad del VHB es baja en América del Norte, Europa del norte, y Europa Occidental, y Australia. En estas regiones, el VHB infecta al 4–6% de la población. La enfermedad afecta más frecuentemente a adolescentes y adultos jóvenes; el 0.5–2% de la población son portadores crónicos (McQuillan et al., 1989).

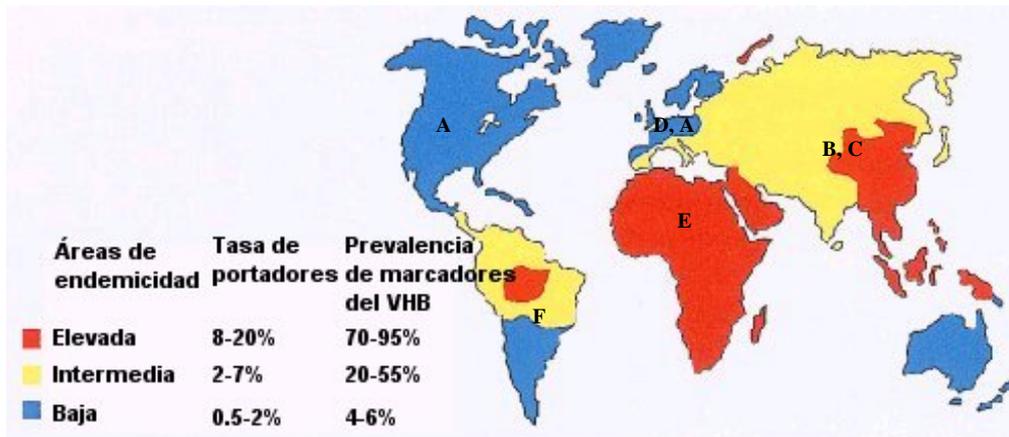


Figura 10. Distribución geográfica de la infección crónica por VHB. Se observan sobreimpresos los genotipos predominantes en las distintas áreas.

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

Las diferencias en la evolución de la infección por el virus de la hepatitis B, así como la diferente tasa de respuesta al tratamiento, parecen deberse principalmente a factores relacionados con la respuesta del huésped a la infección y también, a la variabilidad del virus, es decir, al genotipo viral. Estos aspectos todavía no están claros, de ahí la importancia de ampliar nuestros conocimientos sobre la variabilidad genética del virus. El creciente interés por genotipar el virus de la hepatitis B se debe a las posibles implicaciones en la patogénesis viral y también a la posible influencia del genotipo en la respuesta al tratamiento con antivirales.

Para el estudio del genotipo del virus de la hepatitis B se han descrito diversos métodos. Nuestro objetivo es comparar algunos de estos métodos de genotipado y, como resultado de este estudio, determinar la prevalencia de los distintos genotipos ya que existen pocos trabajos sobre su variabilidad genética en nuestro medio. Paralelamente hemos diseñado otro sistema de genotipado basado en la secuenciación de una corta región del gen de la polimerasa viral.

Por tanto, y en lo que se refiere al apartado metodológico relativo al genotipado del virus nuestros objetivos son los siguientes:

- Estudio de la variabilidad genética del VHB mediante la aplicación de un método de genotipado basado en el análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) de la región pre-S del gen de superficie.
- Aplicación de un sistema de genotipado basado en el empleo de cebadores específicos de genotipo (PCR múltiple).
- Diseño de un método de genotipado basado en el análisis mediante secuenciación directa de una pequeña región del gen de la polimerasa viral implicada en el desencadenamiento de resistencias del VHB al tratamiento con lamivudina.
- Aplicación de un método de genotipado basado en hibridación con sondas de ácidos nucleicos.

- Comparación de los cuatro métodos de genotipado empleados en el estudio.

Teniendo en cuenta los resultados del análisis comparativo de los distintos métodos de genotipado pretendemos:

- Establecer la prevalencia de genotipos del virus de la hepatitis B en nuestro área.
- Determinar la prevalencia de genotipos según el estado serológico del paciente Ag-HBe/anti-HBe.

Por otro lado, algunos pacientes sometidos a tratamiento con Lamivudina desencadenan resistencias durante el periodo de tratamiento debido a la emergencia de la variante VHB mutante. En este estudio también pretendemos:

- Detectar las resistencias del virus al tratamiento con Lamivudina mediante secuenciación de la región en donde se encuentran localizadas las principales mutaciones que confieren la resistencia.
- Comparación de los métodos de secuenciación de la región implicada en la resistencia al tratamiento con lamivudina y el sistema LiPA (Line Probe Assay-LiPA) para la detección de dichas resistencias.
- Relación del genotipo con la aparición de resistencias al tratamiento con lamivudina.

MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. PACIENTES:

Se han recogido 250 muestras de suero correspondientes a 121 pacientes procedentes del Servicio de Medicina Interna y del Servicio de Digestivo del Hospital Clínico de Santiago de Compostela entre los años 2000 y 2002.

Los sueros de estos pacientes se almacenaron a -20 °C hasta su procesamiento. Los pacientes se dividen en los siguientes grupos:

- Grupo 1: formado por 101 pacientes con infección por el VHB de los cuales 25 son mujeres y 76 son hombres. De los 101 pacientes, 96 presentan infección crónica por VHB, considerándose como tales, aquellos pacientes que presentan persistencia del Ag-HBs y ADN-VHB durante un periodo superior a 6 meses. Los restantes pacientes presentaron una infección aguda negativizándose el antígeno de superficie a los pocos meses de la detección de la infección.
- Grupo 2: formado por 20 pacientes como grupo control. Son pacientes sin alteraciones analíticas y seronegativos para los principales virus hepatotropos (A, B y C), y VIH. Los sueros de estos pacientes son procesados como controles negativos junto con los sueros de los pacientes infectados.

Dentro del grupo de estudio se incluyen 27 pacientes que se encuentran a tratamiento, de los cuales 11 pacientes son anti-HBe positivos y 16 son Ag-HBe positivos.

Estudio serológico de los virus hepatotropos:

Para el estudio serológico de los pacientes se emplea la tecnología de enzimoimmunoensayo de micropartículas (MEIA) con el analizador AXSYM, (Abbott Illinois, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. De esta forma se analizan los marcadores serológicos: anti-VHA, Ag-HBs, anti-HBs, anti-HBc totales, Ag-HBe, anti HBe, anti-HBc IgM, anti-VHC y anti-VIH. Todos los pacientes, excepto el grupo control, son Ag-HBs positivos.

Cuantificación del ADN-VHB:

Para la cuantificación del ADN del virus se emplea la técnica del ADN-ramificado (Quantiplex, Chiron, USA). Consiste en la hibridación de ácidos nucleicos con posterior amplificación de la señal.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIALES COMUNES EMPLEADOS EN LAS TÉCNICAS DE GENOTIPADO Y DETECCIÓN DE RESISTENCIAS:

- Para la extracción del ADN se emplea el sistema automático Extractor (Organon Technica). Está basado el método descrito por Boom et al., 1990.
- Las reacciones de amplificación se llevan a cabo con reactivos de Promega: PCR Core Kit:
 - dNTPs 40 mM (10mM de cada uno de los dATP,dCTP,dGTP y dTTP).
 - ADN Taq polimerasa almacenada en tampón B: 5 unidades/uL; 20mM Tris-HCL (pH 8.0 a 25°C), 100mM KCL, 0,1 EDTA, 1mM DTT, 50% glicerol, o,5% Tween®20 y 0,5% de Nonidet®P40.
 - Tampón 10X , con 15mM de MgCL₂.
 - H₂O libre de nucleasas.
 - Todos los iniciadores de cadena han sido sintetizados por Invitrogen (LifeTechnologies).
- "TaqBead Hot Start polimerasa" (Promega): esta polimerasa está embebida en una película de parafina. Cada bola contiene 1,25 U de polimerasa.
- Termociclador Perkin Elmer 2400.
- Centrífuga, Microondas.
- Enzimas de restricción: AvaII y MboI (Promega Corporation).
- Tubos eppendorf de 0,5 mL; tubos de 0,2 mL.
- Columnas de purificación de productos de PCR: "QIAquick PCR purification kit", QIAGEN. Con este sistema podemos purificar fragmentos de ADN de cadena sencilla o doble comprendidos entre 100pb-10kb.
- Columnas de purificación de productos de secuenciación AutoSeq™ G-50 (Amersham Pharmacia Biotech).

- Agarosa NuSieve, FMC Bioproducts. Los geles de agarosa se preparan con tampón TAE 1X (TrisAcetatoEDTA (TAE): compuesto por 240 g de Tris Base, 100 ml de EDTA 0,5M y 57 mL de ácido acético glacial, se ajusta a 1 L con agua destilada y el pH se ajusta a 8,5.
- Bromuro de Etidio 10mg/mL, Sigma.
- Tampón de carga 6x, Sigma.
- Marcadores de Peso Molecular (BioRad):
 - "50bp Step Ladder" ,bandas:
50,100,150,200,250,300,350,400,450,500,550,600,650,700,750,800
 - "25 pb Step Ladder" ,bandas:
25,50,75,100,125,150,175,200,225,250,275,300.
 - "100 pb Step Ladder", bandas:
100,200,300,400,500,600,700,800,900,1000,1100,1200
- Transiluminador de luz ultravioleta.
- Cámara fotográfica y carretes de fotografía Kodak.
- Software empleado para el análisis filogenético:
 - para el análisis de las secuencias empleamos el programa OMIGA 2.0.
 - para el estudio de las relaciones filogenéticas entre secuencias se emplea el paquete PHYLIP (Phylogenetic Inference package; Felsenstein,1993).
- Kit de secuenciación, Beckman:
 - ADN polimerasa: AmpiTaq FS
 - Terminadores de cadena (ddUTP, ddGTP, ddCTP, y ddATP), cada uno está marcado con un fluorocromo cuyo espectro de emisión y excitación está cerca del infrarrojo.
 - dNTP mix solution: contiene dITP por lo que la temperatura de extensión debe ser de 60°C en vez de 72°C.
 - Tampón de secuenciación 10X.
 - pUC18: es un plásmido de ADNds de 2685 bp.
 - Cebador de secuenciación -47: 24 pb con 62,5% GC y Tm= 79,8°C
 - Glicógeno: ayuda a precipitar los fragmentos a secuenciar después de la reacción de secuencia.

- Agua estéril: desionizada y esterilizada, no tratada con DEPC (dietilpirocarbonato).
- Tubos estériles eppendorf de 0.5 mL.
- Secuenciador automático con el sistema de ocho capilares: SEQ 2000 Beckman.

2.2 METODOLOGÍA EMPLEADA EN EL GENOTIPADO DEL VHB

De los métodos descritos para el estudio del genotipo del VHB hemos analizado tres de ellos y diseñado un cuarto método de genotipado.

Uno de estos métodos está basado en la obtención de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), otro está basado en una amplificación diferencial con cebadores específicos de genotipo y el tercero se basa en hibridación con sondas de ácidos nucleicos específicas de genotipo. Paralelamente se diseña un método nuevo basado en la secuenciación de un pequeño fragmento del gen de la polimerasa del VHB. En este fragmento se encuentra el motivo YMDD (tirosina, metionina, aspartato, aspartato) que está implicado en el desarrollo de resistencias al tratamiento con lamivudina.

A continuación se describe cada uno de los métodos empleados para genotipar el VHB.

2.2.1 GENOTIPADO DEL VHB BASADO EN AMPLIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (PCR-RFLP).

Este método fue descrito por Lindh et al, 1998. Se basa en el análisis, mediante PCR-RFLP de la región pre-S del gen de superficie del VHB. Para determinar las posiciones que reflejan la variación intergenotípica los autores escogen 51 secuencias publicadas en el National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD (NCBI). Estas secuencias (Tabla1) se utilizaron para construir un árbol filogenético y para predecir el patrón de restricción basado en la región pre-S.

Genotipo	Número de acceso	Autor	Tamaño	Patrón de RFLP
----------	------------------	-------	--------	----------------

			segmento	
A	L13994	Meisel (1993)	479	A1
	S50225	Wands (1992)	480	A1
	Z35717	Plucienniczak (1994)	479	A1
	X70185	Preisler-Adams (1993)	479	A1
	M57663	Estacio (1998)	479	A1
	X51970	Koechel (1990)	479	A1
	V00866	Ono (1993)	458	A3
	X69458	Chirara (1992)	458	A3
	X02763	Valenzuela (1980)	479	A4
B	D00330	Okamoto(1988)	479	B1
	D23678	Okamoto/Horikita(1994)	479	B1
	D23679	Okamoto/Horikita(1994)	479	B1
	D23677	Okamoto/Horikita(1994)	479	B1
	D00329	Okamoto (1988)	479	B1
	M54923	Sastosoeewnjo(1987)	479	B2
	D00331	Okamoto(1988)	479	B3
C	D00630	Ono(1983)	479	C1
	M12906	Kobagashi(1984)	479	C1
	L08805	Ogata(1993)	479	C1
	V00867	Ono(1983)	479	C1
	M38636	Kim(1988)	479	C1
	X14193	Rho(1989)	479	C1
	X75656	Norder(1993)	479	C1
	D12980	Mukaide(1992)	479	C1
	D23684	Okamoto/Horikita(1994)	479	C2
	D23680	Okamoto/Horikita(1994)	479	C2
	X01587	Fujiyama(1983)	479	C2
	M38454	Renbao(1987)	479	C2
	D23681	Okamoto/Horikita(1994)	479	C2
	D23682	Okamoto/Horikita(1994)	479	C3
	D23683	Okamoto/Horikita(1994)	479	C3
	X75665	Norder(1993)	479	C4
	D50489	Uchida(1995)	464	C5
	X46615	Okamoto(1986)	479	C6
D	J02203	Galibert (1979)	446	D1
	X65257	Lai (1992)	446	D1
	X68292	Lai (1992)	446	D1
	X85254	Lai (1995)	446	D1
	X77310	Lai (1994)	446	D1
	X65258	Lai (1992)	446	D1
	Z35716	Plucienniczak (1994)	446	D2
	X72702	Preisler-Adams (1993)	446	D2
	X02496	Bishko (1985)	446	D2
	M32138	Tong (1990)	446	D2
	X65259	Lai (1992)	446	D2
	L27106	Hasegawa (1994)	446	D2
E	X75664	Norder (1993)	476	E1
	X75657	Norder (1993)	476	E2
F	X75658	Norder (1993)	479	F1
	X75663	Norder (1993)	479	F1
	X69798	Schafer/Naumann (1992)	479	F2
G	AB056513	Kato (2001)	476	G
	AB056514	Kato (2001)	467	G
	AB056515	Kato (2001)	470	G
	AB056516	Kato (2001)	479	G

Tabla 1. Secuencias de VHB empleadas para el estudio de los patrones de restricción por Lindh et al 1998.

Debido a la reciente descripción de un nuevo genotipo, el genotipo G del VHB (Stuyver et al., 2000), a diferencia de otros estudios, nosotros incluimos en este secuencias publicadas en la base de datos del NCBI correspondientes a dicho genotipo.

Este sistema basado en RFLP no contempla los posibles patrones correspondientes al genotipo G de los aislados publicados en la base de datos del NCBI. Se considera la región correspondiente al fragmento P1-P2 de las secuencias publicadas y se localizan los puntos de corte para *Ava*II y *Mbo*I con objeto de obtener los hipotéticos patrones correspondientes al genotipo G. Para ello se emplea el programa OMIGA 2.0.

Procedimiento:

Extracción del ADN:

Extracción del ADN de muestras de suero con el sistema semiautomático Extractor de Organon Tecknika.

- A 200 μ L de suero se le añaden 900 μ L de tampón de lisis GuSCN (NucliSens Lysis Buffer).
- Se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Después de la lisis se añade a las muestras 50 μ L de silica y se vortea durante unos segundos.
- Se procesa la muestra según las instrucciones del fabricante en el instrumento (Nuclisens Extractor). Los ácidos nucleicos se unen a las partículas de silica, las cuales son inmovilizadas en un cartucho desechable. Posteriormente se lava con diferentes solventes: tampón de lavado (GuSCN), etanol al 70% y acetona. Después del secado, los ácidos nucleicos se liberan de las partículas de silica mediante la adición del tampón de elución.

Reacción de amplificación:

Se emplean los cebadores genéricos (P1 y P2) para la reacción de amplificación descritos por Lindh et al, 1998.

Tabla 2. Cebadores empleados en el método de RFLP.

Nombre	Posición (nt)	Secuencia
P1 (Sentido)	2823-2845	5'-TCACCATATTCTTGGAACAAGA-3'
P2 (Antisentido)	80-61	5'-TTCCTGAACTGGAGCCACCA-3'

La secuencia del cebador P1 se encuentra localizada a pocas bases corriente arriba del codón de inicio de la región pre-S1 (nt 2823-2845) y la secuencia del cebador P2 se encuentra localizada en la mitad de la región pre-S2 (nt 80-61).

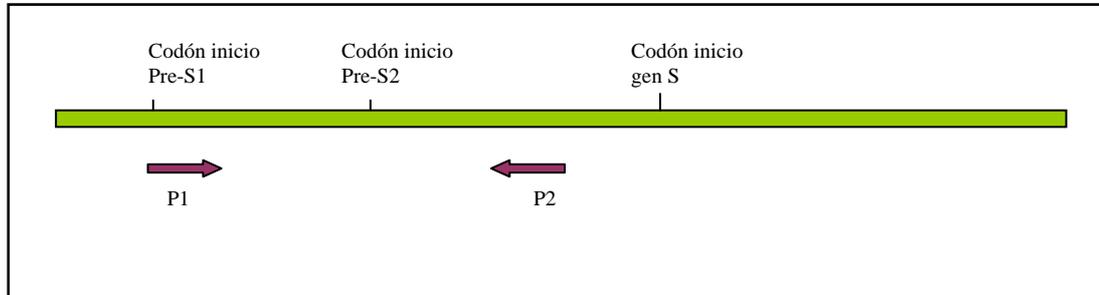


Figura 1. Representación esquemática del gen S.

Composición de la reacción de amplificación:

Reactivos	Concentración final
Tampón 10 x con Cl_2Mg 10x.	1x
Nucleótidos (dNTPs)	200 μ M
Cebador P1 (10 μ M)	0,4 μ M
Cebador P2 (10 μ M)	0,4 μ M
Taq polimerasa	1U
Agua libre de nucleasas	Ajustar a 40 μ L

Se añaden 40 μ L de la mezcla anterior y 10 μ L del ADN extraído para cada muestra.

El programa de amplificación es el siguiente:

- desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos
- 40 ciclos de amplificación que consisten en
 - 45 segundos de desnaturalización a 94°C
 - 60 segundos de hibridación a 53°C
 - 90 segundos de extensión a 72°C
- una extensión final de 7 minutos a 72°C.
- bajada de temperatura a 4°C hasta su visualización.

El producto obtenido de esta amplificación se comprueba en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Posteriormente, este producto se somete a digestión con enzimas de restricción.

Reacciones de Restricción:

Para determinar los patrones de restricción se emplean los enzimas: Ava2 y MboI. MboI es un isoesquizómero del enzima Dpn2 empleado en el artículo original.

La secuencia de reconocimiento de Ava2 es:

5'...GtGA/TCC...3'

3'... C CT/GsG...5'

La secuencia de reconocimiento de MboI es:

5'...GtA T C...3'

3'...C T AsG...5'

Dependiendo del genotipo del que se trate, el producto obtenido de la PCR anterior puede poseer los siguientes tamaños: 479 , 446 o 263 pares de bases. Para obtener los patrones de restricción se realiza la siguiente reacción:

Se preparan tres tubos eppendorf para cada muestra. En cada uno de estos tubos realizamos la siguiente mezcla:

- 10 µL de producto de la amplificación anterior
- Añadimos 1,5 µL de tampón 10x compuesto por 100mM Tris-HCl (pH 7.9), 500mM de MgCl₂, 100mM de DTT a 37°C.
- Añadimos BSA (albúmina sérica bovina) a una concentración final de 0.1 mg/mL.
- En el primer tubo se añaden 0.5 µL de agua. En el segundo tubo se añaden 0.5 µL de enzima AvaII y en el tercer tubo se añaden 0.5 µL de MboI.
- Los tubos se incuban tres horas en un baño a 37°C.
- Después de las tres horas se retiran las muestras del baño y se les da un pulso en la microcentrífuga.
- Para visualizar el producto de la digestión se cargan los 15 µL de la reacción junto con 2,5 µL de tampón de carga 6x. En el gel se emplean marcadores de peso molecular con fragmentos de tamaños comprendidos entre 25 y 1000 pb. Se realiza la electroforesis a 60 V durante dos horas.

Visualización:

Los fragmentos de restricción se visualizan en un gel de agarosa NuSieve al 3%. Se realiza la electroforesis a 60 V durante 1 hora. Se observan las bandas empleando el transiluminador de luz ultravioleta y se fotografía. Por comparación con los marcadores de peso molecular determinamos el tamaño de los fragmentos de restricción y los comparamos con los patrones descritos por esta técnica para cada genotipo.

Tabla 3. RFLP del segmento comprendido entre el nucleótido 2823 y el nucleótido 80.

Genotipo	Ava2					MboI					Patrón de RFLP									
	Posición del sitio de restricción					Posición del sitio de restricción					Patrón de RFLP									
	2864	2871	2943	2982	3000	3043	3152	43	2843	2931	2943	2982	3000	3035	3043	3124	28			
A	479		x		x			301, 121, Av-1 57		x						x	318, 109, 52 Dp-1	A1		
	479		x		x			301, 121, Av-1 57		x							x	370, 109 Dp-2	A2	
	488		x		x			301, 100, Av-2 57		x							x	318, 88, 52 Dp-3	A3	
	479		x		x			358, 121 Av-6		x							x	318, 109, 52 Dp-1	A4	
B	479		x		x			319, 121, Av-3 39		x							x	318, 88, 52, 21 Dp-4	B1	
	479	x			x			319, 79, Av-4 42, 39		x							x	318, 88, 52, 21 Dp-4	B2	
	479	x			x			319, 79, Av-4 42, 39		x							x	318, 109, 52 Dp-1	B3	
	479		x		x			319, 121, Av-3 39		x								x	318, 109, 52 Dp-1	B4
	479		x		x			319, 121, Av-3 39										x	427, 52 Dp-5	B5
	479				x			319, 160 Av-5		x								x	318, 109, 52 Dp-1	B6
	479		x					358, 121 Av-6		x			x					x	249, 109, 69, 52 Dp-6	C1
	479		x					358, 121 Av-6		x									301, 109, 69 Dp-7	C2
C	479							479 Av-7		x							x	249, 109, 69, 52 Dp-6	C3	
	479		x					321, 121, Av-8 37		x								x	249, 109, 69, 52 Dp-6	C4
	464		x					358, 106 Av-9		x								x	249, 94, 69, 52 Dp-8	C5
	479		x					258, 121, Av-10 100		x								x	249, 109, 69, 52 Dp-6	C6
479		x					358, 121 Av-6		x								x	214, 178, 52, 35 Dp-9	C7	
479		x					358, 121 Av-6		x									206, 109, 69, 52, 43 Dp-10	C8	

2.2.2 MÉTODO DE GENOTIPADO BASADO EN PCR ESPECÍFICA DE GENOTIPO.

Este método fue descrito por Naito H. et. al, en el año 2001. Se utiliza como muestra la misma extracción del apartado anterior. Se basa en la amplificación mediante una nested-PCR que usa cebadores genéricos para la primera amplificación y específicos de genotipo para la segunda (Tabla 4). El análisis del genotipo está basado en la región pre-S1 del gen de superficie.

<i>Amplificación</i>	<i>Nombre</i>	<i>Posición (nucleótido)</i>	<i>Secuencia</i>
Primera amplificación	P1	2823-2845	5'-TCACCATATTCTTGGGAACAAGA-3'
	S1-2	685-704	5'-CGAACCCTGAACAAATGGC-3'
Segunda amplificación	B2	67-86	5'-GGCTCMAGTTCMGAACAGT-3'
	BA1R	113-134	5'-CTCGCGGAGATTGACGAGATGT-3'
	BB1R	324-345	5'-CAGGTTGGTGAGTACTGGAGA-3'
	BC1R	165-186	5'-GGTCCTAGGAATCCTGATGTTG-3'
	BD1	2979-2996	5'-GCCAACAAGGTAGGAGCT-3'
	BE1	2955-2978	CACCAGAAATCCAGATTGGGACCA-3'
	BF1	3032-3051	5'-GYTACGGTCCAGGGTTACCA-3'
	B2R	3087-3097	5'-GGAGGCGGATYTGCTGGCAA-3'

Tabla 4. Cebadores empleados en la reacción de amplificación específica de genotipo:

Los cebadores genéricos P1 y S1-2 son los cebadores externos que se emplean en la primera reacción de amplificación. En esta reacción se genera un fragmento de 1063 pares de bases.

Los cebadores específicos de genotipo se emplean en la segunda reacción de amplificación en dos mezclas diferentes. En la mezcla A: cebadores B2, BA1R, BB1R, BC1R y en la mezcla B los cebadores BD1, BE1, BF1 y B2R.

Reacción de amplificación:

La primera reacción de amplificación se lleva a cabo en un tubo que contiene 10 µL de la extracción de la muestra y 40 µL de la siguiente mezcla: 50 ng de cada cebador (P1 y S1-2), 200 µM de cada uno de los cuatro desoxinucleótidos, 1,25 U de Taq polimerasa (TaqBead), buffer de reacción 1X, 1.5 mM de MgCl₂. Para aumentar la especificidad de la reacción se realiza una “hot start” automática con la polimerasa TaqBead (TaqBead hot start polymerase, Promega). La parafina en la que está embebida la polimerasa la mantiene separada del resto de los componentes de la

reacción hasta que se alcanza una temperatura de 60°C, a dicha temperatura la parafina se derrite y se libera la polimerasa, con lo cual disminuye la probabilidad de amplificación de productos inespecíficos.

El programa de amplificación consiste en:

- precalentamiento de 10 minutos a 95°C
- 40 ciclos que consisten en:
 - 20 segundos a 94°C
 - 20 segundos a 55°C
 - un minuto a 72°C.

En la segunda reacción de amplificación se emplea el cebador B2 y la mezcla de cebadores A para los genotipos A, B y C. Para los genotipos D, E y F se emplea el cebador antisentido BR2 y la mezcla de cebadores B. Se añade 1 µL del producto de la primera reacción de amplificación. El resto de las condiciones son las mismas que las anteriormente mencionadas.

El programa de amplificación en la segunda PCR consiste en:

- un precalentamiento durante 10 min a 95°C
- 20 ciclos de amplificación
 - 94°C 20 seg
 - 58°C 20 seg
 - 72°C 30 seg
- seguido de otros 20 ciclos que consisten en
 - 94°C durante 20 seg
 - 60°C 20 seg
 - 72°C 30 seg.

Se hacen modificaciones para mejorar la reproductibilidad y especificidad de este método que consisten en el empleo de una "touchdown PCR". La modificación del programa es la siguiente:

10 min a 95°C seguidos de:

5 ciclos:

94°C 20 seg

63°C 20 seg

72°C 30 seg

5 ciclos:

94°C 10 min

62°C 20 seg

72°C 30 seg

5 ciclos:

94°C 10 min

61°C 20 seg

72°C 30 seg

5 ciclos:

94°C 10 min

60°C 20 seg

72°C 30 seg

10 ciclos:

94°C 10 min

59°C 20 seg

72°C 30 seg

10 ciclos:

94°C 10 min

58°C 20 seg

72°C 30 seg

Visualización: se visualizan los productos en un gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio. Se emplean los marcadores de Pm de 50 pb y de 25 pb para predecir el tamaño de las bandas. Se realiza la electroforesis de las mezclas A y B en calles separadas. Se identifican los diferentes genotipos según el tamaño de la banda. El genotipo A produce una banda de 68 pares de bases, el genotipo B una banda de 281 pb, el genotipo C una banda de 122 pb, el genotipo D una banda de 119 pb, el genotipo E una banda de 167 pb, el genotipo F una banda de 97 pb.

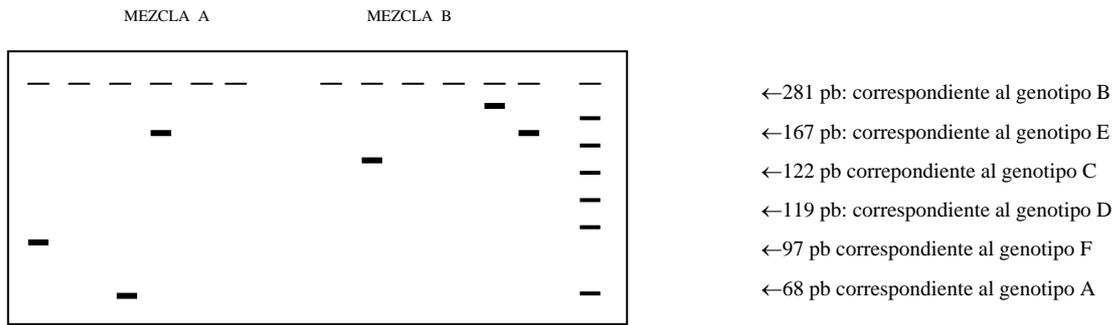


Figura 2. Representación esquemática de las bandas que se obtienen para los distintos genotipos según el método basado en PCR específica.

2.2.3 SISTEMA DE GENOTIPADO BASADO EN EL ANÁLISIS MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE PARTE DEL GEN QUE CODIFICA LA POLIMERASA DEL VIRUS

La técnica de secuenciación más utilizada se basa en el método descrito por Sanger de los nucleótidos de terminación de cadena. Los análogos dideoxi (ddCTP) detienen el crecimiento de la cadena en la polimerización, de esta forma se generan multitud de fragmentos que son detectados por su diferente tamaño y por el marcaje del dideoxi de parada.

Con el fin de genotipar el virus empleamos la región de la polimerasa que contiene el motivo YMDD (tirosina, metionina, aspartato, aspartato) dentro del dominio C de la polimerasa. En esta región se encuentran localizadas las principales mutaciones que confieren resistencia al tratamiento con lamivudina.

Para llevar a cabo de forma experimental el análisis de esta región diseñamos cebadores para amplificar la región entre el nucleótido 462 y 898 del gen la polimerasa (Tabla 5).

	<i>Nombre</i>	<i>Posición nucleótido</i>	<i>secuencia</i>
1ª PCR	SQ-1 (Sense)	462-482	5'-TAT GTT GCC CGT TTG TCC TCT A-3'
	SS (Antisentido)	876-898	5'- CTB CCA ATK ACR TAW CCC ATG AA-3'
2ª PCR	POL-1 (Sense)	492-510	5'-ATCCTCAACCACCAGCACG-3'

Tabla 5. Cebadores empleados en el análisis de la región de la polimerasa viral del VHB.

Estos cebadores se han diseñado ensamblando, con ayuda del programa OMIGA, diversas secuencias publicadas en la NCBI incluyendo todos los genotipos hasta la fecha descritos (A-G). Se emplea el formato FASTA para la posterior manipulación de las secuencias. El cebador SS es degenerado, es decir se trata de una mezcla de cebadores que se diferencian en un nucleótido. Se ha diseñado de esta manera para que incluya los polimorfismos encontrados en las secuencias publicadas en la base de datos del NCBI de la región de hibridación.

La primera reacción de amplificación se lleva a cabo bajo las siguientes condiciones:

Reactivos	Concentración final
Tampón 10x con Cl ₂ Mg	1x, 1,5mM Cl ₂ Mg
Mezcla de nucleótidos	200µM
SQ1	500µM
SS	500µM
Taq polimerasa (5U/µL)	1,25Unidades
Agua libre de nucleasas	Ajustar a 40µL

Se emplea el siguiente programa de amplificación:

- un precalentamiento durante 3 min a 94°C
- 10 ciclos de amplificación
 - 94°C 30 seg
 - 56°C 30 seg
 - 72°C 45 seg
- seguido de otros 30 ciclos que consisten en:
 - 94°C durante 30 seg
 - 52°C 30 seg
 - 72°C 40 seg.

El producto de la amplificación se visualiza en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Si no obtenemos producto visible en el gel, o éste, rinde una banda muy débil procedemos con la segunda amplificación empleando el cebador de iniciación POL1 y SS. La segunda amplificación se realiza bajo las mismas condiciones y empleando como molde 2µL del primer amplificado. El primer producto de la amplificación posee el tamaño de 436 pb y el segundo producto es de 406 pb.

Se purifican los productos obtenidos con las columnas de purificación y, el eluido es se utilizará para las reacciones posteriores.

Para las reacciones de secuenciación se emplean los mismos cebadores, es decir SQ1 y SS para los productos de la primera amplificación y POL1 y SS para los de la segunda. Siempre se realiza la secuenciación en los dos sentidos para mayor seguridad en los resultados.

Purificación del producto de amplificación:

- Se añade 5 volúmenes de reactivo PB a la muestra.
- Se agita y se coloca dentro de las columnas específicas de purificación.
- Se centrifuga a 13000 rpm (5000g).

- Se descarta el eluido y se coloca la columna que contiene el ADN adherido a la membrana en el mismo tubo. Se añade 750 uL de tampón PE para lavar el ADN. Este tampón se prepara previamente añadiendo alcohol.
- Se centrifuga a 13000 rpm y descarta el eluido. se centrifuga de nuevo a 13000 para que no queden restos de tampón.
- Se coloca la columna en un tubo eppendorf esterilizado y se añaden 50uL de tampón de elución proporcionado en el kit de purificación. Se deja incubando dos minutos.
- Se centrifuga la columna y se desecha, de esta forma obtenemos el eluido ya purificado.

Preparación de la reacción de secuenciación :

Se prepara una mezcla que contenga tampón 10X dNTP mix, los terminadores de cadena ddUTP, ddGTP, ddCTP, ddATP y ADN polimerasa en las concentraciones indicadas por el fabricante.

A 12 uL de esta mezcla añadimos el ADN molde, es decir de 0.5 a 6µL de molde (debe estar en agua o en Tris-Cl pH 8.5 10 mM. No debe haber EDTA) y 2µL de cebador (1,6pMol/µL). A esta mezcla se le añade agua libre de nucleasas hasta alcanzar un volumen final de 20µL.

Por cada muestra se realizan dos reacciones de secuenciación, una con el cebador de ida y otra con el cebador de vuelta para amplificar ambas cadenas.

El programa empleado para la reacción de secuenciación es el recomendado por el fabricante:

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none">▪ Consiste en 30 ciclos de:<ul style="list-style-type: none">▪ 96°C 20 seg▪ 50°C 20 seg▪ 60°C 4 min |
|---|

Después de la reacción de secuenciación se realiza la purificación del producto con el kit de purificación de AutoSeq con objeto de retirar los componentes de bajo peso molecular que pueden interferir en la lectura del secuenciador. Posteriormente se preparan de las muestras para cargar en el secuenciador. El método elegido para el análisis de secuenciación es el siguiente:

- temperatura y duración de la desnaturalización: 96°C 1min
- duración de la inyección y voltaje a los que se efectúa: 1,5 min a 8 V
- duración de la separación y voltaje aplicado: 150 min a 7,5 V.

Para analizar las regiones implicadas en la aparición de resistencias empleamos el programa OMIGA 2.0.

Descripción del método: análisis de las secuencias:

Se estudian 55 secuencias genotipadas con anterioridad por otros autores (Tabla 6). De estas secuencias se extrae la región central que comprende 250 pb (región correspondiente al acotamiento de los cebadores POL1 y SS) y se realiza un análisis de cluster con el paquete PHYLIP (Phylogenetic Inference package) versión 3.573, DNAdist software program (Felsenstein,1993) empleando la opción de la distancia de Kimura.. De esta forma se elige una secuencia consenso para cada genotipo. Esta secuencia representa la más cercana a todas las secuencias con las que ha sido comparada dentro de cada grupo. Por otro lado se ensambla el genoma completo de estas secuencias extraídas de la base de datos del NCBI empleando el programa OMIGA con las secuencias elegidas como consenso. En base a la menor proporción de nucleótidos divergentes se observa que elección de las secuencias consenso es concordante con el resultado del análisis del genoma completo.

Esta región mide 250 pb y está comprendida entre el último nucleótido del triplete que codifica para el aminoácido 493 y el último nucleótido que codifica para el aminoácido 576 de la polimerasa del virus.

Estas siete secuencias consenso serán utilizadas como referencia para comparar las muestras de los pacientes con ellas y asignarles un genotipo.

En la tabla 7 representamos el análisis de las secuencias fragmentadas escogidas como consenso obtenidas después del análisis. Enfrentamos estas secuencias consensos con las secuencias de genotipo conocido establecido por otros autores para comprobar la validez del método. Las secuencias empleadas para la comparación con las secuencias consenso son las que se emplean en el método de RFLP para su validación, y además, hemos añadido secuencias del genotipo G.

Número de Acceso	SECUENCIAS CONSENSO (consensos)							Genotipo asignado		Resultado
	A	B	C	D	E	F	G	YMDD	Genotipo	
Z35717	0,0000	0,0326	0,0585	0,0458	0,0766	0,0950	0,0327	A	A	Concordancia
M57663	0,0203	0,0202	0,0541	0,0499	0,0676	0,0902	0,0203	A-B	A	Concordancia
S50225	0,0121	0,0453	0,0717	0,0588	0,0902	0,0998	0,0454	A	A	Concordancia
V00866	0,0000	0,0326	0,0585	0,0458	0,0766	0,0950	0,0327	A	A	Concordancia
X02763	0,0000	0,0326	0,0585	0,0458	0,0766	0,0950	0,0327	A	A	Concordancia
X51970	0,0080	0,0326	0,0672	0,0544	0,0810	0,0950	0,0327	A	A	Concordancia
X69458	0,0415	0,0499	0,0768	0,0725	0,0955	0,1240	0,0587	A	A	Concordancia
X70185	0,0040	0,0369	0,0630	0,0502	0,0812	0,0998	0,0370	A	A	Concordancia
L13994	0,0000	0,0326	0,0585	0,0458	0,0766	0,0950	0,0327	A	A	Concordancia
M54923	0,0411	0,0080	0,0499	0,0544	0,0633	0,0770	0,0244	B	B	Concordancia
D00330	0,0411	0,0080	0,0585	0,0630	0,0721	0,0814	0,0327	B	B	Concordancia
D00331	0,0411	0,0080	0,0499	0,0544	0,0633	0,0770	0,0244	B	B	Concordancia
D23677	0,0326	0,0000	0,0498	0,0542	0,0632	0,0768	0,0244	B	B	Concordancia
D23678	0,0411	0,0080	0,0499	0,0544	0,0633	0,0770	0,0244	B	B	Concordancia
D23679	0,0326	0,0000	0,0498	0,0542	0,0632	0,0768	0,0244	B	B	Concordancia
D00329	0,0368	0,0040	0,0541	0,0585	0,0676	0,0812	0,0285	B	B	Concordancia
X75656	0,0627	0,0539	0,0121	0,0455	0,0498	0,0950	0,0538	C	C	Concordancia
X75665	0,0627	0,0539	0,0121	0,0455	0,0498	0,0950	0,0538	C	C	Concordancia
D00630	0,0585	0,0498	0,0000	0,0370	0,0499	0,0952	0,0497	C	C	Concordancia
D12980	0,0674	0,0585	0,0080	0,0455	0,0501	0,1047	0,0584	C	C	Concordancia
D23680	0,0630	0,0542	0,0040	0,0413	0,0544	0,1001	0,0541	C	C	Concordancia
D23681	0,0630	0,0542	0,0040	0,0413	0,0544	0,1001	0,0541	C	C	Concordancia
D23682	0,0719	0,0587	0,0121	0,0499	0,0502	0,1050	0,0585	C	C	Concordancia
D23683	0,0764	0,0630	0,0162	0,0542	0,0545	0,1096	0,0628	C	C	Concordancia
D23684	0,0499	0,0413	0,0080	0,0370	0,0499	0,0952	0,0497	C	C	Concordancia
D50489	0,0672	0,0584	0,0080	0,0454	0,0499	0,1044	0,0582	C	C	Concordancia
L08805	0,0627	0,0539	0,0203	0,0498	0,0413	0,0995	0,0453	C	C	Concordancia
M12906	0,0628	0,0541	0,0040	0,0412	0,0457	0,0998	0,0539	C	C	Concordancia
M38454	0,0674	0,0499	0,0080	0,0455	0,0544	0,0955	0,0498	C	C	Concordancia
M38636	0,0630	0,0542	0,0040	0,0413	0,0544	0,1001	0,0541	C	C	Concordancia
V00867	0,0585	0,0498	0,0000	0,0370	0,0499	0,0952	0,0497	C	C	Concordancia
X04615	0,0542	0,0541	0,0040	0,0412	0,0542	0,0998	0,0454	C	C	Concordancia
X14193	0,0630	0,0542	0,0040	0,0413	0,0544	0,1001	0,0541	C	C	Concordancia
X01587	0,0630	0,0542	0,0040	0,0413	0,0544	0,1001	0,0541	C	C	Concordancia
Z35716	0,0458	0,0542	0,0370	0,0000	0,0458	0,0633	0,0455	D	D	Concordancia
L27106	0,0414	0,0498	0,0327	0,0040	0,0414	0,0679	0,0412	D	D	Concordancia
M32138	0,0679	0,0721	0,0544	0,0204	0,0635	0,0639	0,0545	D	D	Concordancia
X02496	0,0458	0,0542	0,0370	0,0000	0,0458	0,0633	0,0455	D	D	Concordancia
X65257	0,0458	0,0542	0,0370	0,0000	0,0458	0,0633	0,0455	D	D	Concordancia
X65258	0,0246	0,0413	0,0584	0,0370	0,0812	0,0857	0,0328	A	D	NO Concord.
X65259	0,0501	0,0499	0,0412	0,0040	0,0458	0,0590	0,0413	D	D	Concordancia
X68292	0,0458	0,0632	0,0632	0,0246	0,0590	0,0725	0,0458	D	D	Concordancia
X72702	0,0458	0,0542	0,0370	0,0000	0,0458	0,0633	0,0455	D	D	Concordancia
X77310	0,0772	0,0814	0,0721	0,0330	0,0772	0,0772	0,0679	D	D	Concordancia
X85254	0,0545	0,0544	0,0455	0,0080	0,0502	0,0635	0,0457	D	D	Concordancia
J02203	0,0458	0,0542	0,0370	0,0000	0,0458	0,0633	0,0455	D	D	Concordancia
X75664	0,0766	0,0632	0,0499	0,0458	0,0000	0,0814	0,0544	E	E	Concordancia
X75657	0,0676	0,0544	0,0501	0,0372	0,0080	0,0723	0,0457	E	E	Concordancia
X75663	0,0950	0,0768	0,0952	0,0633	0,0814	0,0000	0,0677	F	F	Concordancia
X75658	0,0995	0,0812	0,0998	0,0677	0,0859	0,0040	0,0721	F	F	Concordancia
X69798	0,0952	0,0950	0,0864	0,0635	0,0768	0,0162	0,0857	F	F	Concordancia

AB056516	0,0327	0,0244	0,0497	0,0455	0,0544	0,0677	0,0000	G	G	Concordancia
AB056514	0,0327	0,0244	0,0497	0,0455	0,0544	0,0677	0,0000	G	G	Concordancia
AB056515	0,0370	0,0286	0,0584	0,0542	0,0632	0,0768	0,0080	G	G	Concordancia
AB056513	0,0327	0,0244	0,0497	0,0455	0,0544	0,0677	0,0000	G	G	Concordancia

Tabla 6. Resultado del estudio filogenético realizado con las secuencias consenso y secuencias de genotipo establecido.

Para verificar que esta corta secuencia es válida como referencia, tomamos de la base de datos del NCBI un grupo de 50 secuencias escogido al azar. Para ello se realizó la siguiente búsqueda en la base de datos GNI: “hepatitis B (org) 3000:3500(slen)”. La búsqueda dio lugar a las siguientes secuencias: AB010289, AB010291, AB014363, AB014374, AB014385, AB014394, AB014395, AB036913, AB032433, AB033550, X98077, AB036915, AB036918, AB042282, AB048701, AB048703, AB050018, AB056514, AB073830, AB073834, AB073839, AF068756, AF121243, AF151735, AF223954, AF223956, AF223959, AF223960, AF223961, AF241409, AF297620, AF297623, AF305327, AF411411, AF462041, AJ131956, AJ309369, AY033072, AY077735, D50519, M54923, U95551, X02763, X14193, X75656, X97850, AB036914, M38454.

Tabla 7. Alineamiento de las secuencias consenso correspondientes a los siete genotipos del VHB.

	10	20	30	40	50	60	
A V00866	ttgctgtacaaaacctacggatggaaattgcacctgtattcccatcccatcgtcctgggc						60
B D23679c.....a.t.....						60
C V00867t...c...c...t.....a.....						60
D J02203c...t...c.....a.....						60
E X75664t...t...c.....t.....a.a.....						60
F X75663t.c...ct...c...c.....a.t.....						60
G AB056513t...c.....a.t.....						60
	70	80	90	100	110	120	
A V00866	tttcgaaaatacctatgggagtgggcctcagtcctttctcttggctcagtttactagt						120
B D23679						120
C V00867g.t.....c.....						120
D J02203g...t.....c...c.....						120
E X75664g...t.....c...c.....						120
F X75663a.g.....c...c.....						120
G AB056513						120
	130	140	150	160	170	180	
A V00866	gccattttgttcagtggttcgtagggctttcccccactgtttggctttcagctatatggat						180
B D23679c.....t.....						180
C V00867t.....						180
D J02203t.....						180
E X75664cc.....c...t.....						180
F X75663	.a.....g.....c...t.t.....						180
G AB056513c.....						180
	190	200	210	220	230	240	
A V00866	gatgtggatattgggggccaagtctgtacagcatcgtgagtcacctttataccogctgttacc						240
B D23679a...t.....g.....						240
C V00867a...t.....t...t.a.....						240
D J02203t.....t.....						240
E X75664ga...t...t.....						240
F X75663	.c.....a...g...t.....						240
G AB056513a...a...t.....						240
A V00866	aattttctt					249
B D23679						249
C V00867						249
D J02203						249
E X75664						249
F X75663	g					249
G AB056513						249

2.2.4 GENOTIPADO DEL VHB MEDIANTE HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

Se emplea el sistema basado en hibridación con sondas específicas de genotipo: INNO-LiPA genotyping (Innogenetics). Este método se basa en la amplificación de la región del gen que codifica para el Ag-HBs (nt 328-619) y la posterior hibridación con sondas de ácidos nucleicos adsorbidas a una tira. El patrón de bandas se corresponde con un genotipo determinado (Figura 3).

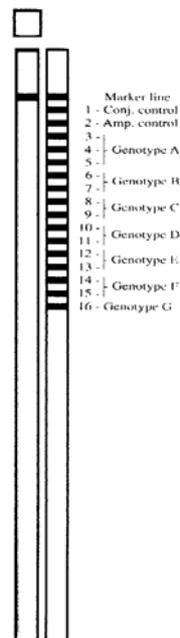


Figura 3. Patrón de bandas correspondientes a los siete genotipos del VHB.

2.2.5 SECUENCIACIÓN DEL GEN DE SUPERFICIE:

Para la secuenciación del gen de superficie se diseñan cebadores externos que dan lugar a un producto de 844 pb (SA y SZZ). Estos cebadores se obtienen del resultado del alineamiento de secuencias representativas de cada genotipo (Tabla 8). Con el programa OMIGA se efectúa el cálculo de las temperaturas de hibridación de los cebadores para proceder al diseño de las condiciones de amplificación.

Nombre	Posición	Secuencia
SA (Sentido)	60-79	5'-TGCTGGTGGCTCCAGTTCAG-3'
SZZ (Antisentido)	881-904	5'-CCCCAACTCCAATAACATAACCC-3'

Tabla 8. Secuencia de los cebadores externos empleados para la secuenciación del gen S.

Reacción de amplificación:

Reactivos	Concentración final
Tampón de reacción	1x
Cl ₂ Mg (25mM)	1,5 mM
Mezcla de nucleótidos (1mM)	200 µM
SQ1 (10µM)	0,4 uM
SS (10 µM)	0,4 µM
Taq polimerasa (5U/µL)	0,2 Unidades
H ₂ O	Ajustar a 50 µL

El programa de amplificación es el siguiente:

- desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos
- 40 ciclos de amplificación que consisten en
 - 30 segundos de desnaturalización a 94°C
 - 30 segundos de hibridación a 50°C
 - 90 segundos de extensión a 72°C
- bajada de temperatura a 4°C hasta su visualización.

Para las reacciones de secuenciación del gen S completo se emplean además de los cebadores externos anteriores, los siguientes cebadores internos con el propósito de abarcar el gen completo.

<i>Nombre</i>	<i>Posición</i>	<i>Secuencia</i>
SB	373-390	5'-CCGCAGACACATCCAGCG-3'
SC	304-322	5'-GGCCAAAATTCGCAGTCCC-3'
SD	639-658	5'-CTGAGGCCCACTCCCATAGG-3'
SE	538-561	5'-GCTCAAGGAACCTCTATGTTTCCC-3'

Tabla 9. Cebadores internos empleados en la secuenciación del gen S.

De esta forma se emplean seis cebadores para cada muestra, tres de ida y tres de vuelta para verificar la secuencia.

En la secuencia que aparece a continuación está representada la situación de los cebadores empleados para secuenciar el gen S.



Figura 4. Localización de los cebadores empleados para secuenciar el gen de superficie.

2.2.6 COMPROBACIÓN DEL GENOTIPO G MEDIANTE HEMI-NESTED PCR.

La comprobación del genotipo G se realizó mediante una heminested-PCR descrita por Kato et al., 2001.

Uno de los cebadores empleados (denominado HBHKR2) está diseñado dentro de una inserción de 36 nucleótidos, característica del genotipo G. Por lo tanto, sólo obtendremos amplificado en caso de que la muestra pertenezca a dicho genotipo.

Tabla 10. Cebadores empleados en la comprobación del genotipo G.

	Nombre	Posición nucleótido en gen core	secuencia
1ª PCR	HBHKR2 (Sentido)	17-37	5'-AGCCAAAAAGGCCATATGGCA-3'
	HBHBHKF1 (Antisentido)	1519-1539	5'-ACGGGGCGCACCTCTCTTAC-3'
2ª PCR	HBHKF2 (Sense)	1581-1601	5'-GCACTTCGTTTCACCTCTGCA-3'

Las condiciones de la reacción de amplificación son las siguientes:

	Concentración final
Tampón de reacción	1x
Cl ₂ Mg (25mM)	1,5 mM
Mezcla de nucleótidos (1mM)	200 µM de cada uno
Cebador HBHKR2 (10µM)	0,2 µM
Cebador HBHBHKF (10 µM)	0,2 µM
Taq polimerasa (5U/µL)	0,2 Unidades
H ₂ O	Ajustar a 40 µL

A esta mezcla se añade 10 µL de la extracción del ADN.

Programa de amplificación:

- desnaturalización inicial a 96°C durante 9 minutos
- 40 ciclos de amplificación que consisten en:
 - 60 segundos de desnaturalización a 96°C
 - 60 segundos de hibridación a 60°C
 - 60 segundos de extensión a 72°C
- bajada de temperatura a 4°C hasta su visualización.

2.3 METODOLOGÍA EMPLEADA EN EL ESTUDIO DE RESISTENCIAS AL TRATAMIENTO CON LAMIVUDINA:

Para el estudio de las resistencias al tratamiento con lamivudina se emplean dos técnicas. Una de ellas se basa en la secuenciación directa del fragmento de la polimerasa implicado en la aparición de las resistencias y el otro es un método comercial denominado INNO-LiPA HBV DR.

2.3.1 SECUENCIACIÓN.

Se emplean los cebadores utilizados para el genotipado (Tabla 5) ya que fueron diseñados con este doble fin, el de genotipar el virus y el de detectar los virus mutantes responsables de la resistencia al tratamiento con lamivudina.

Estos cebadores acotan una región que incluye el dominio C de la polimerasa viral y parte del dominio B. En el dominio C se encuentra ubicado el motivo YMDD (tirosina, metionina, aspartato, aspartato) responsable de la resistencia a lamivudina (Figura 5).

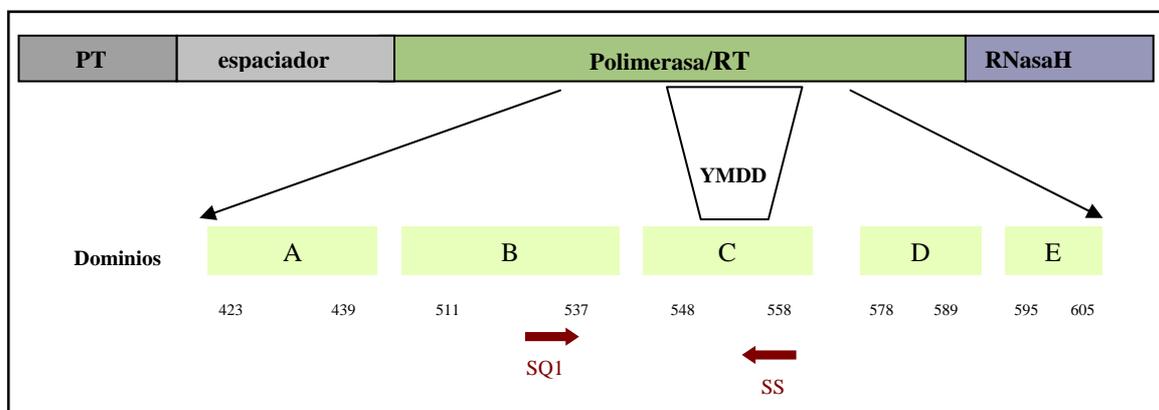


Figura 5. Representación esquemática de los dominios del gen de la polimerasa del virus de la hepatitis B y localización de los cebadores SQ1 y SS. PT: proteína terminal.

En los codones 528, 552 y 555 se asientan las mutaciones descritas hasta el momento como responsables de la emergencia del virus en pacientes a tratamiento con lamivudina.

La sustitución de Timina por Adenina en la primera posición del codón 528 da lugar a un cambio del aminoácido Leucina por Metionina en la proteína codificada (L528M).

La sustitución del nucleótido Adenina en la primera posición del codón 552 por una G da lugar al cambio del aminoácido Metionina por una Valina. También se puede observar la sustitución del nucleótido G por T en la tercera posición del codón 552 dando lugar al cambio del aminoácido Metionina por Isoleucina. Otra mutación asociada con la resistencia es M/V555I.

2.3.2 INNOLiPA-HBV DR.

El sistema INNO-LiPA HBV DR (Innogenetics) es un sistema de detección simultánea de secuencias salvajes y mutantes en diferentes localizaciones del gen de la polimerasa del VHB, asociadas con resistencias a Famciclovir y Lamivudina. Este sistema está basado en el principio de la hibridación reversa. El ADN biotinilado hibrida con sondas de oligonucleótidos inmovilizados en paralelo en unas membranas. Después de la hibridación se añade la estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina que se une a cualquier híbrido biotinilado previamente formado. Al incubar con un cromógeno da lugar un precipitado púrpura-marrón. Este sistema amplifica el dominio B y C del gen de la polimerasa.

En la reacción de amplificación se emplean los cebadores externos HBPr134 y HBPr135 y, en caso necesario, es decir, de no haber obtenido producto en la primera amplificación, se realiza una nested-PCR con los cebadores HBP75 y BBPr94.

	<i>Secuencia</i>
HBPr134	5'-TGCTGCTATGCCTCATCTTC-3'
HBPr135	5'-CA(G/A)AGACAAAAGAAAATTGG-3'
HBP75	5'-CAAGGTATGTTGCCCGTTGTCC-3'
BBPr94	5'-GG(T/C)A(A/T)AAAGGGACTCA(A/C)GATG-3'

Tabla 11. Secuencia de los cebadores empleados en el LiPA.

Las condiciones de amplificación son las siguientes:

	Concentración final
Tampón de reacción/Cl ₂ Mg	1x
Mezcla de nucleótidos (1mM)	200 μM de cada uno
Cebadores externos	0,2 μM
Taq polimerasa (5U/μL)	1 Unidad
H ₂ O	Ajustar a 40 μL

Se añaden 10 μ L de la extracción de la muestra. En caso de no obtener amplificado se realiza una segunda amplificación con los cebadores internos (HBP75 y BBPr94) bajo las mismas condiciones pero empleando 1 μ L del primer amplificado.

Programa de amplificación:

- un precalentamiento durante 4 min a 94°C
- 40 ciclos de amplificación
 - 94°C 30 seg
 - 45°C 30 seg
 - 72°C 30 seg
- seguido de elongación a 72°C durante 10 minutos

Después de realizar las reacciones de amplificación y de hibridación se comparan los resultados con la plantilla (Figura 6). Esta plantilla posee indicadas las posiciones y los cambios correspondientes a los polimorfismos de la región de estudio.

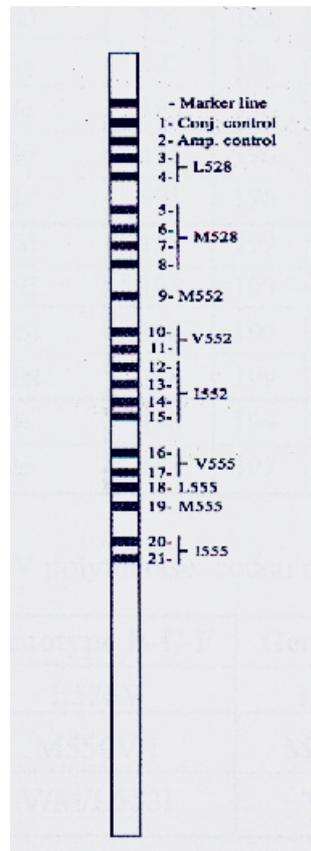


Figura 6. Plantilla de hibridación en el LIPA.

Las sondas fijadas a las tiras poseen una numeración y las secuencias de éstas codifican los aminoácidos que podemos detectar (Tabla 12).

Line	Codon position	Amino acid	Codon position		Amino acid		Wild type/ Mutant
	Polymerase	Polymerase	HBsAg		HBsAg		
3	528	Leu	171	172	Ser	Trp	Wild type
4	528	Leu	171	172	Ser	X	Wild type
5	28	Met	171	172	Ser	Trp	Mutant
6	528	Met	171	172	Leu	Trp	Mutant
7	528	Met	171	172	Ser	X	Mutant
8	528	Met	171	172	Pro	Trp	Mutant
9	552	Met	195	196	Ile	Trp	Wild Type
10	552	Val	195	196	Met	Trp	Mutant
11	552	Val	195	196	Lys	Trp	Mutant
12	552	Ile	195	196	Ile	X	Mutant
13	552	Ile	195	196	Ile	Leu	Mutant
14	552	Ile	195	196	Ile	Ser	Mutant
15	552	Ile	195	196	Thr	Leu	Mutant
16	555	Val	198	199	Met	Trp	Wild Type
17	555	Val	198	199	Met	X	Wild Type
18	555	Leu	198	199	Ile	Trp	Wild Type
19	555	Met	198	199	Ile	Trp	Wild Type
20	555	Ile	198	199	Ile	Leu	Mutant
21	555	Ile	198	199	Ile	X	Mutant

Tabla 12. Representan las secuencias codificadoras correspondientes al gen de la polimerasa y al gen de superficie.

2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables cualitativas se expresan en frecuencias absolutas (porcentajes), y las cuantitativas como medias (DE) en caso de distribuciones normales y como medianas (percentil 25, percentil 75) en caso contrario.

Para verificar la existencia de asociación entre genotipos (D, no D) y Ag-HBe (NEG,POS) con sexo, coinfección con VHC, VIH, etc., se ha utilizado la prueba exacta de Fisher. Para la comparación de la edad, carga viral y valores de ALT entre genotipos y entre Ag-HBe se ha utilizado la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

Para la clasificación estándar del genotipo se consideró como referencia el genotipo obtenido con mayor frecuencia entre los distintos métodos considerados. Para hallar la concordancia entre los distintos métodos utilizados y el patrón de referencia se ha utilizado el índice Kappa (κ) con un intervalo de confianza del 95%. El estadístico Kappa es un índice que incorpora el papel del azar en el cálculo de la concordancia:

$$\kappa = \frac{Po - Pe}{100 - Pe}; \text{ donde } Po = \text{porcentaje total de concordancias}; Pe = \text{porcentaje de}$$

concordancia esperada por azar.

Siguiendo a Fleiss et al., 1981, los valores de kappa superiores a 0,8 indican una concordancia excelente, entre 0,4 y 0,75 indican una buena concordancia e inferiores a 0,4 indican un pobre acuerdo.

Se consideran significativos aquellos valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

1. GENOTIPADO DEL VHB

1.1 DESCRIPCIÓN DE LOS RESULTADOS DE GENOTIPADO OBTENIDOS POR LOS DISTINTOS MÉTODOS.

1.1.1 GENOTIPADO DEL VHB MEDIANTE RFLP

El análisis del genotipo del virus de la hepatitis B en las muestras de los 101 pacientes se lleva a cabo mediante el método descrito por Lindh et al, 1998 basado en polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción de la región preS del gen de superficie.

En el estudio realizado se encuentran 6 tipos de patrones de RFLP: D1,D2,D-del, C1,A1, y F2. Estos patrones se corresponden con cuatro genotipos: A, D, C y F. En las figuras 1, 2, 3 y 4 se observan los patrones correspondientes a los distintos genotipos.

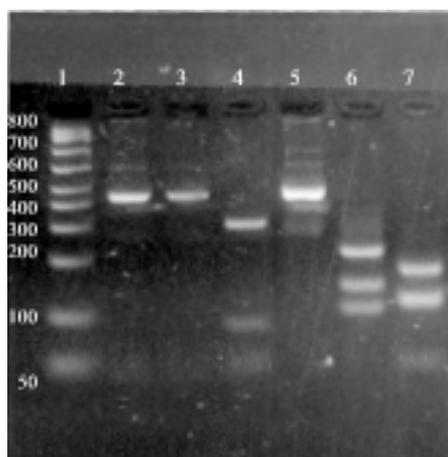


Fig 1. Patrones D2 y F2. Calle 1: marcador de peso molecular; calles 2-4 corresponden a una muestra de patrón D2 correspondiente al genotipo D: calle 2 es la muestra amplificada sin cortar, calle 3 es la muestra amplificada cortada con Ava2 y la calle 4 es la muestra cortada con MboI. Las calles 5-7 representan un patrón F2 correspondiente al genotipo F.

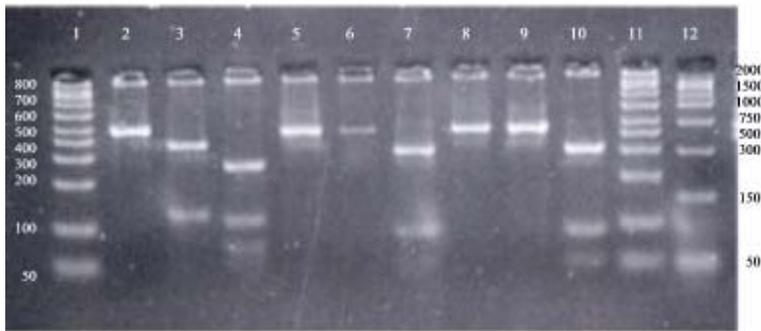


Fig 2. Patrón C1. Las calles 1, 11 y 12 se corresponden con los marcadores de peso molecular; las calles 2-4 presentan un patrón C1 correspondiente al genotipo C; las calles 5-7 presentan un patrón D2 correspondiente al genotipo D.



Fig 3. Patrones D2 F2 D1 D2 y no tipable(NT). Las calles 1 y 11 corresponden a marcadores de peso molecular; las calles 2-4 representan un patrón D2 correspondientes con el genotipo D; las calles 5-7 representan el patrón F2 correspondiente al genotipo F; las calles 8-10 representan el patrón D2 correspondiente al genotipo D y las calles 12-14 presentan un patrón no descrito considerándose esta muestra como no tipable.



Fig 4. Patrón A1. Calles 1,2 y 12 corresponden a los marcadores de peso molecular. Calles 3-5 se corresponden con el patrón A1 del genotipo A; calles 6-8 se corresponden con el patrón D2 al igual que las calles 9,10 y 11.

Cada tipo de patrón obtenido mediante RFLP se verifica mediante secuenciación con los cebadores P1 y P2. Estas muestras, después de haber sido sometidas a digestión con los enzimas de restricción, se emplean como controles de bandas de tamaño conocido para comparar los patrones obtenidos con el resto de las muestras.

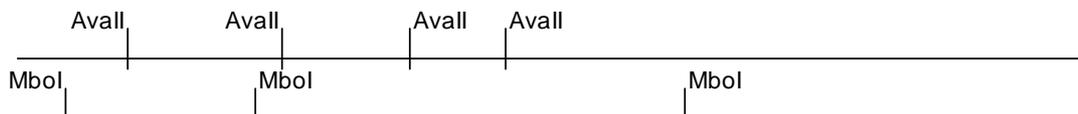
No hay un patrón descrito para el genotipo G en este método basado en RFLP por ser anterior a la descripción del genotipo G. Por lo tanto, se realizó un análisis de las secuencias correspondientes al genotipo G publicadas en la base de datos del NCBI para determinar el patrón que correspondería al hipotético corte con los enzimas de restricción **Ava2** y **MboI**. Para este estudio se emplearon las secuencias del virus de la hepatitis B correspondientes a los siguientes números de acceso a la base de datos del NCBI: AB056513, AB056514, AB056515, AB056516 (Kato et al., 2001).

Se localizaron los puntos de corte para ambos enzimas de restricción y se obtienen los siguientes patrones del genotipo G:

ABO56513: amplificado de 476 pb.

Digestión con **Ava2**: 49,69, 57, 43, 258 pb.

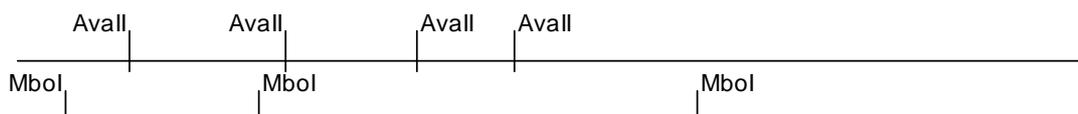
Digestión con **MboI**: 21, 85, 192, 178 pb.



ABO56514: amplificado de 467 pb.

Digestión con **Ava2**: 49, 69, 57, 43, 249 pb

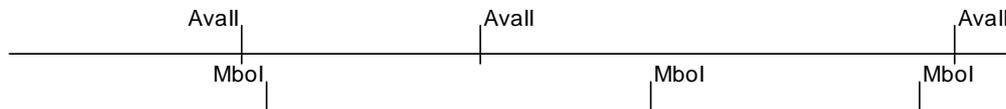
Digestión con **MboI**: 21, 85, 192, 169 pb



ABO56515: amplificado de 470 pb.

Digestión con **Ava**2: 109, 112, 222, 27 pb.

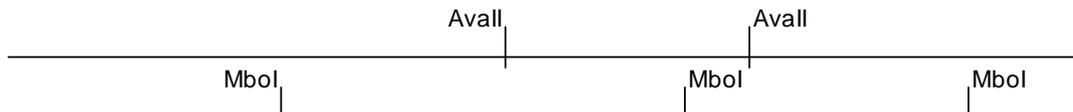
Digestión con **Mbo**I: 121, 180, 126, 43 pb.



ABO56516: amplificado de 479 pb.

Digestión con **Ava**2: 221, 109, 149 pb.

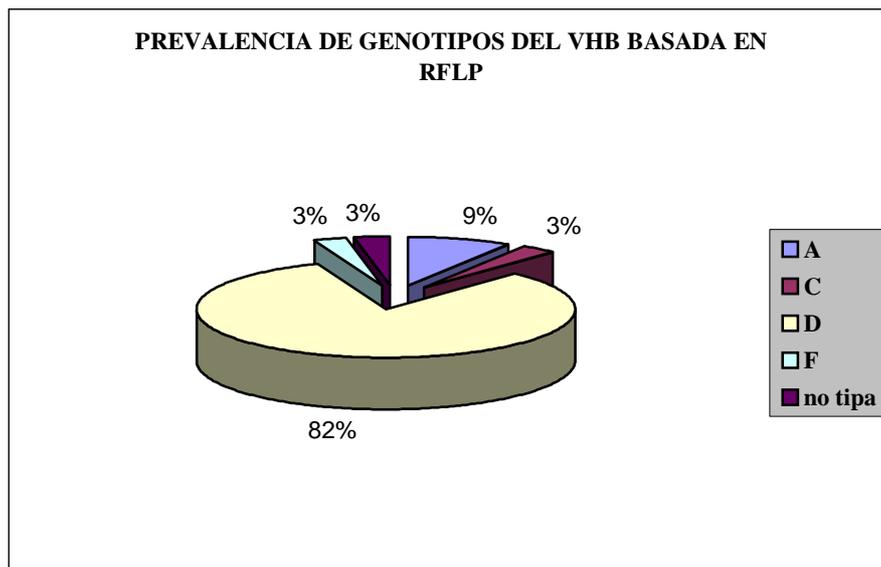
Digestión con **Mbo**I: 121, 180, 126, 52 pb.



Ninguno de los tres aislados que resultaron "no tipables" por RFLP responden al hipotético patrón que describimos para el genotipo G.

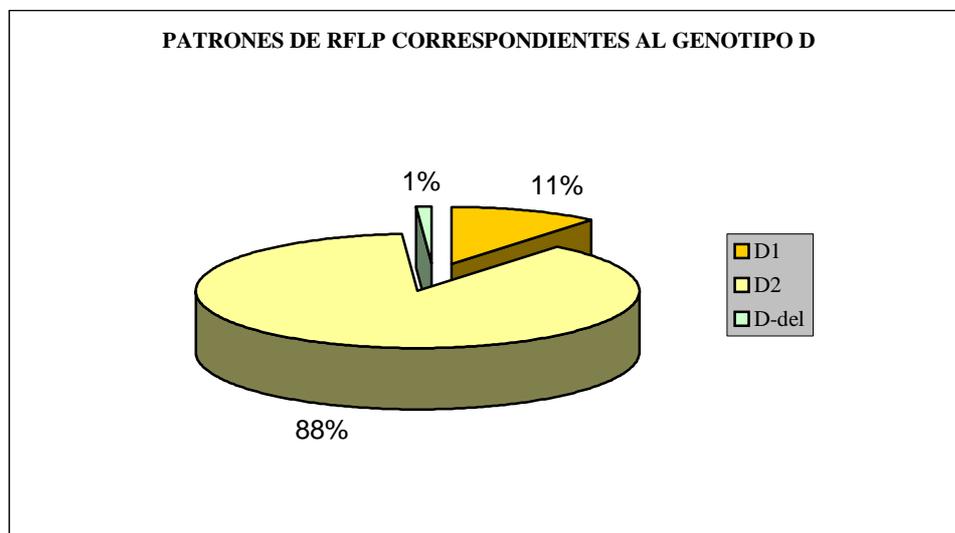
Según el método de genotipado basado en RFLP obtenemos los siguientes resultados: el 82 % (83/101) son virus de genotipo D, el 9 % (9/101) son de genotipo A, el 3% (3/101) del genotipo C, el 3% (3/101) del genotipo F y el 3% (3/101) no son tipables por este sistema ya que presentan un patrón que no se corresponde con ninguno de los ya descritos (Gráfica 1).

Ninguno de los dos aislados "no tipables" por RFLP responden al hipotético patrón que describimos para el genotipo G.



Gráfica 1. Prevalencia de genotipos del virus de la hepatitis B. Análisis realizado mediante RFLP (Lindh et al., 1998).

Dentro del genotipo D se observan tres patrones diferentes, son los patrones denominados D1, D2 y D-deleccionado. El 11%(9/83) de los genotipados como D corresponden al patrón D1; el 88%(73/83) corresponden al patrón D2 y el 1,2%(1/83) corresponden al patrón D-deleccionado.



Gráfica 2. Patrones correspondientes al genotipo D mediante análisis de RFPL.

Trece pacientes presentan coinfección con VHC, de estos, 5 presentan el patrón D1. Por tanto, 5 de los 9 patrones D1 encontrados en el estudio corresponden con pacientes que presentan coinfección con VHC.

Se detectan coinfecciones con genotipos diferentes del VHB en 5 casos mediante sucesivos análisis de RFLP a lo largo del seguimiento de estos pacientes en el período de estudio:

1. tres cambios de genotipo D (D2) por genotipo A. En dos de estos casos se observa un significativo aumento de la carga viral.
2. un cambio de genotipo G por genotipo A.
3. un cambio de genotipo D (D2) por un genotipo F. Se observa un aumento de carga viral de 8,5 a 1300 pg/mL y se mantiene esta elevación en tres determinaciones posteriores.
4. dos cambios de patrón de RFLP dentro del genotipo D. Un cambio de D2 hacia D1 y un cambio del patrón D-del hacia D2. En ambos casos se observa un aumento de la carga viral coincidiendo con la detección del patrón diferente.

1.1.2 GENOTIPADO MEDIANTE PCR ESPECÍFICA.

Este sistema de genotipado está basado en la realización de una PCR que emplea cebadores específicos de genotipo.

Los resultados representados en la tabla 1 fueron obtenidos después de realizar ensayos en los que se mejoró la especificidad de este método. Los medios empleados para ello fueron el uso de "TaqGold polimerasa" como describen los autores de este método y además se empleó un programa de "touchdown PCR". De esta forma se eliminan algunas de las bandas inespecíficas que aparecen inicialmente.

En la figura siguiente se pueden observar diferencias en la especificidad de la reacción reflejada en la cantidad de bandas del método basado en PCR específica aplicando distintos programas de amplificación (programa general frente al programa de "touchdown").

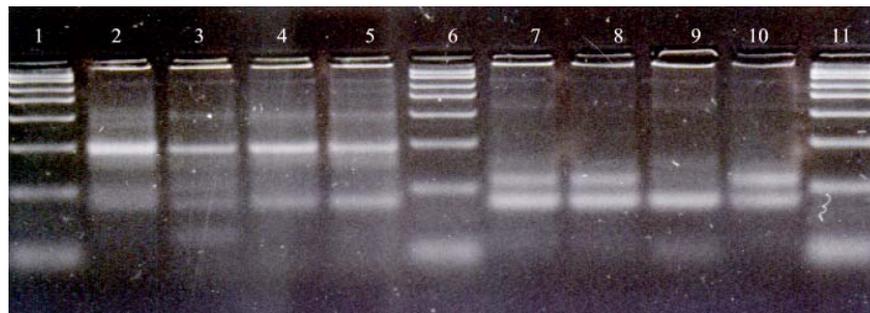


Figura 5A.



Figura 5B.

Fig 5. Genotipado por PCR con cebadores específicos. Figura 5A: Amplificación realizada con el programa general descrito por los autores del método de genotipado; calle 1: marcador de peso molecular; las calles 2-5 corresponden a cuatro muestras diferentes amplificadas con la mezcla de cebadores que hibridan con los genotipos A, B y C. Calles 7-10 se corresponden con

los productos obtenidos con las mismas muestras pero con la mezcla de cebadores que hibridan con los genotipos D, E y F. No se puede, por lo tanto, asignar un genotipo concreto a ninguna de estas muestras ya que cada banda representa la supuesta presencia de un genotipo diferente. Figura 5B: Amplificación realizada con el programa de touchdown-PCR; calle 1 marcador de peso molecular; calles 2-4 se corresponden con las muestras de las calles 3-5 de la figura anterior y las calles 6,7 y 8 son las muestras de las calles 8,9 y 10 de la figura anterior. Se asignan, por lo tanto, los genotipos D, F y D a cada una de las tres muestras respectivamente.

Se obtiene un resultado definitivo en 24/40(60%) de los casos, en 13/40(32,5%) no se puede asignar un genotipo concreto al virus y en 3/40(7,5%) no se obtiene amplificado (Tabla 1).

	PCR específica
1	I
2	I
3	D
4	I
5	D
6	D
7	D
8	I
9	E
10	F
11	F
12	I
13	I
14	D
15	D
16	D
17	A
18	D
19	D
20	A
21	A
22	
23	D
24	D
25	I
26	D
27	
28	D
29	D
30	I
31	D
32	I
33	I
34	I
35	D
36	D
37	I
38	
39	D
40	i

Tabla 1. Resultados de genotipado obtenidos mediante el empleo de la PCR específica que emplea cebadores específicos de genotipo.

La prevalencia de genotipos observada mediante el empleo de este método es la siguiente: 18/40(45%) son genotipo D; 3/40(7,5%) son genotipo A; 2/40(5%) son genotipo F; 1/40(2,5%) es genotipo E.

1.1.3 SISTEMA DE GENOTIPADO BASADO EN EL ANÁLISIS POR SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN QUE INCLUYE EL MOTIVO YMDD DEL GEN DE LA POLIMERASA.

Análisis de las secuencias mediante el programa PHYLIP y OMIGA2.0:

Realizando un muestreo al azar de secuencias publicadas en la base de datos del NCBI se comprobó la validez de este método. Las secuencias obtenidas de este muestreo aleatorio se analizaron mediante comparación con las secuencias consenso empleando el programa PHYLIP. Se observó un 91% de concordancias en el resultado de la comparación (Anexo I).

Se aplica este tipo de análisis comparativo de la región de la polimerasa que incluye el motivo YMDD a 40 pacientes (Tabla 2).

Se obtiene la siguiente prevalencia de genotipos: 26/40(65%) genotipo D, 10/40(25%) genotipo A, 3/40(7,5%) genotipo F, 1/40(2,5%) genotipo G. El análisis de estas mismas muestras mediante el empleo de RFLP rindió los siguientes resultados: 26/40(65%) genotipo D, 6/40(15%) genotipo A, 3/40(7,5%) genotipo F, 3/40(7,5%) genotipo C y 2/40(5%) no genotipa. Por lo tanto, existe concordancia en 34/40(85%) casos.

Pacientes	GENOTIPO							YMDD	RFLP	
	A	B	C	D	E	F	G			
1	0,0121	0,0454	0,0676	0,0546	0,0859	0,1047	0,0455	A	A	=
2	0,0121	0,0454	0,0676	0,0546	0,0859	0,0995	0,0455	A	C	No
3	0,0950	0,0857	0,1136	0,0721	0,1001	0,0455	0,0677	F	F	=
4	0,0245	0,0498	0,0717	0,0502	0,0768	0,1004	0,0499	A	C	No
5	0,008	0,0411	0,063	0,0502	0,0812	0,0998	0,0412	A	A	=
6	0,0998	0,0814	0,1047	0,0723	0,0907	0,0163	0,0723	F	F	=
7	0,0414	0,0413	0,0411	0,0203	0,0585	0,0768	0,0497	D	D	=
8	0,0121	0,0454	0,0676	0,0546	0,0859	0,0995	0,0455	A	A	=
9	0,1047	0,0862	0,1096	0,077	0,0955	0,0121	0,077	F	F	=
10	0,0632	0,0717	0,0541	0,0162	0,0632	0,0812	0,0628	D	D	=
11	0,0372	0,0329	0,0413	0,0245	0,0499	0,0723	0,0412	D	D	=
12	0,0458	0,0542	0,037	0	0,0458	0,0633	0,0455	D	D	=
13	0,0372	0,0371	0,0369	0,0162	0,0542	0,0723	0,0454	D	D	=
14	0,0372	0,0371	0,0369	0,0162	0,0542	0,0723	0,0454	D	D	=
15	0,0372	0,0371	0,0369	0,0162	0,0542	0,0723	0,0454	D	D	=
16	0,004	0,0285	0,0628	0,0501	0,0766	0,0904	0,0286	A	A	=
17	0,0414	0,0413	0,0411	0,0203	0,0585	0,0768	0,0497	D	D	=
18	0,0415	0,0414	0,0412	0,0203	0,0587	0,077	0,0498	D	NT	=
19	0,0458	0,0628	0,0454	0,008	0,0544	0,0721	0,0455	D	D	=
20	0,0372	0,0371	0,0369	0,0162	0,0542	0,0723	0,0454	D	D	=
21	0,0372	0,0371	0,0369	0,0162	0,0542	0,0723	0,0454	D	D	=
22	0,0458	0,0542	0,037	0	0,0458	0,0633	0,0455	D	D	=
23	0,0121	0,0369	0,0717	0,0588	0,0857	0,0998	0,037	A	C	No
24	0,0414	0,0413	0,0327	0,0121	0,0499	0,0679	0,0497	D	D	=
25	0,0372	0,0371	0,0369	0,0162	0,0542	0,0723	0,0454	D	D	=

26	0,0372	0,0371	0,0369	0,0162	0,0542	0,0723	0,0454	D	D	=
27	0,0372	0,0371	0,0369	0,0162	0,0542	0,0723	0,0454	D	D	=
28	0,0372	0,0371	0,0369	0,0162	0,0542	0,0723	0,0454	D	D	=
29	0,0372	0,0371	0,0369	0,0162	0,0542	0,0723	0,0454	D	D	=
30	0,004	0,0285	0,0628	0,0501	0,0766	0,0904	0,0286	A	A	=
31	0,0372	0,0371	0,0369	0,0162	0,0542	0,0723	0,0454	D	D	=
32	0,0458	0,0542	0,037	0	0,0458	0,0633	0,0455	D	D	=
33	0,0327	0,0244	0,0497	0,0455	0,0544	0,0677	0	G	NT	
34	0,0414	0,0413	0,0327	0,0121	0,0499	0,0679	0,0497	D	D	=
35	0,0502	0,0587	0,0371	0,004	0,0502	0,0679	0,0499	D	D	=
36	0,0415	0,0414	0,0412	0,0203	0,0587	0,077	0,0498	D	D	=
37	0,004	0,0369	0,0541	0,0414	0,0719	0,0998	0,037	A	A	=
38	0,0587	0,0585	0,0412	0,0203	0,0501	0,077	0,0413	D	D	=
39	0,0458	0,0542	0,037	0	0,0458	0,0633	0,0455	D	D	=
40	0,0121	0,0454	0,0676	0,0546	0,0859	0,0995	0,0455	A	D	No

Tabla 2. Resultados obtenidos mediante el análisis de la región de 250 bp de la polimerasa del VHB. NT= no tipa (análisis realizado empleando el programa PHYLIP). El valor en negrita nos indica la máxima similitud entre secuencias.

Por otro lado se realizó el estudio de homologías de secuencia con el programa OMIGA 2.0. Se asigna a cada muestra el genotipo que presenta mayor proporción de homología de secuencia con el genotipo consenso (expresada en porcentaje). Los resultados obtenidos son los siguientes:

	<u>Pacientes y consenso</u>
Secuencia 1:	100-A
Secuencia 2:	101-D
Secuencia 3:	102-A
Secuencia 4:	103-D
Secuencia 5:	106-D
Secuencia 6:	107-D
Secuencia 7:	11-A
Secuencia 8:	113-F
Secuencia 9:	121-A
Secuencia 10:	130-D
Secuencia 11:	132-F
Secuencia 12:	133-D
Secuencia 13:	134-D
Secuencia 14:	135-D
Secuencia 15:	136-D
Secuencia 16:	A V00866 consenso
Secuencia 17:	B D23679 consenso
Secuencia 18:	C V00867 consenso
Secuencia 19:	D J02203 consenso
Secuencia 20:	E X75664 consenso
Secuencia 21:	F X75663 consenso
Secuencia 22:	G AB056513 consenso

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	A	B	C	D	E	F	G
1		94	98	94	95	95	99	90	98	94	91	94	95	94	94	98	95	93	94	92	90	95
2			95	98	99	99	94	92	95	98	92	97	99	99	99	96	96	96	98	94	92	95
3				95	96	96	98	91	98	95	90	95	96	95	95	99	97	94	95	92	91	97
4					99	99	94	92	95	99	92	98	99	98	98	95	95	96	99	94	94	94
5						100	95	92	95	98	92	97	100	99	99	96	96	96	98	94	93	95
6							95	92	95	98	92	97	100	99	99	96	96	96	98	94	93	95
7								90	98	94	91	94	95	94	94	98	95	93	94	92	90	95
8									90	93	95	92	92	92	92	91	92	89	93	90	95	93
9										95	91	95	95	95	95	97	95	93	95	92	90	95
10											92	99	98	98	98	95	94	96	100	95	94	95
11												92	92	92	92	90	92	90	92	91	98	92
12													97	97	97	95	94	95	99	94	93	95
13														99	99	96	96	96	98	94	93	95
14															99	96	96	96	98	94	92	95
15																96	96	96	98	94	92	95
A																	96	94	95	92	91	96
B																		95	94	94	92	97
C																			96	95	91	95
D																				95	94	95
E																					92	94
F																						93
G																						

Pacientes y consenso

Secuencia 1:	137-A
Secuencia 2:	138-D
Secuencia 3:	140-D
Secuencia 4:	142-D
Secuencia 5:	143-F
Secuencia 6:	145-D
Secuencia 7:	153-D
Secuencia 8:	154-A
Secuencia 9:	160-D
Secuencia 10:	161-D
Secuencia 11:	163-D
Secuencia 12:	173-A
Secuencia 13:	20-D
Secuencia 14:	213-D
Secuencia 15:	A V00866 consenso
Secuencia 16:	B D23679 consenso
Secuencia 17:	C V00867 consenso
Secuencia 18:	D J02203 consenso
Secuencia 19:	E X75664 consenso
Secuencia 20:	F X75663 consenso
Secuencia 21:	G AB056513 consenso

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	A	B	C	D	E	F	G
1		94	95	94	90	95	93	98	95	95	94	99	94	94	98	96	93	94	92	90	96
2			99	98	92	99	97	95	99	99	98	95	98	98	96	96	96	98	95	93	95
3				98	92	100	97	95	100	100	98	96	98	99	96	96	96	98	94	93	95
4					93	98	98	95	98	98	100	95	100	97	95	94	96	100	95	94	95
5						92	94	91	92	92	93	91	93	92	90	92	90	93	91	98	93
6							97	95	100	100	98	96	98	99	96	96	96	98	94	93	95
7								95	97	97	98	94	98	96	94	94	95	98	94	92	94
8									95	95	95	98	95	94	99	96	94	95	92	90	96
9										100	98	96	98	99	96	96	96	98	94	93	95
10											98	96	98	99	96	96	96	98	94	93	95
11												95	100	97	95	94	96	100	95	94	95
12													95	95	99	97	94	95	92	91	97
13														97	95	94	96	100	95	94	95
14															95	95	95	97	94	92	94
A																96	94	95	92	91	96
B																	95	94	94	92	97
C																		96	95	91	95
D																			95	94	95
E																				92	94
F																					93
G																					

Pacientes y consenso

Secuencia 1:	221-D
Secuencia 2:	223-D
Secuencia 3:	30 -D
Secuencia 4:	31-D
Secuencia 5:	4-A
Secuencia 6:	44-D
Secuencia 7:	76-D
Secuencia 8:	80-D
Secuencia 9:	81-G
Secuencia 10:	82-D
Secuencia 11:	87-A
Secuencia 12:	88-D
Secuencia 13:	89-A
Secuencia 14:	90-D
Secuencia 15:	97-D
Secuencia 16:	A V00866 consenso
Secuencia 17:	B D23679 consenso
Secuencia 18:	C V00867 consenso
Secuencia 19:	D J02203 consenso
Secuencia 20:	E X75664 consenso
Secuencia 21:	F X75663 consenso
Secuencia 22:	G AB056513 consenso

Análisis de datos discordantes.

Encontramos dos muestras que resultaron no tipables por RFLP. Al analizarlas mediante el análisis de la región YMDD, obtenemos que una de ellas corresponde al

genotipo D y la otra a un genotipo G. Por otro lado, tres muestras son discordantes respecto al análisis RFLP.

A. **Verificación del genotipo G.** Para verificar el genotipo G se realizaron los siguientes estudios:

a. **Secuenciación del gen S:** se secuenció el gen S y se comparó con las siete secuencias consenso deducidas en nuestro estudio.

	AY168428	VHB G AB064313	VHB A V00866	VHB B D23679	VHB C V00867	VHB D J02203	VHB F X75663	VHB E X75664
AY168428		99	95	94	94	94	92	94
VHB G AB064313			95	94	94	94	92	94
VHB A V00866				95	94	95	91	94
VHB B D23679					94	94	92	94
VHB C V00867						94	92	94
VHB D J02203							92	96
VHB F X75663								92
VHB E X75664								

Tabla 3. Porcentajes de homología entre el aislado AY168428 y las secuencias consenso representativas de cada genotipo.

En el resultado se observa una mayor concordancia de secuencia con el consenso correspondiente al genotipo G (99% de homología de secuencia). La divergencia de nucleótidos respecto a las otras secuencias consenso es mayor del 5%, siendo la más grande la presentada respecto al genotipo F (8%) y la menor la presentada respecto al genotipo A (5%).

b. **Análisis de homología de secuencia con secuencias publicadas en la base de datos del NCBI:** se realiza este análisis con secuencias correspondientes al genotipo G cuyos números de acceso a la base de datos son los siguientes: 05706 56513 56514 56515 56516 64310 64311 64312 64314 64315 64316.

	05706	56513	56514	56515	56516	64310	64311	64312	64313	64314	64315	64316	428
05706	1,000	0,997	0,998	0,994	0,998	0,998	0,998	0,998	0,997	0,958	0,929	0,930	0,998
56513	---	1,000	0,998	0,994	0,998	0,998	0,998	0,998	0,997	0,958	0,926	0,928	0,998
56514	---	---	1,000	0,995	1,000	1,000	1,000	1,000	0,998	0,960	0,928	0,929	1,000
56515	---	---	---	1,000	0,995	0,995	0,995	0,995	0,994	0,960	0,926	0,928	0,995
56516	---	---	---	---	1,000	1,000	1,000	1,000	0,998	0,960	0,928	0,929	1,000
64310	---	---	---	---	---	1,000	1,000	1,000	0,998	0,960	0,928	0,929	1,000
64311	---	---	---	---	---	---	1,000	1,000	0,998	0,960	0,928	0,929	1,000
64312	---	---	---	---	---	---	---	1,000	0,998	0,960	0,928	0,929	1,000
64313	---	---	---	---	---	---	---	---	1,000	0,958	0,926	0,928	0,998
64314	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,000	0,917	0,926	0,960
64315	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,000	0,960	0,928
64316	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,000	0,929
428	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,000

Tabla 4. Matriz de distancias de la secuencia del gen S del aislado AY168428 (denominado en la tabla con las tres últimas cifras) comparada con las secuencias publicadas en e la base de datos del NCBI correspondientes al genotipo G.

El aislado AY168428, respecto a cinco de las secuencias publicadas en la base de datos del NCBI, presenta una homología del 100% en su gen S. Respecto a otras cuatro secuencias posee una homología del 99% y con el resto de las secuencias presenta el 96 y 92% de homologías. Estas últimas secuencias también presentan entre sí diferencias elevadas. La secuencia del aislado del genotipo G ha sido publicada en la base de datos GenBank el número de acceso AY168428 (Anexo III).

- c. **Realización de una PCR con cebadores específicos de genotipo G:** en esta amplificación uno de los cebadores híbrida en la inserción de 36 nt de la región del core que sólo poseen los genomas de genotipo G. Se obtiene un resultado positivo (Figura 6).

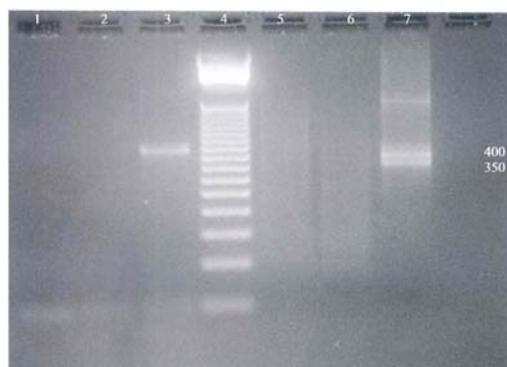


Figura 6. Amplificación del aislado AY168428. Calle 1 control negativo; calle 2 control de muestra positiva para ADN del VHB de genotipo A; calle 3 muestra problema (81); calles 5-7 son las mismas muestras después de la segunda amplificación.

B. Análisis de la muestra con patrón no tipable por RFLP.

Al secuenciar el gen S de esta muestra obtenemos una homología de secuencia con el genotipo A mayor que con los otros genotipos.

C. Análisis de las muestras discordantes:

Al realizar el análisis de secuencias en la región comprendida entre P1 y P2 de las muestras que resultaron discordantes entre ambos métodos se observaron unos cambios de nucleótido que alteran el patrón de restricción. A continuación está representado el ensamblaje de las tres secuencias discordantes obtenido después de secuenciar la región pre-S. La flecha indica el lugar donde se encuentra el nucleótido que conduce a un cambio de patrón de restricción.

Posteriormente se secuenció el gen S de una de estas muestras (muestra 21) (Anexo IV). El resultado de la comparación con las secuencias consenso nos indica que se corresponde con el genotipo A, presentando un 99% de homología con la secuencia consenso de genotipo A.

	G AB056513	A V00866	B D23679	C V00867	D J02203	F X75663	E X75664	21
G B056513		95	94	94	94	92	94	95
A V00866			95	94	95	91	94	99
B D23679				94	94	92	94	94
C V00867					94	92	94	94
D J02203						92	96	94
F X75663							92	91
E X75664								93
21								

Tabla 5. Porcentajes de identidad entre la muestra 21 y las secuencias consenso considerando el gen S completo.

1.1.4 SISTEMA DE GENOTIPADO BASADO EN HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

En la Tabla 6 se presentan los resultados obtenidos mediante el empleo del sistema de genotipado basado en la hibridación con sondas de ácidos nucleicos específicas de genotipo diseñadas en una región del gen de superficie.

Se obtiene la siguiente prevalencia de genotipos: 27/40(67,5%) genotipo D, 8/40(20%) genotipo A, 2/40(5%) genotipo G, y 3/40(7,5%) coinfecciones. Las coinfecciones encontradas son las siguientes: D/F, F/D y G/A.

	RFLP	LiPA
1	D	D
2	C	A
3	D	D
4	D	D
5	D	D
6	D	D
7	D	D
8	A	A
9	D	D
10	F	F
11	F	F
12	A	A
13	A	A
14	D	D
15	D	D
16	D	D
17	A	A
18	D	D
19	D	D
20	A	A
21	A	A
22	D	D/F
23	D	D
24	D	D
25	F	F/D
26	D	D
27	NT	D
28	D	D
29	D	D
30	D	D
31	D	D
32	D	D
33	D	D
34	D	D
35	D	D
36	D	D
37	D	D
38	NT	G/A
39	D	D
40	NT	A

Tabla 6. Comparación del resultados obtenidos mediante los métodos de RFLP y LiPA.

1.2 COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE GENOTIPADO

En la siguiente tabla están representados los genotipos obtenidos del análisis de 40 muestras empleando los métodos anteriormente descritos.

	RFLP	PCR específica	YMDD	LIPA	REFERENCIA	COINFECCIONES EN LIPA
1	D	Ind	D	D	D	
2	C	Ind	A	A	A	
3	D	D	D	D	D	
4	D	ind	D	D	D	
5	D	D	D	D	D	
6	D	D	D	D	D	
7	D	D	D	D	D	
8	A	Ind	A	A	A	
9	D	E	A	D	D	
10	F	F	F	F	F	
11	F	F	F	F	F	
12	A	Ind	A	A	A	
13	A	ind	A	A	A	
14	D	D	D	D	D	
15	D	D	D	D	D	
16	D	D	D	D	D	
17	A	A	A	A	A	
18	D	D	D	D	D	
19	D	D	D	D	D	
20	A	A	A	A	A	
21	A	A	A	A	A	
22	D		D	D	D	D/F
23	D	D	D	D	D	
24	D	D	D	D	D	
25	F	Ind	F	F	F	F/D
26	D	D	D	D	D	
27	NT		D	D	D	
28	D	D	D	D	D	
29	D	D	D	D	D	
30	D	Ind	D	D	D	
31	D	D	D	D	D	
32	D	Ind	D	D	D	
33	D	Ind	D	D	D	
34	D	Ind	D	D	D	
35	D	D	D	D	D	
36	D	D	D	D	D	
37	D	Ind	D	D	D	
38	NT		G	G	G	G/A
39	D	D	D	D	D	
40	NT	Ind	A	A	A	

Tabla 7. Comparación de los métodos de genotipado de RFLP, PCR múltiple, secuenciación de YMDD y LIPA. Las casillas sombreadas representan las muestras que presentaron coinfección con otros genotipos o cambio de patrón mediante sucesivos análisis de RFLP.

En las siguientes tablas se representan los resultados de la comparación de cada uno de los métodos de genotipado respecto a un genotipo consenso que hemos empleado como referencia.

Recuento		REFERENCIA				TOTAL
		A	D	F	G	
RFLP	A	6				6
	C	1				1
	D		27			27
	F			3		3
	NT	1	1		1	3
Total		8				40

Tabla 8. Comparación entre el método de RFLP y el de referencia.

El porcentaje de acuerdo entre el método de RFLP y el referencia es del 90%, kappa= 0,688, con un intervalo de confianza de (0,402-0,972), $p < 0,00001$.

Recuento		REFERENCIA				TOTAL
		A	D	F	G	
PCR específica	A	3				3
	D		18			18
	E		1			1
	F			2		2
	i	5	7	1		13
	n		2		1	3
Total		8	28	3	1	40

Tabla 9. Comparación entre el método basado en PCR específica y el de referencia.

El porcentaje de acuerdo entre el método de basado en una PCR específica y el referencia es del 57,5%, kappa= -0,037, con un intervalo de confianza de (-0,340-0,267), $p < 0,81661$.

Recuento		REFERENCIA				TOTAL
		A	D	F	G	
SECUENCIACIÓN YMDD	A	8	1			9
	D		27			27
	F			3		3
	G				1	1
Total		8	28	3	1	40

Tabla 10. Comparación entre el método basado en secuenciación de la región YMDD y el de referencia.

El porcentaje de acuerdo entre el método basado en la secuenciación de la región YMDD y el referencia es del 97,5%, kappa= 0,950, con un intervalo de confianza de (0,854-1,000), $p < 0,00000$.

Recuento		REFERENCIA				TOTAL
		A	D	F	G	
LiPA	A	8				8
	D		28			28
	F			3		3
	G				1	1
Total		8	28	3	1	40

Tabla 11. Comparación entre el método de LiPA y el de referencia.

El porcentaje de acuerdo entre el método de LIPA y el de referencia es del 100%, kappa= 1, $p < 0,00000$.

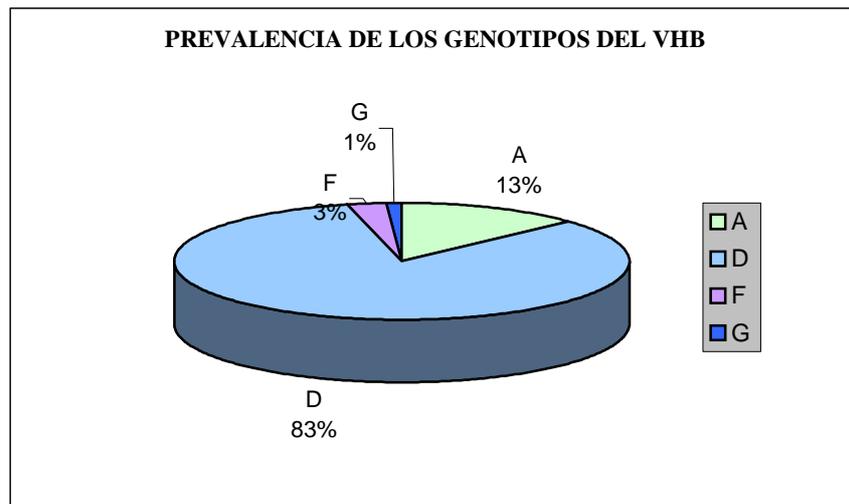
De las tres coinfecciones detectadas mediante LiPA sólo una de ellas es detectada en sucesivos análisis mediante RFLP, se trata de la coinfección G/A.

Seis coinfecciones se estudian por ambos sistemas pero sólo se detectan mediante análisis sucesivos de RFLP y no son detectadas mediante LiPA. Se trata de las muestras 11, 21, 31, 34, 38 y 39.

1.3 PREVALENCIA DE GENOTIPOS DEL VHB.

1.3.1 PREVALENCIA TOTAL DE GENOTIPOS

Entre los casos de infección por el VHB registrados en nuestra región durante el periodo de estudio obtenemos los siguientes resultados finales de prevalencia de genotipos del VHB: **13% (13/101) genotipo A, 83% (84/101) genotipo D, 3% (3/101) genotipo F y 1% (1/101) genotipo G.**



Gráfica 4. Porcentaje de genotipos del VHB en la población estudiada.

Después de realizar el análisis de la secuencia del gen S de las dos muestras que resultaron discordantes por los métodos de RFLP y secuenciación se consideran como genotipo A y genotipo D respectivamente.

Entre los pacientes con infección crónica presentan el genotipo D el 83% (80/96) y el 12% (13/96) presentan el genotipo A. Los cinco pacientes con infección aguda presentaron infección con VHB de genotipo D en 4/5 y genotipo A en 1/5.

Considerando una clasificación genotípica del VHB en genotipo D y genotipos "No D" no se observa una relación significativa con la carga viral, con anti-HBcIgM positivo, con coinfección con VHC y con VIH y con la ALT. Se observa mayor proporción de pacientes sometidos a tratamiento entre los infectados con los genotipos "No D" ($p=0,008$) que entre los infectados con el genotipo D. También la presencia del Ag-HBe positivo es superior entre los pacientes infectados con los genotipo "No D" que

entre los infectados con el genotipo D ($p=0,35$). Resultados representados en la tabla 12.

	<i>Genotipo No D</i> <i>N=17</i>	<i>Genotipo D</i> <i>n=84</i>	<i>p value</i>
Anti-HBc positivo	16(94%)	82(98%)	0,428
Ag-HBe positivo	12(71%)	35(42%)	0,035
Anti-HBcIgM positivo	2(12%)	15(88%)	1,000
Anti-VHC positivo	0	13(15%)	0,118
Anti-VIH	1(6%)	6(7%)	1,000
Enfermos crónicos	16(94%)	80(95%)	1,000

	<i>Genotipo No D</i> <i>n=11</i>	<i>Genotipo D</i> <i>n=42</i>	<i>p value</i>
Tratamiento con Lamivudina	10(91%)	19(45%)	0,008

	<i>Genotipo No D</i> <i>n=17</i>	<i>Genotipo D</i> <i>n=71</i>
Edad	38,8±10,74	40,65±16,22

	<i>Genotipo No D</i> <i>n=15</i>	<i>Genotipo D</i> <i>n=59</i>	<i>p value</i>
ALT(UI/L)	60(31,193)	40(23,73)	0,125

	<i>Genotipo No D</i> <i>n=15</i>	<i>Genotipo D</i> <i>n=65</i>	<i>p value</i>
Carga viral (pg/mL)	810(86,2200)	720(22,6200)	0,810

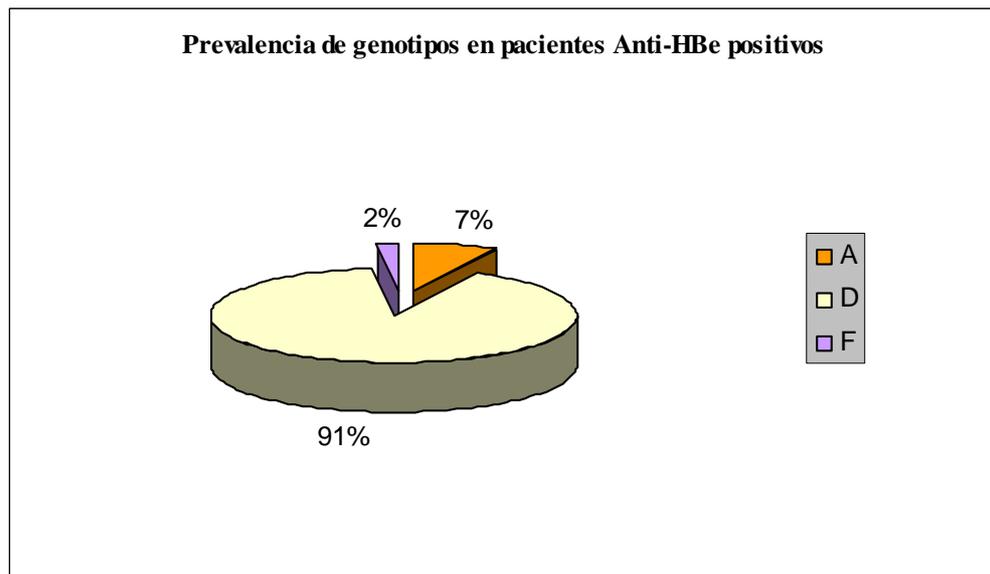
Tabla 12. Características de los pacientes en relación al genotipo viral clasificado como D y "No D".

1.3.2 PREVALENCIA DE GENOTIPOS EN BASE A LA SITUACIÓN SEROLÓGICA AG-HBE/ANTI-HBE.

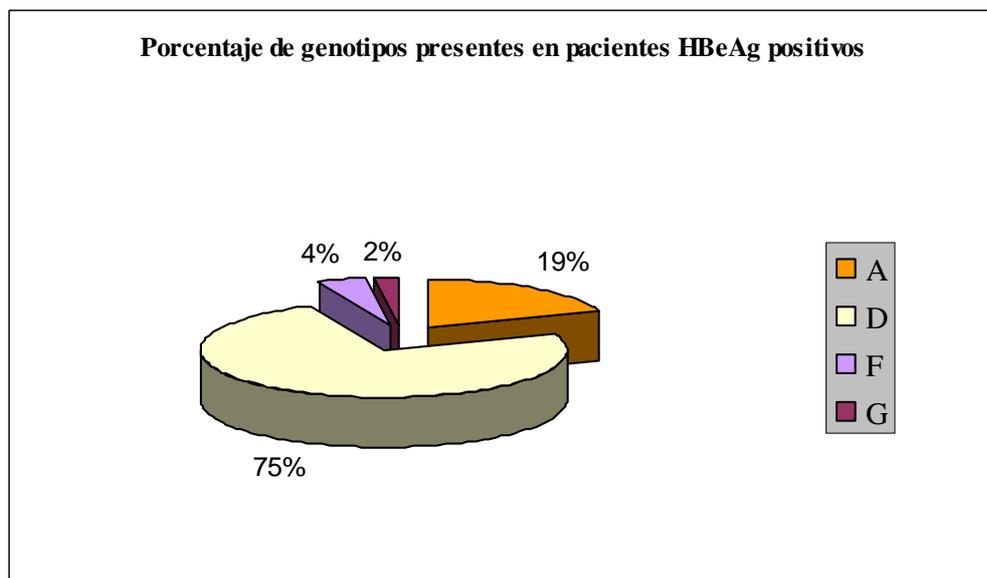
En cuanto al estado serológico de los pacientes anti-HBe/Ag-HBe encontramos la siguiente distribución: 54/101(53,5%) son anti-HBe positivos y 47/101(46,5%) son Ag-HBe positivos.

Entre los pacientes que presentan anti-HBe positivo encontramos la siguiente distribución de genotipos del VHB: el 91% son de genotipo D (49/54); 7% son genotipo A (4/54) y 2% es genotipo F(1/54).

Entre los que presentan Ag-HBe positivo encontramos la siguiente distribución: el 75% (35/47) son genotipo D; 19% son del genotipo A(9/47); 4%(2/47) son del genotipo F y 2%(1/47) es del genotipo G.



Gráfica 5. Porcentaje de genotipos del VHB en pacientes que presentan Ag-HBe negativo.



Gráfica 6. Porcentaje de genotipos del VHB en pacientes que presentan Ag-HBe positivo.

Entre los pacientes que presentan Ag-HBe positivo la media de edad es de $36,1 \pm 16,3$ y entre los pacientes que presentan anti-HBe positivo la media de edad es de $44,11 \pm 13,3$.

No existe una relación entre la positividad del Ag-HBe con los niveles de ALT que presentan los pacientes. La carga viral del VHB está más elevada en pacientes que presentan Ag-HBe positivo respecto a los que presentan anti-HBe positivo (Tabla 13).

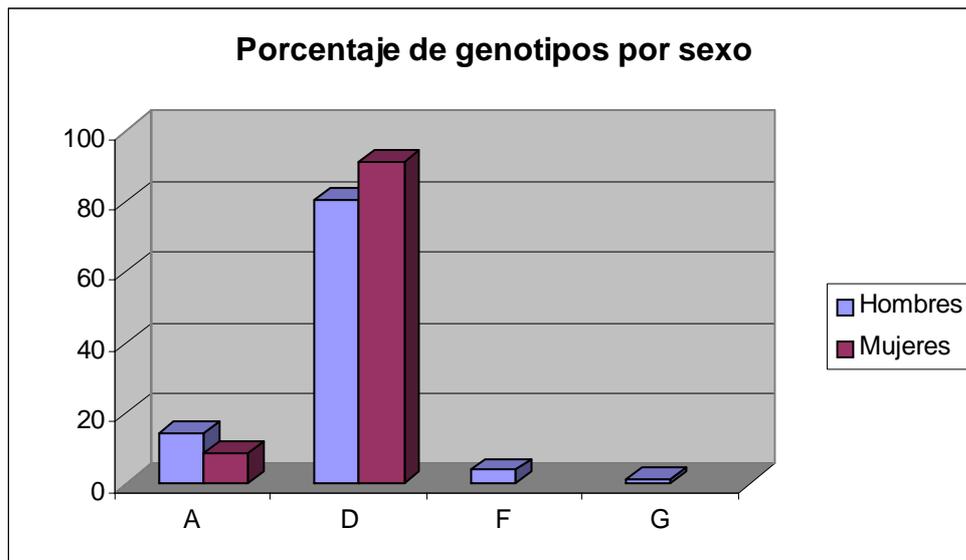
	<i>Ag-HBe positivo</i> <i>n=47</i>	<i>Anti-HBe positivo</i> <i>n=54</i>	<i>p value</i>
Hombres (75%)	34(72%)	42(78%)	0,645
Anti-HBc positivo	44(94%)	54(100%)	0,097
Anti-HBcIgM positivo	9(19%)	4(7%)	0,134
Anti-VHC positivo	8(17%)	5(9%)	0,372
Anti-VIH	5(11%)	2(4%)	0,246
Enfermos Crónicos	44(94%)	52(96%)	0,661
	<i>Ag-HBe positivo</i> <i>n=25</i>	<i>Anti-HBe positivo</i> <i>n=28</i>	<i>p value</i>
Tratamiento con Lamivudina	15(60%)	14(50%)	0,583
	<i>Ag-HBe positivo</i> <i>n=42</i>	<i>Anti-HBe positivo</i> <i>n=46</i>	<i>p value</i>
Edad	36,1±16,3	44,11±13,3	
	<i>Ag-HBe positivo</i> <i>n=37</i>	<i>Anti-HBe positivo</i> <i>n=37</i>	<i>p value</i>
ALT(UI/L)	120(8,1407)	87(10,477)	0,563
	<i>Ag-HBe positivo</i> <i>n=41</i>	<i>Anti-HBe positivo</i> <i>n=39</i>	<i>p value</i>
Carga viral (pg/mL)	6259(4,19000)	1229(3,14000)	0,000

Tabla 13. Características de los pacientes en relación al estado serológico Ag-HBe/antiHBe.

1.3.3 PREVALENCIA DE GENOTIPOS POR SEXO.

La distribución por sexos de los genotipos es la siguiente:

- 25 mujeres de las cuales 23 presentan infección con el genotipo D (92%) y 2 (8%) con el genotipo A.
- 76 hombres de los cuales 61 presentan infección con el genotipo D(80%), 11 (15%) con el genotipo A , 3 (4%) presentan el genotipo F y 1(1%) con el genotipo G.



Gráfica 7 . Porcentajes de genotipos del VHB según el sexo de los pacientes.

En base a la clasificación de los genotipos en dos categorías, D y "No D", no encontramos diferencia significativa de distribución de genotipos entre ambos sexos ($p=0,228$)(tabla 12).

	Mujeres	Varones	Total
No D	2(12%)	15(88%)	17
D	23(27%)	61(73%)	84
total	25	76	101

Tabla 12. Prevalencia de genotipos clasificados como D y No D en relación al sexo de los pacientes.

2. DETECCIÓN DE RESISTENCIAS AL TRATAMIENTO CON LAMIVUDINA

2.1 SENSIBILIDAD DEL MÉTODO

Para la medida de la sensibilidad del empleo de los cebadores SQ1 y SS se realizan diluciones seriadas de un muestra de carga viral 1200pg/mL. Se detecta amplificado de la muestra hasta una dilución de 10^6 .

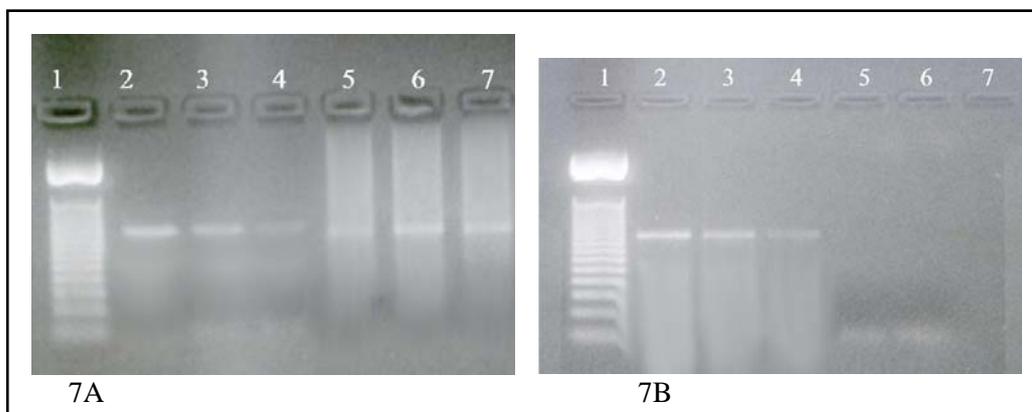


Figura 7. 7A. Resultados obtenidos de la primera amplificación con SQ1 y SS de una muestra con carga viral 1200 pg/mL y diluciones seriadas hasta 10^7 . Calle 1: marcador de peso molecular; calle 2, muestra sin diluir; calle 3, dilución 10^2 ; calle 4, dil 10^3 ; calle 5, dil 10^4 ; calle 6, dil 10^2 en la segunda amplificación con cebadores POL1 y SS; calle 7, dil 10^3 en la segunda amplificación. En la figura 7B se encuentran las bandas correspondientes a la segunda amplificación: calle 1, marcador de Pm; calle 2, dil 10^4 ; calle 3, dil 10^5 ; calle 4, 10^6 y calle 5, dil 10^7 .

2.2 COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS DE LIPA Y SECUENCIACIÓN.

Se analizaron 30 muestras de suero correspondientes a 27 pacientes a tratamiento con lamivudina. De estos, 19 habían recibido tratamiento durante un periodo superior a los seis meses y 6 pacientes habían estado a tratamiento durante un periodo inferior en el momento del análisis. No hay datos sobre la duración del tratamiento en dos de los pacientes.

Empleando los cebadores SQ1 y SS obtenemos amplificado en todos los rangos de carga viral que presentaron estos pacientes.

Entre los pacientes que han estado sometidos a tratamiento más de seis meses presentan Ag-HBe positivo 11 de ellos. La distribución de genotipos es la siguiente: 4/11 son genotipo D; 5/11 son genotipo A; 2/11 son genotipo F. El resto son anti-HBe positivos siendo 7/8 genotipo D y 1/8 genotipo F.

Entre los pacientes que han estado sometidos a tratamiento menos de seis meses presentan Ag-HBe positivo 4/6 siendo 3 de ellos genotipo D y uno genotipo A. Entre los que presentan anti-Ag-HBe positivos se observa 1/6 genotipo A y 1/6 genotipo D.

2.2.1 RESULTADOS OBTENIDOS EMPLEANDO EL SISTEMA LiPA

Emplendo el sistema LiPA, se detecta en 13 pacientes virus con mutaciones responsables, en mayor o menor medida, de la resistencia a lamivudina. En los otros seis pacientes habían recibido lamivudina durante un periodo inferior a los seis meses en el momento del estudio, no se detectó virus mutante. La distribución de genotipos que presentaron mutaciones se representa en la tabla 15.

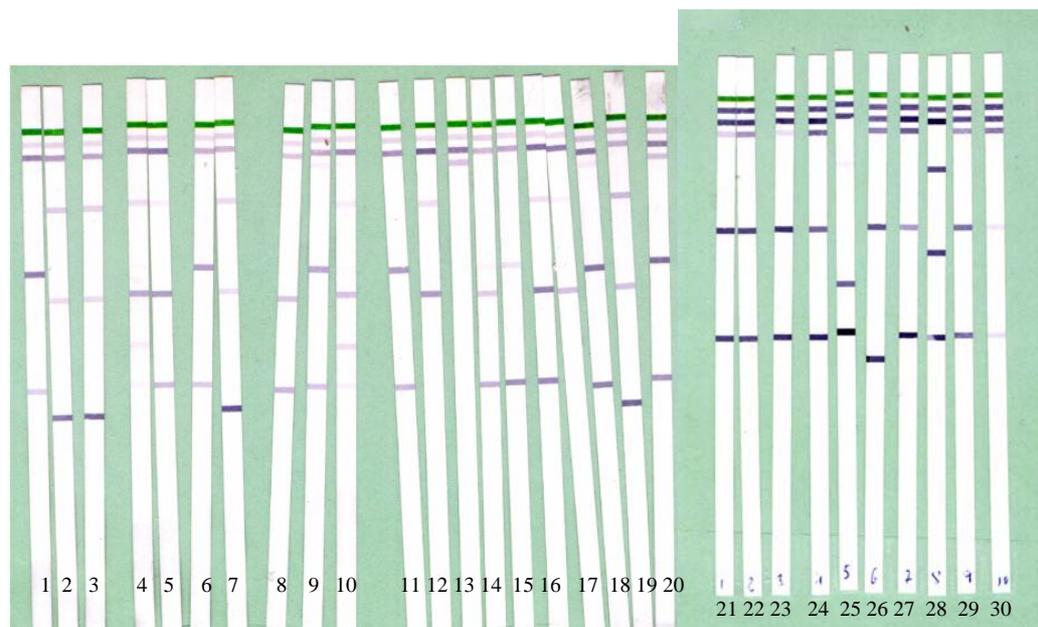


Figura 8. Tiras del LiPA con sus correspondientes bandas en donde se ha producido hibridación con las sondas.

		Genotipo A	Genotipo D	Genotipo F
Mutantes(n=13)	Tipo I, n=8	5	1	2
	Tipo II, n=2		2	
	Mezcla		3	
Salvajes (n=6)			6	

Tabla 15. Mutaciones encontradas en cada genotipo mediante análisis con sondas (LiPA).

- Mutación grupo I (L528M/M552V): 5/8 son de genotipo A; 1/8 genotipo D y 2/8 genotipo F. El genotipo D que presenta la mutación tipo I es un patrón D1 y presenta coinfección con VHC.
- Mutación grupo II (M552I): 2/2 aislados presentan genotipo D.
- Mezcla de salvaje y mutación grupo I y II: 2/3 son de genotipo D y 1/3 son de genotipo F.

Mediante LiPA no se detectan bandas en la posición correspondiente al codón 528 en uno de los aislados (muestra número 13).

2.2.2 RESULTADOS OBTENIDOS POR SECUENCIACIÓN

El análisis de la secuencia de los pacientes sometidos a tratamiento con lamivudina refleja la aparición de resistencia al tratamiento en 12 casos.

Se estudia parte del dominio B y C del gen de la polimerasa viral, detectando cambios en las posiciones 521, 528, 552 y 555 (Figuras 8 y 9).

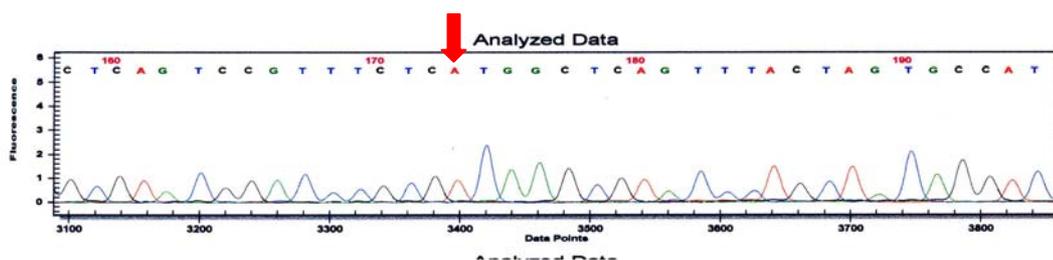


Figura 8. Resultado del análisis de la secuencia de un mutante en la posición 528. Dominio B del gen de la polimerasa. Se observa la sustitución de Timina por Adenina generando un cambio de aminoácido: L528→M528.

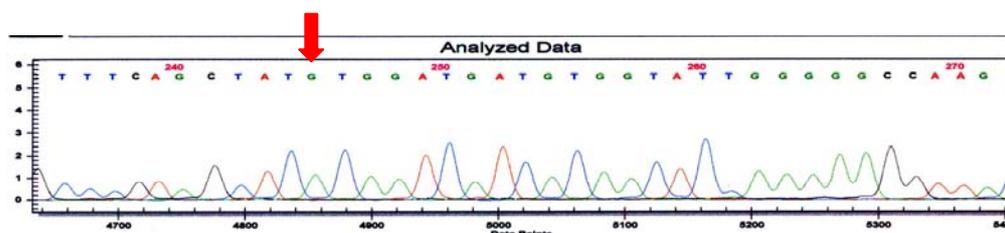


Figura 9. Resultado del análisis de la secuencia de un mutante en el motivo YMDD. Dominio C del gen de la polimerasa viral. Se observa una sustitución del nucleótido Adenina por una Guanina que genera un cambio de aminoácido: Metionina→Valina.

		Genotipo A	Genotipo D	Genotipo F
Mutantes(n=12)	Tipo I, n=9	5	2	2
	Tipo II, n=3		2	1
	Mezcla			
Salvajes (n=7)			7	

Tabla 16. Mutaciones encontradas en cada genotipo mediante secuenciación.

- Mutación grupo I (L528M/M552V): 5/9 son de genotipo A; 2/9 genotipo D y 2/9 genotipo F. Los genotipos D presentan el patrón D1 mediante RFLP.
- Mutación grupo II (M552I): 2/3 son genotipos D y 1/3 es genotipo F.

2.2.3 COMPARACIÓN DE LOS SISTEMAS DE DETECCIÓN DE RESISTENCIAS LiPA Y SECUENCIACIÓN.

En cuanto a las mutaciones principales existe concordancia entre la secuenciación y el LiPA en todos los casos excepto en uno. En el aislado 5, analizando su secuencia no se detectó un genotipo mutante que sí fue detectado por LiPA como una mezcla de genotipo salvaje (bandas más intensas) y de genotipo mutante (bandas débiles) de grupo II, es decir M552I.

No hemos observado la presencia aislada de la mutación M552V en el análisis por ambos métodos, sino siempre en asociación con la mutación L528M.

No se detecta mezcla de genotipos mutantes y salvajes empleando secuenciación a diferencia de lo encontrado con el sistema de hibridación con sondas (Tablas 17 y 18).

DETECCIÓN DE RESISTENCIAS									
Muestra	LIPA								
Meses a tratamiento	Bandas LIPA	Codón 528	Codón 552	Codón 555		Genotipo viral	Ag-HBe/anti-HBe	Carga viral(pg/mL)	
1	12	9,16,3	L528	M552	V555	SALVAJE	D	+/-	110
2	21	5,10,16	M528	V552	V555	MUTANTE	A	+/-	16000
3	12	3	L528	I552	V555	INTERMEDIA	D	-/+	6100
4	15	9,10,16,3,5	M528 L528	M552 V552	V555	MEZCLA	D	+/-	1800
5	13	9, 16,13		M552 I552	V555	MEZCLA	D	+/-	5000
6	16	5,10,16	M528	V552	V555	MUTANTE	A	+/-	2200
7	23	5,10,16	M528	V552	V555	MUTANTE	A	+/-	13000
8	12	9,16,3	L528	M552	V555	SALVAJE	D	-/+	
9	13	5,10,18	M528	V552	L555	MUTANTE	F	+/-	850
10	14	5,10,18	M528	V552	L555	MUTANTE	F	+/-	1500
11	18	5,10,16,9,14	M528	V552 I552 M552	V555	MEZCLA	F	-/+	310
12	12	10,16,5	M528	V552	V555	MUTANTE	A	+/-	
13	11	9,16		M552	V555	SALVAJE	D	-/+	LR
14	21	5,10,18	M528	V552	L555	MUTANTE	F	+/-	1300
15	20	10,16,5	M528	V552	V555	MUTANTE	D	+/-	2600
16	6	9,16,3	L528	M552	V555	SALVAJE	D	+/-	180
17	27	5,10,14,16,3,9	M528 L528	V552 I552 M552	V555	MEZCLA	F	-/+	
18	3	3,9,16	L528	M552	V555	SALVAJE	D	+/-	25
19	12	5,10,18	M528	V552	L555	MUTANTE	F	+/-	1100
20	4	3,9,16	L528	M552	V555	SALVAJE	D	-/+	LR
21	1	3,9,16	L528	M552	V555	SALVAJE	A	-/+	30
22	12	3 débil 5,13,16	M528 L528	I552	V555	INTERMEDIA	D	-/+	340
23	12	5,10,16	M528	V552	V555	MUTANTE	A	+/-	2200
24	24	3,9,16	L528	M552	V555	SALVAJE	D	-/+	
25	1	3,9,16 un poco 20	L528	M552	V555 I555	SALVAJE. Débil en 555	A	+/-	690
26	.2	3,9,16	L528	M552	V555	SALVAJE	D	+/-	LR
27	?	3,9,18	L528	M552	L555	SALVAJE	D	+/-	2700
28	9	3,9,16	L528	M552	V555	SALVAJE	D	-/+	LR
29	?	3,9,16	L528	M552	V555	SALVAJE	D	-/+	
30	4	3,9,16	L528	M552	V555	SALVAJE	D	-/+	LR

Tabla 17. Resultados obtenidos del análisis de las muestras mediante hibridación con sondas de ácidos nucleicos. Los resultados en gris corresponden a muestras empleadas como controles internos, las muestras número 9,14 y 19 pertenecen al mismo paciente; las muestras 11 y 17 pertenecen al mismo paciente.

DETECCIÓN DE RESISTENCIAS									
Muestra		SECUENCIACIÓN							
	Meses a tratamiento	Codón 521	Codón 528	Codón 552	Codón 555		Genotipo Viral	Ag-HBe/anti-HBe	Carga viral(pg/mL)
1	12		L528	M552	V555	SALVAJE	D	+/-	110
2	21	V521	M528	V552	V555	MUTANTE	A	+/-	16000
3	12	V521	L528	I552	V555	INTERMEDIA	D	-/+	6100
4	15	L521	M528	V552	V555	MUTANTE. No se percibe mezcla	D	+/-	1800
5	13	V521	L528	M552	V555	SALVAJE. No se aprecia mezcla	D	+/-	5000
6	16	V521	M528	V552	V555	MUTANTE	A	+/-	2200
7	23	V521	M528	V552	V555	MUTANTE	A	+/-	13000
8	12	V521	L528	M552	V555	SALVAJE	D	-/+	
9	13	L521	M528	V552	L555	MUTANTE	F	+/-	850
10	14	L521	M528	V552	L555	MUTANTE	F	+/-	1500
11	18	L521	M528	I552	L555	INTERMEDIA	F	-/+	310
12	12	V521	M528	V552	V555	MUTANTE	A	+/-	
13	11	V521	L528	M552	V555	SALVAJE	D	-/+	LR
14	21	L521	M528	V552	L555	MUTANTE	F	+/-	1300
15	20	L521	M528	V552	V555	MUTANTE	D	+/-	2600
16	6	V521	L528	M552	V555	SALVAJE	D	+/-	180
17	27	L521	L528	I552	L555	INTERMEDIO. No se aprecia mezcla.	F	-/+	
18	3	V521	L528	M552	V555	SALVAJE	D	+/-	25
19	12	L521	M528	V552	L555	MUTANTE	F	+/-	1100
20	4	V521	L528	M552	V555	SALVAJE	D	-/+	LR
21	1	V521	L528	M552	V555	SALVAJE	A	-/+	30
22	12	V521	L528	I552	V555	INTERMEDIA	D	-/+	340
23	12	L521	M528	V552	V555	MUTANTE	A	+/-	2200
24	24	V521	L528	M552	V555	SALVAJE	D	-/+	
25	1	V521	L528	M552	V555	SALVAJE	A	+/-	690
26	.2	V521	L528	M552	V555	SALVAJE	D	+/-	LR
27	?	V521	L528	M552	L555	SALVAJE	D	+/-	2700
28	9	V521	L528	M552	V555	SALVAJE	D	-/+	LR
29	?	V521	L528	M552	V555	SALVAJE	D	-/+	
30	4	V521	L528	M552	V555	SALVAJE	D	-/+	LR

Tabla 18. Resultados obtenidos del análisis de las muestras mediante secuenciación de la región que incluye el motivo YMDD.

Al final del periodo de estudio (entre seis y catorce meses más tarde del análisis de resistencias), negativizaron el ADN-VHB 13 pacientes, de los que 11 estaban infectados con VHB de genotipo D (D2) y 2 con el genotipo A.

No negativizaron el ADN-VHB 12 pacientes, siendo 8 de ellos genotipos "No D" y los otros 4 genotipo D. De estos últimos dos aislados presentaban el patrón D1. No hay datos de análisis posteriores en los otros dos casos.

2.3 DIVERGENCIAS NUCLEOTÍDICAS Y AMINOACÍDICAS EN LA REGIÓN DE LA POLIMERASA IMPLICADA EN LA RESISTENCIA AL TRATAMIENTO CON LAMIVUDINA.

Se realiza la comparación de la secuencia de los genotipos del VHB de los pacientes sometidos a tratamiento y los mismos genotipos del VHB de pacientes no sometidos a tratamiento con la secuencia consenso para cada grupo (Figuras 11 y 12).

Entre los genotipos A las divergencias respecto a la secuencia consenso son mayores en el grupo a tratamiento respecto al que no lo está. En el análisis de las secuencias de genotipo D se observan diferencias mayores respecto a la secuencia consenso pero que son prácticamente iguales entre los pacientes a tratamiento y los que no lo están.

	Genotipo A		Genotipo D	
	% de nucleótidos divergentes respecto al consenso	% de aminoácidos divergentes respecto al consenso	% de nucleótidos divergentes respecto al consenso	% de aminoácidos divergentes respecto al consenso
Tratamiento	4,4±2,5	3,2	3,3±1,58	2,4
No tratamiento	1,5±1	0,25	3,5±1,76	1,66

Tabla 13. Divergencias nucleotídicas y aminoacídicas entre los genotipos A, D con y sin tratamiento respecto a sus secuencias consenso.

D J02203	<u>ttgtgtatcaaaaccttcggaaggaaaatgcacctgtattcccatcccatcatcctgggctttcggaaaaattcctatgggagtgggcctc</u>	90
136 D tto	LeuLeuTyrGlnThrPheGlyArgLysLeuHisLeuTyrSerHisProIleIleLeuGlyPheArgLysIleProMetGlyValGlyLeu	90
90 D tto	LeuLeuTyrLysThrPheGlyTrpLysLeuHisLeuTyrSerHisProIleIleLeuGlyPheArgLysIleProMetGlyValGlyLeu	90
103 D tto	LeuLeuTyrLysThrPheGlyTrpLysLeuHisLeuTyrSerHisProIleIleLeuGlyPheArgLysIleProMetGlyValGlyLeu	90
153 D tto	LeuLeuTyrGlnThrPheGlyArgLysLeuHisLeuTyrSerHisProIleIleLeuGlyPheArgLysIleProMetGlyValGlyLeu	90
159 D tto	LeuLeuTyrLysThrPheGlyTrpLysLeuHisLeuTyrSerHisProIleIleLeuGlyPheArgLysIleProMetGlyValGlyLeu	90
30 D	LeuLeuTyrLysThrPheGlyTrpLysLeuHisLeuTyrSerHisProIleIleLeuGlyPheArgLysIleProMetGlyValGlyLeu	90
160 D	LeuLeuTyrLysThrPheGlyTrpLysLeuHisLeuTyrSerHisProIleIleLeuGlyPheArgLysIleProMetGlyValGlyLeu	90
161 D	LeuLeuTyrLysThrPheGlyTrpLysLeuHisLeuTyrSerHisProIleIleLeuGlyPheArgLysIleProMetGlyValGlyLeu	90
107 D	LeuLeuTyrLysThrPheGlyTrpLysLeuHisLeuTyrSerHisProIleIleLeuGlyPheArgLysIleProMetGlyValGlyLeu	90
20 D	LeuLeuTyrLysThrPheGlyTrpLysLeuHisLeuTyrSerHisProIleIleLeuGlyPheArgLysIleProMetGlyValGlyLeu	90
82 D	LeuLeuTyrLysThrPheGlyGlnLysLeuHisLeuTyrSerHisProIleIleLeuGlyPheArgLysIleProMetGlyValGlyLeu	90
D J02203	<u>agcccgttctctcggctcagtttactagtgccatttggtcagtggttcgtagggctttccccactgtttggcttcagttatatggat</u>	180
136 D tto	SerProPheLeuLeuAlaGlnPheThrSerAlaIleCysSerValValArgArgAlaPheProHisCysLeuAlaPheSerTyrMetAsp	180
90 D tto	SerProPheLeuLeuAlaGlnPheThrSerAlaIleCysSerValValArgArgAlaPheProHisCysLeuAlaPheSerTyrMetAsp	180
103 D tto	SerProPheLeuLeuAlaGlnPheThrSerAlaIleCysSerValValArgArgAlaPheProHisCysLeuAlaPheSerTyrMetAsp	180
153 D tto	SerProPheLeuMetAlaGlnPheThrSerAlaIleCysSerValValArgArgAlaPheProHisCysLeuAlaPheSerTyrValAsp	180
159 D tto	SerProPheLeuLeuAlaGlnPheThrSerAlaIleCysSerValValArgArgAlaPheProHisCysLeuAlaPheSerTyrMetAsp	180
30 D	SerProPheLeuLeuAlaGlnPheThrSerAlaIleCysSerValValArgArgAlaPheProHisCysLeuAlaPheSerTyrMetAsp	180
160 D	SerProPheLeuLeuAlaGlnPheThrSerAlaIleCysSerValValArgArgAlaPheProHisCysLeuAlaPheSerTyrMetAsp	180
161 D	SerProPheLeuLeuAlaGlnPheThrSerAlaIleCysSerValValArgArgAlaPheProHisCysLeuAlaPheSerTyrMetAsp	180
107 D	SerProPheLeuLeuAlaGlnPheThrSerAlaIleCysSerValValArgArgAlaPheProHisCysLeuAlaPheSerTyrMetAsp	180
20 D	SerProPheLeuLeuAlaGlnPheThrSerAlaIleCysSerValValArgArgAlaPheProHisCysLeuAlaPheSerTyrMetAsp	180
82 D	SerProPheLeuLeuAlaGlnPheThrSerAlaIleCysSerValValArgArgAlaPheProHisCysLeuAlaPheSerTyrMetAsp	180
D J02203	<u>gatgtggtattggggccaagtctgtacagcatcttgagtcctcttttaccgctgttaccaaatcttctt</u>	249
136 D tto	AspValValLeuGlyAlaLysSerValGlnHisLeuGluSerLeuPheThrAlaValThrAsnPheLeu	249
90 D tto	AspValValLeuGlyAlaLysSerValGlnHisLeuGluSerLeuPheThrAlaValThrAsnPheLeu	249
103 D tto	AspValValLeuGlyAlaLysSerValHisHisLeuGluSerLeuTyrThrAlaValThrAsnPheLeu	249
153 D tto	AspValValLeuGlyAlaLysSerValGlnHisLeuGluSerLeuPheThrAlaValThrAsnPheLeu	249
159 D tto	AspValValLeuGlyAlaLysSerValGlnHisLeuGluSerLeuPheThrAlaValThrAsnPheLeu	249
30 D	AspValValLeuGlyAlaLysSerValGlnHisLeuGluSerLeuPheThrAlaValThrAsnPheLeu	249
160 D	AspValValLeuGlyAlaLysSerValGlnHisLeuGluSerLeuPheThrAlaValThrAsnPheLeu	249
161 D	AspValValLeuGlyAlaLysSerValGlnHisLeuGluSerLeuPheThrAlaValThrAsnPheLeu	249
107 D	AspValValLeuGlyAlaLysSerValGlnHisLeuGluSerLeuPheThrAlaValThrAsnPheLeu	249
20 D	AspValValLeuGlyAlaLysSerValGlnHisLeuGluSerLeuPheThrAlaValThrAsnPheLeu	249
82 D	AspValValLeuGlyAlaLysSerValGlnHisLeuGluSerLeuPheThrAlaValThrAsnPheLeu	249

Figura 11. Alineamiento de las secuencias del VHB de genotipo D de pacientes sometidos a tratamiento y no sometidos a tratamiento, respecto a la secuencia consenso establecida para el genotipo D. La primera secuencia corresponde a la secuencia consenso para el genotipo D.

DISCUSIÓN

V. DISCUSION

1. MÉTODOS DE GENOTIPADO DEL VHB.

El estudio del genotipo del virus de la hepatitis B se está haciendo muy popular entre los investigadores, sobre todo en la última década. Este creciente interés se debe, fundamentalmente, a las posibles implicaciones de la variabilidad genética del virus en el curso de la infección, así como en otros aspectos relacionados con la patogénesis viral, lo que hace que el genotipo sea un dato de gran interés epidemiológico. Por otro lado, el avance en el manejo de la infección por el VHB se debe a la mejora de la tecnología de análisis molecular que facilita el diseño de diversos métodos de genotipado para su aplicación en el laboratorio clínico. Con ello, se promueve el estudio del virus en este aspecto todavía poco conocido.

1.1 MÉTODO BASADO EN PCR-RFLP.

Entre los métodos de genotipado empleados con más frecuencia destacan aquellos basados en amplificación y posterior análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP) (Lindh et al., 1997; Lindh et al. 1998; Mizokami et al., 1999; Shih et al., 1991). Además, los resultados se obtienen en poco tiempo y se analizan con facilidad. En general, parecen bastante fiables, pero deben evaluarse en cada laboratorio, ya que pequeñas variaciones del genoma del VHB podrían afectar los resultados obtenidos, tal y como hemos observado en nuestro estudio. En el análisis de genotipado realizado por nosotros, en el que hemos empleado un método basado en polimorfismos de fragmentos de longitud, se encuentran resultados no concordantes con otros métodos. Los sistemas basados en RFLP se diseñan en base a secuencias ya descritas y publicadas en la base de datos del NCBI y se verifican con muestras de pacientes del área en donde se realiza el estudio. Por ello estos análisis de RFLP están limitados a ciertas variaciones o polimorfismos que se encuentran en esas poblaciones concretas, no teniendo en cuenta otras regiones geográficas con mayor o menor variación que pueden hacer variar los resultados. En nuestro estudio se observaron casos en los que un cambio de nucleótido en una posición concreta hizo variar el patrón

de restricción del análisis, con lo que se produjo un resultado erróneo en el análisis del genotipo de tres de los aislados estudiados. Este cambio no implicó una variación de aminoácido en la proteína codificada pero sí que alteró la secuencia de nucleótidos y por lo tanto las dianas de restricción. En el virus de la hepatitis B se da una tasa de sustituciones silentes de 5×10^{-5} por sitio y año (Orito et al., 1989). Por lo tanto, estas variaciones que no producen variabilidad en la proteína codificada se pueden ir seleccionando dando lugar a patrones de restricción que nos pueden conducir a un resultado erróneo.

Un 3% de los aislados de nuestro estudio no ha podido ser genotipado mediante este sistema y en otro 3% hemos obtenido resultados erróneos. Por este motivo se debería poseer un método de genotipado alternativo para solucionar estas situaciones. A pesar de los inconvenientes de este sistema basado en RFLP posee otras ventajas como es la información adicional que aporta sobre la variabilidad genética del virus. Este sistema define patrones diferentes dentro de cada genotipo, lo que resulta de gran interés epidemiológico. No están descritas diferencias en cuanto a patrones obtenidos pero en nuestro estudio hemos observado un mayor porcentaje de genotipos D con el patrón D1 entre pacientes coinfectados con el virus de la hepatitis C que en el resto de pacientes sin coinfección.

En cuanto al recientemente descubierto genotipo G, no se ha podido caracterizar mediante el análisis de RFLP que hemos empleado. Los patrones que se obtienen al realizar los hipotéticos cortes con los enzimas de restricción de diferentes aislados obtenidos de la base de datos del NCBI no corresponden con el patrón de corte producido en el análisis de nuestro aislado clínico. Esto nos hace recapacitar sobre el continuo cambio y modificaciones que deben experimentar los métodos de RFLP para ir englobando los genotipos que se van describiendo. Muy recientemente, se ha descrito en amerindios un octavo genotipo, el genotipo H (Arauz-Ruiz et al., 2002), con lo que se describirán nuevos sistemas de genotipado que engloben todos los genotipos. Este es uno de los inconvenientes de los sistemas basados en RFLP, su continuo cambio y descripción de patrones.

El genotipo G ha sido encontrado en Francia y en Estados Unidos (Stuyver et al., 2000). Entre los aislados estudiados por nosotros, hemos encontrado un patrón de RFLP que no se corresponde con ninguno de los descritos con anterioridad. Análisis

posteriores basados en la amplificación de un segmento característico dentro de la región del core (Kato H, et al., 2001), secuenciación del gen de superficie y comprobación mediante una técnica comercial (LIPA), nos confirman que se trata de este nuevo genotipo, el genotipo G. En España es el primer aislado que se obtiene perteneciente a este grupo (número de acceso al GenBank: AY168428).

1.2 MÉTODO BASADO EN PCR ESPECÍFICA

Existen otros métodos de análisis de genotipos del VHB que se basan en la realización de una amplificación que emplea cebadores específicos para cada genotipo (Repp et al., 1993; Hideo Naito et al., 2001). A priori este sistema es rápido y sencillo, pero, en nuestra experiencia con el método de PCR específica de Hideo Naito et al., 2001, basado en el análisis de la región pre-S1, la especificidad es bastante pobre. Mediante este tipo de análisis se obtiene mayor porcentaje de resultados indeterminados que con el método que hemos empleado basado en RFLP (35% frente a un 3% de muestras no tipables por RFLP), por ello, este sistema aporta poca información sobre la variabilidad genética del virus.

Por lo tanto, estos sistemas basados en reacciones de amplificación específicas de genotipo no son recomendables ya que requieren de la realización en cada laboratorio de modificaciones y mejoras del método para poder obtener unos resultados definitivos. Una modificación realizada por nosotros consistió en el empleo de “touchdown-PCR” que consiste en la bajada gradual de la temperatura de hibridación en ciclos consecutivos para aumentar la especificidad de los cebadores. A pesar de ello no mejoró de forma significativa el resultado. Por este motivo no suponen un ahorro de tiempo en el análisis del laboratorio con lo que no hemos encontrado ninguna ventaja con respecto a otros métodos.

1.3 MÉTODO BASADO EN SECUENCIACIÓN

El uso del análisis de los genotipos por secuenciación ha quedado restringido a la comprobación de patrones anormales producidos por otros sistemas de genotipado. A pesar de ser un virus con material genético de ADN, no debemos perder de vista que el virus de la hepatitis B está sujeto a variación, y que posee una tasa de sustituciones del

mismo orden que la tasa de sustitución que se ha observado en algunos virus ARN para los cuales el valor es del orden de 10^{-5} (Holland et al., 1982; Okamoto et al., 1987). La tasa de sustituciones es de 100 veces menor que en el gen de la envuelta del virus de la inmunodeficiencia humana y 10000 veces mayor que la mayoría de los virus con genoma de ADN. Estas sustituciones inherentes a la biología viral pueden verse reflejadas en la utilización de métodos sensibles a mutaciones o variaciones puntuales como son los sistemas basados en los análisis de polimorfismos de fragmentos de longitud.

Nosotros diseñamos un sistema de genotipado basado en la secuenciación directa de un pequeño fragmento del gen de la polimerasa viral. Este fragmento posee secuencias altamente conservadas pero que resultó ser un útil discriminador entre genotipos. La validez de esta forma de clasificar el virus se verificó con una selección de 50 secuencias escogidas totalmente al azar de la base de datos del NCBI, dando como resultado un 90% de secuencias genotipadas correctamente al comparar este sistema con el análisis del genoma completo.

Cuando comparamos los resultados del análisis realizado mediante RFLP con el análisis de la secuencia de la región YMDD encontramos un 7,7% de divergencias entre los dos métodos. Al analizar con detalle estas muestras el genotipo que finalmente se confirmó fue el obtenido por análisis de la región YMDD, con lo que resultó ser un sistema de genotipado más fiable que el basado en RFLP.

El método descrito por nosotros se basa en la secuenciación directa de una importante región de la polimerasa viral, con lo que cualquier cambio producido en la secuencia de nucleótidos no pasa desapercibido y contribuye, por lo tanto, a la descripción de la variabilidad genética del virus. Otra ventaja de este sistema es que la región de estudio, que es la región que incluye el motivo YMDD, es válida independientemente del desarrollo de resistencia al tratamiento con lamivudina y permite la detección de las mismas. Los tres casos de genotipado erróneo obtenido mediante RFLP sucedieron en pacientes sometidos a tratamiento con lamivudina. Esto hecho nos hace pensar en la posibilidad de que el cambio del patrón de restricción pudiera deberse a la selección de alguna cuasiespecie bajo la presión selectiva del antiviral.

1.4 MÉTODO BASADO EN LiPA

Este sistema de genotipado, se basa en la hibridación con sondas específicas de ácidos nucleicos. La región de análisis es la parte del gen de superficie que solapa con el gen de la polimerasa. En esta zona se localizan las mutaciones que confieren resistencia del VHB al tratamiento con lamivudina. Este método emplea sondas de ácidos nucleicos específicas para cada genotipo. Es de fácil manejo e interpretación de resultados. Al compararlo con el método basado en secuenciación se obtiene un 96% de concordancias.

Este sistema presenta una ventaja importante y es que permite detectar coinfecciones con distintos genotipos presentes en el paciente. Con el resto de los sistemas de genotipado no se pueden observar ya que sólo se detecta la población predominante. Esto supone una ventaja a tener en cuenta ya que se ha observado un cambio de genotipo en algunos pacientes que puede ser motivado por la selección de un genotipo u otro al someterse a tratamiento. En uno de estos casos se ha producido un cambio del genotipo G a genotipo A. La coinfección con ambos genotipos fue detectada mediante LiPA en la primera muestra recibida del paciente. Por secuenciación de esta muestra sólo observamos el genotipo G que muestra una concordancia del 100% con la secuencia consenso y no se detectó coinfección. La segunda muestra de este paciente, recibida doce meses más tarde, nos informó de un genotipo A por secuenciación, por lo tanto asumimos que, actualmente, es el genotipo mayoritario en el paciente. Este paciente está coinfectado con VIH y recibía tratamiento con lamivudina para esta infección con lo que es posible que esta sea la causa de este viraje en el genotipo mayoritariamente detectado.

El genotipo G del VHB posee dos codones de parada en la región precore que impide la expresión del Ag-HBe (Carman et al., 1989; Okamoto et al., 1990), sin embargo, el paciente presenta Ag-HBe positivo. Este fenómeno ha sido descrito por otros autores, los cuales encuentran coinfección del VHB de genotipo G con el VHB de genotipo A en elevada proporción en pacientes Ag-HBe positivos (Kato et al., 2002). En este paciente hemos detectado una coinfección con el genotipo A gracias al empleo del sistema LiPA. Esta población de VHB de genotipo A es probablemente la responsable de la presencia del Ag-HBe en el suero del paciente.

Hasta el momento, existen pocos estudios en los que se describen coinfecciones, posiblemente porque los sistemas empleados con más frecuencia no las detectan. Este aspecto es de gran interés, ya que un paciente con una coinfección podría cambiar de un genotipo predominante a otro genotipo más virulento al someterse a ciertas condiciones como alteraciones del sistema inmune o algún tratamiento. En este aspecto, el sistema LiPA proporciona una gran ventaja sobre otros sistemas, que por lo general son menos sensibles.

Estos hallazgos nos dan una idea de la variabilidad de la infección por el VHB y nos indica que a lo largo del seguimiento de los pacientes se producen modificaciones genéticas posiblemente debidas a la presión que se está ejerciendo sobre el virus (antivirales como es el caso de este paciente) que conduciría a una situación de continua selección de mutaciones, de cuasiespecies o incluso de genotipos en caso de existencia de coinfección.

Por otra parte, debemos considerar que el análisis de distintas regiones del genoma del VHB ha mostrado incongruencias entre los árboles filogenéticos construidos, observando homologías en determinadas regiones entre grupos genómicos diferentes. Algunos autores explican que este fenómeno podría deberse a la recombinación (Bowyer et al., 2000). Está descrita la recombinación del genotipo B con el genotipo C en Asia. Esta recombinación afecta solamente a la región pre-C del genoma viral (Sugauchi F et al, 2002). De momento no se ha descrito recombinación entre genotipo D y genotipo A que son los prevalentes en nuestro medio, posiblemente porque todavía existen pocos estudios sobre el genotipado del VHB en nuestra región. Por este motivo, son necesarios estudios que clarifiquen este aspecto ya que la elección de una región u otra para el análisis del genotipo del virus puede hacer variar el resultado en mayor o menor medida.

Para el estudio del genotipo del VHB se han seleccionado diversas regiones del genoma que resultan válidas al respecto. Además, es posible que las distintas regiones posean una fiabilidad determinada siendo unas más apropiadas que otras. Por ello hay que seguir investigando el fenómeno de la recombinación del VHB ya que puede hacer variar los resultados del genotipado, aunque hasta el momento solamente se ha observado en la región del core, y esta región no se suele emplear para dicho fin.

En cuanto a la comparación de los distintos métodos de genotipado que hemos empleado en este estudio, se observa una concordancia excelente entre la secuenciación de la región que incluye el motivo YMDD y el LiPA. Respecto a un genotipo consenso establecido por nosotros obtenemos un 97,5% de concordancia al emplear secuenciación ($k=0,850$) y un 100% de concordancia al emplear el sistema de LiPA ($k=1$). No sucede lo mismo con el método basado en PCR específica de genotipo en donde la concordancia es muy baja ($k=-0,0367$). En el método basado en RFLP se obtiene una concordancia del 90% ($k=0,688$). En el porcentaje de los distintos genotipos del virus se infravalora el porcentaje de genotipos D y del A por el sistema de PCR múltiple respecto a los resultados obtenidos por RFLP. El genotipo F es detectado por ambos sistemas en la misma proporción y obtenemos una gran parte de resultados no concluyentes por el sistema de PCR múltiple. El RFLP en relación al YMDD minusvalora el genotipo A, no influye en el F y da falsos C.

Es más, incluso algunos autores en su búsqueda de un nuevo método de genotipado (Kobayashi et al., 2002 Agosto, *J Med Virol*), basado en este caso en una PCR específica de genotipo, hacen referencia, en la comparación de su nuevo método, al descrito por Lindh basado en RFLP. Estos autores obtienen una buena concordancia entre los dos métodos, pero no se menciona la fiabilidad del método de RFLP empleado como referencia en el estudio. Por ello, los métodos basados en RFLP no deben emplearse como referencia en la evaluación de métodos nuevos ya que puede llevar a una acumulación de errores en un intento de equiparar los resultados.

En el único caso de discordancia entre la secuenciación y análisis mediante LiPA decidimos emplear como referencia aquel resultado que coincidió con el LiPA porque también se había clasificado igual con el sistema de RFLP. No se hicieron comprobaciones posteriores para verificar el genotipo de este aislado. Por lo tanto, la referencia tomada para la clasificación de este aislado posee menos peso que en el resto de los casos.

Por consiguiente, el uso a gran escala de estos sistemas basados en RFLP tiene utilidad para estudios epidemiológicos ya que los posibles errores cometidos en el genotipado del virus quedan minimizados en una muestra poblacional grande. Otro

aspecto diferente es el uso de esta información para predecir una respuesta al tratamiento. En estos casos, debido a la aparición de resistencias a antivirales y a su posible relación con el genotipo, debe elegirse con cuidado el método empleado para genotipar el virus o al menos constatarlo con otro alternativo.

Otro factor importante a tener en cuenta a la hora de seleccionar un sistema de genotipado del VHB, además de la fiabilidad del método, es evaluar en la población el sistema que vamos a emplear y descartar aquellos métodos que no discriminen bien entre los genotipos predominantes. Mediante este método de RFLP podemos clasificar los aislados en genotipos D y genotipos no D; esta clasificación es de utilidad en nuestro caso debido a la elevada prevalencia de genotipos D. Y además, resulta bastante fiable ya que los casos de discordancias resultaron ser genotipos “no D”, y, en la clasificación basada en este criterio no tendrían efecto las discordancias observadas.

2. PREVALENCIA DE GENOTIPOS DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B

Diversos estudios han señalado diferencias en cuanto a la respuesta al tratamiento y el grado de lesión hepática producida según el genotipo del virus que infecta al paciente, de ahí la gran importancia que tiene la caracterización genética del virus en nuestra población. Se ha descrito que el genotipo C, en comparación con el genotipo B, se asocia con una tasa más baja de respuesta al tratamiento con interferón (Kao JH., et al., 2000). También se ha relacionado el genotipo C con mayor daño hepático respecto al genotipo B (Linh et al., 1999; Kao et al., 2000). La mayoría de las comparaciones que se realizan hacen referencia a los genotipos B y C o bien a los genotipos A y D. Se realiza este tipo de estudios debido a la distribución geográfica de los distintos genotipos que no permite hacer una comparación más amplia que abarque mayor variabilidad genética.

De los siete genotipos descritos (muy recientemente se ha descrito un octavo genotipo, el genotipo H), solamente los genotipos D y A están representados

significativamente en nuestra región suponiendo un 83% y un 13% respectivamente. También se ha encontrado un 3% de genotipos F y un único caso de genotipo G.

En el estudio realizado en España por Sánchez-Tapias et al., encontraron la siguiente distribución de genotipos: 52% genotipo A, 35% genotipo D, 7% genotipo F (Sánchez-Tapias et al., 2002). Por el contrario, nosotros encontramos una mayor prevalencia del genotipo D que del genotipo A. En nuestro estudio, la prevalencia del genotipo A encontrado entre pacientes Ag-HBe positivos es mayor que entre los pacientes anti-Ag-HBe positivos como también ha descrito Sánchez-Tapias et al.

Hemos observado una mayor variabilidad de genotipos del VHB en pacientes Ag-HBe positivos que en los pacientes anti-HBe positivos. La situación del paciente con anti-HBe positivo y ADN-VHB positivo se debe a la variante del virus denominada “e menos”. El 54% de los pacientes que hemos estudiado se encuentra en esta situación. Está descrito que la emergencia de este mutante es poco frecuente en algunos genotipos como el genotipo A, que posee una citosina en la posición 1858. Este nucleótido en la posición 1858 genera una incapacidad en la formación del bucle necesario para la replicación viral por lo que es poco frecuente encontrar genotipos A con la mutación precore (Li et al., 1993; Rodríguez-Frias et al., 1995). Los resultados obtenidos por nosotros están en concordancia con los obtenidos por estos autores, encontrando entre los pacientes Ag-HBe positivos un 19% de genotipos A frente a un 8% en los anti-HBe positivos. Por el contrario, en un estudio reciente de López et al., 2002, describen una mayor proporción de genotipos A entre los pacientes anti-HBe positivos que entre los Ag-HBe positivos. Sostienen que el genotipo A no tiene una desventaja al seleccionar el mutante precore y tomar el fenotipo anti-HBe y que por lo tanto, la selección de mutantes precore que evitan la expresión del Ag-HBe no necesariamente depende de la estabilidad de la señal de encapsidación.

Entre los pacientes que presentan anti-Ag-HBe positivo tenemos la siguiente distribución de genotipos del VHB: 49 son de genotipo D (91%); 4 son genotipo A (7%) y 1 es genotipo F(2%). La presencia de este 7% de genotipos A entre los anti-Ag-HBe sugiere varias posibilidades, la emergencia de un mutante precore diferente del G1896A, que se haya producido un doble cambio C1858T/G1896A o que se hayan producido mutaciones en el promotor del core que reduce la producción del Ag-HBe. Entre los que presentan Ag-HBe positivo encontramos un 75% de genotipo D (35/47)

frente a un 19% de genotipo A(9/47), el resto son del genotipo F y G con un 4% y 2% respectivamente. Observamos que el genotipo A es más frecuente en los pacientes que son Ag-HBe-positivos que entre los anti-HBe positivos (19% frente 7%). Por lo tanto, estos resultados están en concordancia con los datos aportados por otros autores que describen que en Francia, España y los Estados Unidos el genotipo A es más prevalente entre los pacientes Ag-HBe positivos que entre los pacientes anti-HBe-positivos (Li et al., 1993; Rodríguez-Frías et al., 1995; Mangia et al., 1996).

En las prevalencias por sexo de los genotipos se observa mayor variabilidad e genotipos en hombres detectándose genotipos A, D, F y G. En mujeres solo se observan genotipos A y D, que son los prevalentes en nuestro área.

Sólo cinco casos de pacientes resultaron ser infecciones agudas, lo que supone un 5% del total de casos estudiados. Cuatro de ellos presentaban el genotipo D y el otro el genotipo A. Este hecho no supone una diferencia significativa en nuestro estudio debido a la escasez de datos ($p>005$), pero se ha descrito una mayor proporción de infecciones agudas entre los infectados con el genotipo D respecto a los infectados con el genotipo A (Mayerat et al., 1999). En este estudio realizado en Suiza la prevalencia de infección crónica fue muy superior entre los infectados con el genotipo A en comparación con el genotipo D. Sin embargo, nosotros observamos una prevalencia mayor de genotipos D entre los enfermos crónicos que del genotipo A (82% y 14% respectivamente).

Se aportan cada vez más evidencias sobre las diferencias clínicas entre las infecciones con virus de un genotipo o un serotipo determinado, incluyendo la edad de seroconversión de Ag-HBe a anti-Ag-HBe, el riesgo de desarrollo de daño hepático severo, incluyendo HCC, y la respuesta al tratamiento antiviral. También hay que destacar la posible implicación de las características interindividuales en la respuesta del hospedador a la infección. En nuestro estudio se observan diferencias en cuanto a los patrones de RFLP que hemos obtenido. El patrón D1 está presente en las coinfecciones con VHC y VIH con mayor frecuencia que en el resto de los pacientes (de los 9 patrones D1, cinco de ellos están presentes en coinfecciones). Esto nos hace pensar en una posible selección de variantes debido a una posible interacción al presentarse coinfección con otro agente.

Se han detectado cinco casos de coinfecciones con diferentes genotipos realizando sucesivos análisis de RFLP en el seguimiento de los pacientes. En cuatro de estos casos el genotipo que emergió fue el genotipo A elevándose la carga viral de forma notable y en el otro caso fue el genotipo F coincidiendo también con un aumento de la carga viral. Este hecho nos hace pensar en la mayor capacidad replicativa del genotipo A y F frente al genotipo D.

Hemos observado un caso de un cambio de patrón de RFLP de D2 a D1. El patrón D2 se detectó después de once meses de tratamiento con lamivudina y el análisis de la secuencia de nucleótidos del virus en el motivo YMDD era salvaje. En controles posteriores se detecta el patrón D1 coincidiendo con un aumento de la carga viral y con la presencia de mutaciones en el motivo YMDD que confieren la resistencia. Este hecho supone que, bajo una cierta presión el virus, se seleccionan subpoblaciones que poseen alguna ventaja selectiva sobre las otras. Está descrito el cambio de genotipo y la mezcla de genotipos que explicaría estos cambios a lo largo del seguimiento de los pacientes (Bahn et al., 1997; Gerner et al., 1998; Hannoun et al., 2002).

3. RESISTENCIAS

Estudios recientes muestran una cierta relación de los genotipos con la respuesta al tratamiento con interferón, con la resistencia al tratamiento con lamivudina y con el desarrollo de cirrosis y carcinoma hepatocelular (Kao et al., 2000).

Se ha descrito que el genotipo D se asocia con daño hepático más severo que el genotipo A y puede ser predictor de HCC en pacientes jóvenes (Kao et al 2002). Los genotipos C y D se asocian con una mayor respuesta al tratamiento en comparación con el B y con el A. En nuestro estudio hemos observado que, en los pacientes sometidos a tratamiento había una mayor proporción de mutantes resistentes a lamivudina pertenecientes a los genotipos A y F. Teniendo en cuenta la baja prevalencia de estos genotipos en nuestra población (13% y 3% respectivamente), este dato es de especial interés. Por lo tanto, entre los genotipos “No D” encontramos a tratamiento 10/11(91%) pacientes, mientras que entre los genotipos D encontramos 19/42(45%); esta diferencia es muy significativa ($p < 0,008$).

Los pacientes de nuestro estudio que presentan la variante mutante llevaban a tratamiento con lamivudina entre once meses y dos años en el momento del estudio, esto está de acuerdo con lo publicado por algunos autores que sostienen que la aparición de la resistencia tiene lugar a partir del sexto mes de tratamiento ininterrumpido (Chayama et al., 1998; Melegari et al., 1998). En nuestro estudio no hemos encontrado aparición de resistencias localizadas en el dominio YMDD en pacientes tratados menos de 6 meses, pero sí hemos observado la aparición de una mutación en el codón 555 junto con el genotipo salvaje para esta posición, es decir la coexistencia de cuasiespecies para esta posición. Esta mutación, que no ha podido ser detectada por secuenciación pero sí por LIPA, está descrita como una mutación fuera del motivo YMDD, en el dominio C de la polimerasa viral, y está relacionada con la resistencia a famciclovir (Pichoud et al., 1999; Fu et al., 1998). En estudios realizados *in vitro* se ha observado que la mutación V555I presenta una sensibilidad moderadamente reducida a lamivudina (Xiong et al., 2000). Aunque la detección de mutantes puede observarse a partir de los seis meses de tratamiento, recientemente se ha descrito la aparición de mutaciones en el motivo YMDD con sustitución de metionina por Valina o Isoleucina en la posición 552 en pacientes que nunca habían sido tratados con lamivudina o con otro análogo de nucleósido en el pasado (Kobayashi et al., 2001). También se ha detectado, en otro estudio, mutantes YMDD en pacientes que sólo estaban a tratamiento con lamivudina desde hacía 2 semanas (Paik et al., 2001). Pero estos estudios se basan en análisis de secuencias después su clonaje, con lo que se detectan variantes que están presentes en muy poca cantidad. La detección de estas resistencias por otros métodos como secuenciación y PCR-RFLP, sólo puede tener lugar si la subpoblación mutante es superior al 10% de la población total. En este caso el paciente había comenzado el tratamiento hacía un mes y resulta inusual el hallazgo esta mutación. Esto apoyaría la hipótesis de que el VHB, al igual que otros virus, circule como cuasiespecies y que la cepa que predomina depende de su capacidad replicativa, de la respuesta del huésped y del tipo de terapia antiviral (Alexopoulou et al., 1997; Cane et al., 1999). Por lo tanto es posible que la cuasiespecie que hemos detectado tenga algún tipo de ventaja replicativa que facilite su detección mediante LIPA. Este dato podría por lo tanto ser de mucha utilidad a la hora de seleccionar el tratamiento ya que la presencia de esta variante mutante podría llevar a alteraciones de la respuesta al tratamiento con lamivudina.

El sistema de genotipado basado en RFLP nos proporciona una información adicional sobre la variabilidad genética del virus. Los patrones D1 y D2 del genotipo D, no presentan el mismo tipo de mutaciones en los pacientes sometidos a tratamiento. Los genotipos D con patrón D2 que son resistentes a lamivudina, pertenecen a los mutantes del grupo II (M552I), esto sucede en los dos aislados que presentan resistencia. Sin embargo el patrón D1 presenta la mutación del grupo I.

En líneas generales el genotipo D parece presentar menor susceptibilidad a la aparición de resistencias debidas al uso de lamivudina. Dos casos de genotipo D(D2) presentan la mutación considerada por algunos autores intermedia (M552I) y que precede a la mutación M552V. Otros dos casos de genotipo D(D1) presentan la mutación M552V. Un hecho interesante es que los genotipos D con la mutación M552V (que confiere alto grado de resistencia a lamivudina) presentan expresión de Ag-HBe y los que son portadores de la mutación M552I son anti-HBe. Es posible que la baja prevalencia de mutantes resistentes encontrados entre la población de genotipo D se deba a que en nuestra población existe un porcentaje elevado de mutantes precoces y este hecho nos hace pensar en la existencia de alguna incompatibilidad entre ambas mutaciones. Por otro lado, se observó una mayor proporción de genotipos D que negativizaron el ADN respecto al resto de los genotipos.

De los trece mutantes resistentes a lamivudina diez presentan Ag-HBe positivo. Esto está de acuerdo con que la tasa de seroconversión Ag-HBe después de la emergencia del mutante YMDD es alrededor de un 50% menor que en el genotipo salvaje. También está descrito que existen diferentes tasas de seroconversión entre genotipos, como en el caso del VHB genotipo B que se asocia con seroconversión más temprana que el genotipo C (Chu et al., 2002).

En el fragmento en el cual se basa el estudio de genotipo y resistencia a lamivudina en los genotipos D (sometidos o no a tratamiento) se observa una divergencia de nucleótidos de 3,3% respecto a una secuencia consenso de dicho genotipo. Este fragmento, que es bastante conservado debido a su importancia funcional, supone la doceava parte del genoma del virus. Siendo algunos de estos cambios polimorfismos sin repercusión en el aminoácido codificado. Esta región del gen de la polimerasa es altamente conservada, al contrario que las regiones pre-S que

son aquellas en las que reside gran parte de la variabilidad del virus y en las que están basados las técnicas de genotipado empleadas con más frecuencia. La divergencia de nucleótidos que se observa en los genotipos A sometidos a tratamiento es muy superior a la observada para este mismo genotipo en pacientes no sometidos a tratamiento. Esta diferencia no se observa entre los genotipos D lo cual es reflejo de que el genotipo D varía menos que el genotipo A, lo que queda reflejado en la resistencia a los antivirales observada en 6/7 genotipos A sometidos a tratamiento frente a 3/17 de los genotipos D sometidos a tratamiento. Los tres genotipos F descritos poseen las mutaciones que confieren resistencia al tratamiento con lamivudina.

En lo que se refiere a los métodos empleados para la detección de resistencias hay que señalar la mayor sensibilidad en la detección de cuasiespecies como ventaja del LIPA frente a la secuenciación. Se observa la aparición de mutantes y virus salvaje coexistiendo como dos subpoblaciones en el suero de los pacientes que se encuentran tratamiento. En un caso hemos observado una diferente detección del tipo de mutación por ambos sistemas. Mediante LIPA se detectó la mutación del grupo I (M528/V552) como población mayoritaria, sin embargo la población detectada por secuenciación fue la mutación del grupo I (M552I).

Hay que destacar un hecho llamativo respecto al genotipo F. Este genotipo codifica en el codón 555 para Leucina según 18 secuencias analizadas procedentes de la base de datos del NCBI. Todas ellas poseen CTG en dicho codón que codifica para Leucina como podemos detectar por secuenciación. No podemos dar una explicación con certeza ya que podría tratarse de una mezcla de variantes del virus en esta región ya que realmente lo que predomina en nuestro medio es el genotipo D y este sí que posee una valina en esta posición. Este fenómeno podría ser debido a que los distintos métodos, LIPA y secuenciación, amplifiquen preferencialmente unas secuencias respecto a las otras (o que se presente cierta inespecificidad en las sondas del LIPA al existir dos o más secuencias semejantes). Esto se observa en el resultado comparativo de resistencias en el cual se detectan mezclas de genotipo mutante y salvaje por LIPA y no por secuenciación.

Secuenciar la región implicada en las resistencias al tratamiento con lamivudina aporta información adicional sobre otros cambios en la secuencia que pueden tener

repercusiones en el curso clínico de la infección. Se han descrito otras mutaciones como L428V/I /M552I, L430M/M552V y F514/L528M pero que no han sido evaluadas *in vitro* respecto a su competencia replicativa o a la resistencia a lamivudina (Fu et al., 1998). También se ha descrito una “evolución” de la mutación L528M/M552V hacia otra mutación que es A529T. Este fenómeno se ha observado en tres pacientes sometidos a tratamiento con lamivudina (Yeh et al., 2000). No está claro el significado de esta mutación ya que realmente no se ha observado en pacientes que presentasen recaída (viremia) bajo el tratamiento con lamivudina. Por lo tanto, conocer los cambios que se pueden originar a lo largo de la terapia es de gran utilidad ya que todavía están sin evaluar ciertas mutaciones observadas durante el curso de la infección. Este conocimiento aportaría información adicional de cara a interrumpir el tratamiento según la emergencia o no de determinadas mutaciones.

La decisión sobre cuando interrumpir el tratamiento con lamivudina es un aspecto del seguimiento de los pacientes poco contemplado, pero a raíz de las recientes publicaciones cobra mayor interés. Se ha descrito la aparición conjunta del mutante resistente a lamivudina y una mutación que localizada en el gen de superficie del VHB (Bock et al., 2002). Se ha observado que en algunos pacientes bajo esta situación se desencadenó un fallo hepático severo e incluso la muerte en algún caso. También se han descrito casos en los que emerge el mutante resistente a lamivudina en pacientes coinfectados con VIH en los que se desencadena una hepatitis fulminante (Perrillo et al., 2001; Bonacini et al., 2002). Estos datos reflejan la necesidad de la detección precoz de VHB mutantes sobre todo en pacientes coinfectados con el virus de la inmunodeficiencia humana con lo que algunos autores recomiendan la monitorización de las resistencias e incluso sugieren que la terapia de la hepatitis B debe preceder a la del VIH al menos en los pacientes que no presenten una inmunodeficiencia severa (Bruno et al., 2001).

La detección de la mutación L521 se observa en una proporción elevada en nuestro estudio de resistencias. Esta mutación está sin evaluar como responsable de la resistencia a lamivudina aunque ha sido encontrada en algunos casos de pacientes que presentaban resistencia al tratamiento (Fischer et al., 2001). Detectamos la presencia de esta mutación en seis casos de los 12 mutantes resistentes a lamivudina, lo que supone una proporción elevada. Siempre se detecta en asociación con las mutaciones de los

grupos I y II por lo que es posible que esté vinculada a estas aunque esta mutación apenas es mencionada en la literatura y no ha sido evaluada en estudios in vitro.

CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

1. El sistema de genotipado basado en amplificación y análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP) no proporciona una caracterización adecuada del virus ya que no discrimina bien entre ciertos genotipos. Por otro lado, si establecemos una clasificación de los genotipos del VHB en genotipo D y genotipo "No D", este sistema resulta de utilidad ya que la diferenciación entre los dos grupos es aceptable. Además, proporciona información adicional sobre la variabilidad genética dentro del genotipo D. Por tanto, resulta un método válido para esta dualidad en nuestro medio donde la prevalencia del genotipo D es muy alta, pero no para estudios en los que la variabilidad genética del virus es mayor.

2. El sistema de genotipado basado en el análisis mediante una PCR que emplea cebadores específicos de genotipo no proporciona información suficiente sobre la variabilidad genética del VHB. No es un método adecuado para estudios a gran escala ya que aporta resultados erróneos y no concluyentes en un gran número de casos.

3. El método diseñado por nosotros basado en la secuenciación de la región de la polimerasa implicada en la resistencia al tratamiento con lamivudina proporciona una doble información sobre la caracterización molecular del virus de la hepatitis B: el genotipado y la detección de resistencias al tratamiento.

- a. Con este método proponemos una única secuencia consenso para cada genotipo con lo que se facilita el proceso de análisis de las secuencias. El análisis de esta región proporciona información sobre el genotipo viral en todos los casos y no se obtienen resultados no tipables como sucede con otros métodos. El empleo de este sistema de genotipado nos ha permitido detectar la presencia del genotipo G en nuestra región. Este genotipo ha sido

descrito por primera vez en Estados Unidos y Francia, y hasta el momento, es el primero descrito en España.

- b. A pesar de que la región del gen de la polimerasa implicada en las resistencias a lamivudina es altamente conservada, su pequeña variabilidad es suficiente para genotipar el virus. Esta región no se ve influenciada por la presencia de mutaciones que confieren resistencia a lamivudina que pudieran producir un error en el genotipado.

4. El sistema de genotipado LiPA presenta una buena concordancia con el método basado en la secuenciación y además presenta la ventaja de detectar coinfecciones por distintos genotipos.

5. La prevalencia del genotipo D es mayoritaria entre los pacientes con infección crónica, seguida por el genotipo A que se encuentra en menor proporción. El genotipo F está escasamente representado y no se detectan los genotipos C, B y E. La presencia de coinfecciones es más frecuente de lo que se había pensado hasta el momento.

6. Los genotipos "No D" están presentes en mayor proporción entre los pacientes que presentan Ag-HBe positivo. No se observan diferencias de carga viral entre los genotipos D y "No D", ni con los niveles de ALT.

7. En lo que se refiere a la detección de las principales mutaciones que confieren resistencia a lamivudina, existe una buena concordancia entre la secuenciación y el sistema de detección de resistencias LiPA. El sistema LiPA permite la detección de cuasiespecies emergentes, es decir detectamos simultáneamente las subpoblaciones salvaje y mutante, aunque una de ellas se presente en menor cantidad. Sin embargo, la secuenciación solamente permite detectar la subpoblación dominante pero, por otro lado, presenta la ventaja de poder detectar cualquier cambio producido en la secuencia. Por tanto, la secuenciación permite controlar en todo momento posibles variaciones de la secuencia debidas al tratamiento que no estén descritas o evaluadas.

8. Todas las mutaciones relacionadas con la resistencia al tratamiento con lamivudina encontradas en nuestro estudio se corresponden con las ya descritas, siendo mayoritariamente mutantes del grupo I (M528-V552). Además hemos observado una alta prevalencia de la mutación L521 siempre en asociación con las mutaciones M528 y V/I552, lo que sugiere su posible participación en el mecanismo de resistencia.

9. Entre los pacientes sometidos a tratamiento con lamivudina se observa que el genotipo D negativiza el ADN-VHB en mayor proporción que los genotipos "No D". Este hecho es la consecuencia de la elevada prevalencia de mutantes resistentes a lamivudina entre los genotipos "No D". La mayoría de los mutantes resistentes presentan Ag-HBe positivo.

BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

Allen MI, Gauthier J, DesLauriers M, Bourne EJ, Carrick KM, Baldanti F, Ross LL, Lutz MW, Condreay LD. Two sensitive PCR-based methods for detection of hepatitis B virus variants associated with reduced susceptibility to lamivudine. *J Clin Microbiol* 1999;37(10):3338-47.

Aikawa T, Kanai K, Kako M, Kawasaki T, Hino K, Iwabuchi S, Tsubouchi H, Takehira Y, Tsuda F, Okamoto H, Miyakawa Y, and Mayumi M. Interferon- α 2a for chronic hepatitis B with e antigen or antibody: comparable antiviral effects on wild-type virus and precore mutant. *J Viral Hepatitis* 1995;2:243-250.

Aoki N, Robinson WS. Hepatitis B virus in cirrhotic and hepatocellular carcinoma nodules within the same liver. *Mol Biol Med* 1989.

Arauz-Ruiz P, Norder H, Visona KA, Magnius LO. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Central America reflected in the genetic variability of the small S gene. *J Infect Dis* 1997 Oct;176(4):851-8.

Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnius LO. A new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* 2002 Aug;83(Pt 8):2059-73.

Arii M, Takada S, and Koike K. Identification of three essential regions of hepatitis B virus X protein for trans-activation function. *Oncogene* 1992;7:397-403.

Asahina Y, Enomoto N, Ogura Y, Kurosaki M, Sakuma I, Izumi N, Marumo F, Sato C. Sequential changes in full-length genomes of hepatitis B virus accompanying acute exacerbation of chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1996 Dec;25(6):787-94.

Aye TT, Bartholomeusz AJ, Shaw T, Bowden DS, Breschkin AM, Mcmillan JS, Angus P, et al. Hepatitis B virus polymerase mutations during antiviral therapy in a patient following liver transplantation. *J Hepatol* 1997; 26:1148-1153.

Bancroft WH, Mundon FK, and Russell PK. Detection of additional antigenic determinants of hepatitis B antigen. *Journal of Immunology* 1972;109:842-848.

Bahn A, Gerner P, Martine U, Bortolotti F, Wirth S. Detection of different viral strains of hepatitis B virus in chronically infected children after seroconversion from Ag-HBs to anti-HBs indicating viral persistence. *J Hepatol* 1997 Dec;27(6):973-8.

Bartholomew MM, Jansen RW, Jeffers LJ, Reddy KR, Johnson LC, Bunzendahl H, Condreay LD, Tzakis AG, Schiff ER, and Brown NA. Hepatitis B virus resistance to lamivudine given for recurrent infection after orthotopic liver transplantation. *Lancet* 1997;349:20-22.

Bavand M, Feitelson M, Laub O. The hepatitis B virus-associated reverse transcriptase is encoded by the viral pol gene. *J Virol* 1989;63:1019-1021.

Beasley RP, Lin CC, Hwang LY, Chien CS. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus: a prospective study of 22,707 men in Taiwan. *Lancet* 1981;2:1129-1133.

Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, McAdam KP, Thursz M, Whittle HC, Hill AV. Tuberculosis and chronic hepatitis B virus infection in Africans and variation in the vitamin D receptor gene. *J Infect Dis* 1999;179:721-724.

Ben-Levy R, Factor O, Berger I, Shaul Y. Cellular factors that interact with the hepatitis B virus enhancer. *Mol Cell Biol* 1989;9:1804-1809.

Bernhard Zöllner, Albrecht Store, Andreas Plettenberg, Heinz-Hubert Feucht, Matthias Schröter, Peter Schäfer, Rainer Laufs. In vivo dynamics and pathogenicity of wild-type and resistant hepatitis B virus during long-term lamivudine monotherapy- a clinical note. *J Clin Virol* 2000;17:183-188.

Blizt L, Pujol FH, Swenson PD, Porto L, Atencio R, Araujo M, Costa L, Monsalve DC, Torres JR, Fields HA, Lambert S, Van Geyt C, Norder H, Magnus LO, Echevarria JM. & Stuyver L. Antigenic diversity of hepatitis B virus strains of genotype F in Amerindians and other population groups from Venezuela. *Journal of Clinical Microbiology* 1998;36:648-651.

Blumberg BS, Gerstley BLS, Hungerford DA, London WT, Sutnick AI. A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukaemia and hepatitis. *Ann Intern Med* 1967;66:924-931.

Blum HE, Liang TJ, Galun E, and Wands JR. Persistence of hepatitis B viral DNA after serological recovery from hepatitis B virus infection. *Hepatology* 1991;14:56-63.

Bocharni-Chabchoub I, Gargouri A, & Mokdad-Gargouri R. Genotyping of Tunisian hepatitis B virus isolates based on the sequencing of preS2 and S regions. *Microbes and Infection* 2000;2:607-612.

Bock, C., Thomas, Tillmann HL, Torresu, J., Klempnauer, J., Locarnini, S., Manns, MP., and Trautwein, C. Selection of hepatitis B virus polymerase mutants with enhanced replication by lamivudine treatment after liver transplantation. *Gastroenterology* 2002;122:264-273.

Bonacini M, Kurz A, Locarnini S, Ayres A, Gibbs C. Fulminant hepatitis B due to a lamivudine-resistant mutant of HBV in a patient coinfecting with HIV. *Gastroenterology* 2002 Jan;122(1):244-5.

Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, Van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990;28(3):495-403.

Bosh V, Bartinschlager R, Radziwill G, Schaller H. The duck hepatitis B virus P-gen codes for protein strongly associated with the 5'-end of the viral DNA minus strand. *Virology* 1988;166:475-485.

Böttcher B, Wynne SA, and Crowther RA. Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy. *Nature (London)* 1997;386:88-91.

Bowyer SM, van Staden L, Kew MC & Sim JG. A unique segment of the hepatitis B virus group A genotype identified in isolates from South Africa. *Journal of General Virology* 1997;78:1719-1729.

Bowyer SM and Sim JGM. Relationships within and between genotypes of hepatitis B virus at points across the genome: footprints of recombination in certain isolates. *J Gen Virology* 2000;81:379-392.

Brook MG, Karayiannis P, Thomas HC. Which patients with chronic hepatitis B virus infection will respond to alpha-interferon therapy? A statistical analysis of predictive factors. *Hepatology* 1989;10:761-763.

Brunetto MR, Oliveri F, Rocca G, Criscuolo D, Chiaberge E, Capalbo M, David E, Verme G, Bonino F. Natural course and response to interferon of chronic hepatitis B accompanied by antibody to hepatitis B e antigen. *Hepatology* 1989; 10:198-202.

Bruno R, Sacchi P, Malfitano A, Filice G. YMDD-mutant HBV strain as a cause of liver failure in an HIV-infected patient.: *Gastroenterology* 2001 Oct;121(4):1027-8.

Buckwold VE, Xu ZC, Chen M, Yen TSB, and Ou JH. Effects of a naturally occurring mutation in the hepatitis B virus basal core promoter on precore gene expression and viral replication. *J Virol* 1996;70:5845-5851.

Buckwold VE, Xu ZC, Yen TSB, and Ou JH. Effects of a frequent double-nucleotide basal core promoter mutation and its putative single-nucleotide precursor mutations on hepatitis B virus gene expression and replication. *J Gen Virol* 1997;78:2055-2065.

Carman NF, Jacyna MR, Hadziyanis S, Karayiannis P, McGorvey MJ, Makris A, et al. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet* 1989;2:588-591.

Chayama K, Suzuki Y, Kobayashi M, Kobayashi M, Tsubota A, Hashimoto M, Miyamo Y, Koike H, Kobayashi M, Koida I, Arase Y, Saito S, Murashima N, Ikeda K, Kumada H. Emergence and takeover of YMDD motif mutant hepatitis B virus during long term lamivudina therapy and re-take-over by wild type after cessation of therapy. *Hepatology* 1998;27:1711-6.

Chisari FV, Filippi P, Buras J, et al. Structural and pathological effects of synthesis of hepatitis B virus large envelope polypeptide in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:6909-6913.

Chu CJ, Hussain M, Lok AS. Hepatitis B virus genotype B is associated with earlier Ag-HBe seroconversion compared with hepatitis B virus genotype C. *Gastroenterology* 2002 Jun;122(7):1756-62.

Conway JF, Cheng N, Zlotnick A, Wingfield PT, Stahl SJ, and Steven AC. Visualization of a 4-helix bundle in the hepatitis B virus capsid by cryo-electron microscopy. *Nature (London)* 1997;386:91-94.

de Man RA, Bartholomeusz AI, Niesters HGM, Zondervan PE, Locarnini SA. The sequential occurrence of viral mutations in a liver transplant recipient re-infected with hepatitis B: hepatitis B immune globulin escape, famciclovir non-response, followed by lamivudine resistance resulting in graft loss. *J Hepatol* 1998;29:669-75.

Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* 1970 Apr 4;1(7649):695-8.

Dienes HP, Gerken G, Goergen B, Heermann K, Gerlich W, and Meyer zum Büschenfelde KH. Analysis of the precore DNA sequence and detection of precore

antigen in liver specimens from patients with anti-hepatitis B e-positive chronic hepatitis. *Hepatology* 1995;21:1-7.

Dienstag JL. The epidemiology of hepatitis B, the virus, the disease and the vaccine. Millman I et al. Plenum Press, 1984;55.

Dienstag JL, Schiff ER, Wright TL, Perrillo RP, Hann HW, Goodman Z, Crowther L, Condreay LD, Woessner M, Rubin M, Brown NA. Lamivudina as initial treatment for chronic hepatitis B in the United States. *N Engl J Med* 1999;34(17):1256-63.

Dubois MF, Pourcel C, Rousset S, Chany C, Tiollais P. Excretion of hepatitis B surface-antigen particles from mouse cells transformed with cloned viral-DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:4549-4553.

Eble B, Lingappa V, Ganem D. Hepatitis B surface-antigen an unusual secreted protein initially synthesized as a transmembrane polypeptide. *Mol Cell Biol* 1986;6:1454-1463.

Eddleston ALWF, Mondelle M, Mieli-Vergani G, Williams R. Lymphocyte cytotoxicity to autologous hepatocytes in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 1982;2:122s.

Fattovich G, Brollo L, Giustina G, Noventa F, Pontisso P, Alberti A, et al. Natural history and prognostic factors for chronic hepatitis type B. *Gut* 1991;32:294-298.

Fernholz D, Galle PR, Stemler M, Brunetto M, Bonino F, and Will H. Infectious hepatitis B virus variant defective in pre-S2 protein expression in a chronic carrier. *Virology* 1993;194:137-148.

Fiordalisi G, Ghiotto F, Castelnuovo F, Primi D, Cariani E. Analysis of the hepatitis B virus genome and immune response in Ag-HBs, anti-HBs positive chronic hepatitis. *J Hepatol* 1994 Apr;20(4):487-93.

Fischer KP, Gutfreind KS and Tyrrell DL. Lamivudine resistance in hepatitis B: mechanisms and clinical implications. *Drug Resistance Updates* 2001;4:118-128.

Fouillot N, Tlouzeau S, Rossignol JM, and Jean-Jean O. Translation of the hepatitis B virus P gene by ribosomal scanning as an alternative to internal initiation. *J Virol* 1993;67:4886-4895.

Fu L, Cheng YC. Role of additional mutations outside the YMDD motif of hepatitis B virus polymerase in L(-)SddC (3TC) resistance. *Biochem Pharmacol* 1998 May 15;55(10):1567-72.

Galibert F, Mandart E, Fitoussi F, Tiollais P, Charnay P. Nucleotide sequence of hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*. *Nature* 1979;281:646-650.

García PD, Ou JH, Rutter WJ, and Walter P. Targeting of the hepatitis B virus precore protein to the endoplasmic reticulum membrane: after signal peptide cleavage translocation can be aborted and the product released into the cytoplasm. *J Cell Biol* 1988;106:1093-1104.

Gerken G, Kremsdorf D, Capel F, Petit MA, Dauguet C, Manns MP, Meyer zum Büschenfelde KH, and Brechot C. Hepatitis B defective virus with rearrangements in the preS gene during chronic HBV infection. *Virology* 1991;183:555-565.

Gerlich WH, Luer W, Thomssen R, and the Study Group for Viral Hepatitis of the Deutsche Forschungsgemeinschaft. Diagnosis of acute and inapparent hepatitis B virus infections by measurement of IgM antibody to hepatitis B core antigen. *J Infect Dis* 1980;142:95-101.

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 pre-S2-defective particles in chronically infected children. *Virology* 1998;25:245(1):163.

Gray AH, Fang JW, Davis GL, Mizokami M, Wu PC, Williams R, Schuster SM, Lau JY. Variations of hepatitis B virus core gene sequence in Western patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat* 1997;4(6):371-8.

Greenberg HB, Pollard RB, Lutwick LI, Gregory PB, Robinson WS, Merigan TC. Effect of human leukocyte interferon on hepatitis B virus infection in patients with chronic active hepatitis. *N Engl J Med* 1976; 295:517-522).

Gunthard HF, Wong JK, Ignacio CC, Halir DV, Richman DD. Comparative performance of highdensity oligonucleotide sequencing and dideoxynucleotide sequencing of HIV type 1 pol from clinical samples. *AIDS Research Human Retrovir* 1998;14:869-876.

Günther S, Sommer G, Plikat U, Iwanska A, Wain-Hobson S, Will and Meyerhans A. Naturally occurring hepatitis B virus genomes bearing the hallmarks of retroviral G→A hypermutacion. *Virology* 1997;235:104-108.

Günther S, Piwon N, and Will H. Wild-type levels of pregenomic RNA and replication but reduced pre-C RNA and e-antigen synthesis of hepatitis B virus with C(1653)→T, A(1762)→T and G(1764)→A mutations in the core promoter. *J Gen Virol* 1998;79:375-380.

Gunther S, Fischer L, Pult I, Sterneck M, Will H. Naturally occurring variants of hepatitis B virus. *Adv Virus Res* 1999;52:25-137.

Gust I. The epidemiology of viral hepatitis. In *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Edited by G.N. Vyas 1984. Orlando, FL: Grune and Stratton;415-421.

Hamasaki K, Nakata K, Nagayama Y, Ohtsuru A, Daikoku M, Taniguchi K, Tsutsumi T, Sato Y, Kato Y, and Nagataki S. Changes in the prevalence of Ag-HBe negative mutant hepatitis B virus during the course of chronic hepatitis B. *Hepatology* 1994;20:8-14.

Hannoun C, Krogsgaard K, Horal P, Lindh M. genotype mixtures of hepatitis B virus in patients treated with interferon. *J Infect Dis* 2002;15;186(6):752-9.

Honkoop P, Niesters HG, de Man RA, Osterhaus AD, and Schalm SW. Lamivudine resistance in immunocompetent chronic hepatitis B. incidence and patterns. *J Hepatol* 1997;26:1393-1395.

Holland J, Spindler K, Horodyski F, Grabau E, Nichol D, and Vandepol S. Rapid evolution of RNA genomes. *Science* 1982;215:1577-1585.

Horwich AL, Furtak K, Pugh J, and Summers J. Synthesis of hepadnavirus particles that contain replication-defective duck hepatitis B virus genomes in cultured HuH7 cells. *J Virol* 1990;64:642-650.

Hubert GM, Niesters Pieter, Honkoop Elizabeth B. Haagsma, Robert A. De Man, Solko W. Schalm, and Albert D.M.E. Osterhaus. Identification of more than one mutation in the hepatitis B virus polymerase gene arising during prolonged lamivudina treatment. *The Journal of Infectious Disease* 1998;177:1382-5.

Jardi R, Buti M, Rodriguez-Frias F, Cotrina M, Costa X, Pascual C, Esteban R, Guardia J. Rapid detection of lamivudine-resistant hepatitis B virus polymerase gene variants. *J Virol Methods* 1999 Dec;83(1-2):181-7.

Kao JH. Hepatitis B viral genotypes: clinical relevance and molecular characteristics. *J Gastroenterol Hepatol* 2002 Jun;17(6):643-50.

Kato H, Orito E, Sugauchi F, Ueda R, Gish RG, Usuda S, Miyakawa Y & Mizokami M. Determination of hepatitis B virus genotype G by polymerase chain reaction with hemi-nested primers. *Journal of Virological Methods* 2001;98:153-159.

Kato H, Orito E, Gish RG, Sugauchi F, Suzuki S, Ueda R, Miyakawa Y, Mizokami M. Characteristics of hepatitis B virus isolates of genotype G and their phylogenetic differences from the other six genotypes (A through F). *J Virol* 2002 Jun;76(12):6131-7.

Kaplan PM, Ford EC, Purcell RH, Gerin JL. Demonstration of subpopulations of Dane particles. *J Virol* 1976;17:885-893.

Kao JH, Wu NH, Chen PJ, Lai MY and Chen DS. Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy. *Journal of Hepatology* 2000;33:998-1002.

Kao JH. Hepatitis B viral genotypes: clinical relevance and molecular characteristics. *J Gastroenterol Hepatol* 2002 Jun;17(6):643-50

Kidd AH, and Kidd-Ljunggren K. A revision secondary structure model for the 3'-end of hepatitis B virus pregenomic RNA. *Nucleic Acids Res* 1996;24:3295-3301.

Kidd-Ljunggren K, Oberg M. & Kidd CAH. The hepatitis B virus X gene: analysis of functional domain variation and gene phylogeny using multiple sequences. *Journal of General Virology* 1995; 76:2119-2130.

Kioko Ono S, Kato N, Shiratori Y, Kato J, Goto T, Schinazi RF, Carrilho FL and Omata M. The polymerase L528M mutation cooperates with nucleotide binding-site mutations, increasing hepatitis B virus replication and drug resistance. *J Clin Invest.* 2001;107:449-445.

Kobayashi S, Ide T, Sata M. Detection of YMDD motif mutations in some lamivudine-untreated asymptomatic hepatitis B virus carriers. *J Hepatol* 2001 Apr;34(4):584-6.

Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Tsubota A, Suzuki Y, Saitoh S, Kobayashi M, Suzuki F, Akuta N, Someya T, Matsuda M, Sato J, Takagi K, Miyakawa Y, Kumada H. Viral genotypes and response to interferon in patients with acute prolonged hepatitis B virus infection of adulthood in Japan. : *J Med Virol* 2002 Dec;68(4):522-8.

Korba BE, Schinazi RF, Cote P, Tennant BC, Gerin JL. Effect of oral administration of emtricitabine on woodchuck hepatitis virus replication in chronically infected woodchucks. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1757-1769.

Lai CL, Ching RW, Leung NWY, Chang TT, Guan R, et al. A one year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 1998; 339:61-8.

Lamberts C, Nassal M, Velhagen I, Zentgraf H, and Schoröder CH. Precore-mediated inhibition of hepatitis B virus progeny DNA synthesis. *J Virol* 1993;67:3756-3762.

Landers TA, Greenberg HB, Robinson WS. Structure of hepatitis B Dane particle DNA and nature of the endogenous DNA polymerase reaction. *J Virol* 1977;23:368-376.

Laskus T, Rakela J, and Persing DH. The stem-loop structure of the encapsidation signal is highly conserved in naturally occurring hepatitis B virus variants. *Virology* 1994;200:809-812.

Laskus T, Wang LF, Radkowski M, Vargas H, and Rakela J. Comparison of hepatitis B virus core promoter sequences in peripheral blood mononuclear cells and serum from patients with hepatitis B. *J Gen Virol* 1997;78:649-653.

Le Bouvier GL. The heterogeneity of Australia antigen. *J Infect Dis* 1971;123:671-675.

Lee TH, Elledge SJ, and Butel JS. Hepatitis B virus X protein interacts with a probable cellular DNA repair protein. *J Virol* 1995;69:1107-1114.

Li JS, Tong SP, Vitvitski L, Zoulim F, and Trepo C. Rapid detection and further characterization of infection with hepatitis B virus variants containing a stop codon in the distal pre-C region. *J Gen Virol* 1990;67:5402-5410.

Li JS, Tong SP, Wen YM, Vitvitski L, Zhang Q, and Trepo C. Hepatitis B virus genotype A rarely circulates as an HBe-minus mutant: possible contribution of a single nucleotide in the precore region. *J Virol* 1993;67:5402-5410.

Lin Y, Nomura T, Cheong J, Dorjsuren D, Iida K, and Murakami S. Hepatitis B virus X protein is a transcriptional modulator that communicates with transcription factor IIB and the RNA polymerase II subunit 5. *J Biol Chem* 1997;272:7132-7139.

Liaw YF, Lin DY, Chen TJ, Chu CM. Natural course after development of cirrhosis in patients with chronic type B hepatitis: A prospective study. *Liver* 1989;9:235-241.

Lindh M, Furuta Y, Vahlne A, Norkrans G, and Horal P. Emergence of precore TAG mutation during hepatitis B e seroconversion and its dependence on pregenomic base between nucleotides 1858 of 1896. *J Infect Dis* 1995;172:1343-1347.

Lindh M, Horal P, Dhillon AP, Furuta Y, and Norkrans G. Hepatitis B virus carriers without precore mutations in hepatitis B e antigen-negative stage show more severe liver damage. *Hepatology* 1996;24:494-501.

Lindh M, Anderson AS. Genotypes, nt 1858 variants, and geographic origin of hepatitis B virus large-scale analysis using a new genotyping method. *J Infect Dis* 1997;175:1285-1293.

Lindh M, González JE, Norkrans G, Horal P. Genotyping of hepatitis B virus by restriction pattern analysis of a pre-S amplicon. *Journal of Virological Methods* 1998;72:163-174.

Lien J-M, Aldrich CE, Mason WS. Evidence that a capped oligoribonucleotide is the primer for duck hepatitis B virus plus-strand DNA synthesis. *J Virol* 1986;57:229-236.

Ling R, Mutimer D, Ahmed M, Boxall EH, Elias E, Dusheiko GM, Harrison TJ. Selection of mutations in the hepatitis B virus polymerase during therapy of transplant recipients with lamivudine. *Hepatology* 1996;24:711-3.

Ling R, Harrison TJ. Functional analysis of mutations conferring lamivudine resistance on hepatitis B virus. *J Gen Virology* 1999;601-606.

Locarnini SA, Aye TT, Shaw T, De Man R, Angus PW, Mc Caughan GW, Bartholomeusz A. The emergence of famciclovir resistant mutations in the hepatitis B virus polymerase during therapy following liver transplantation. *Hepatology* 1997;26(nº.4 Pt2), Abstract 958.

Lok A, Akarca U & Greene S. Mutations in the pre-core region of the hepatitis B virus serve to enhance the stability of the secondary structure of the pre-genome encapsidation signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 1994;91:4077-4081.

Lok A, Heathcote EJ, Hoofnagle JH. Management of hepatitis B: 2000-Summary of a workshop. *Gastroenterology* 2001;120:1828-1853.

Lopez JL, Mbayed VA, Telenta PF, Gonzalez JE, Campos RH. HBe minus mutants of hepatitis B virus. Molecular characterization and its relation to viral genotypes. *Virus Res* 2002;Jul:87(1):41-9.

McQuillan GM et al. Seroepidemiology of hepatitis B virus infection in the United States *Am J Med* 1989;87(suppl 3A):5S-10S.

Magnius LO, Espmark JA. New specificities in Australia antigen-positive sera distinct from Le Bouvier determinants. *J Immunol* 1972;109:1017-1021.

Mandart E, Kay A, Galibert F. Nucleotide sequence of cloned duck hepatitis B virus genome: comparison with woodchuck and human hepatitis B virus sequences. *J Virol* 1984;49:782-792.

Mangia A, Chung YH, Hoofnagle JH, Birkenmeyer L, Mushahwar I, Di Bisceglie AM. Pathogenesis of chronic liver disease in patients with chronic hepatitis B virus infection without serum Ag-HBe. *Dig Dis Sci* 1996 Dec;41(12):2447-52.

Mangia A, Cascavilla I, Lezzi G, Spirito F, Maertens G, Parlatore L, Saracco G, Rizzetto M, Andriulli A. HCV genotypes in patients with liver disease of different stages and severity. *J Hepatol* 1997 Jun;26(6):1173-8.

Mangold CM, Unckell F, Werr M, and Streeck RE. Secretion and antigenicity of hepatitis B virus small envelope proteins lacking cysteines in the major antigenic region. *Virology* 1995;211:535-543.

Marcellin P, Sereni D, Sacks S, et al. Anti-HBV activity and tolerability of clevudine, a novel nucleoside-analogue: Initial results of a phase I/II 28-day study(abstract). *Hepatology* 2001;34:320^a.

Marison PL, Oshiro L, Regnery DC, Scullard GH, Robinson WS. A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of man. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:2941-2945.

Maruyama T, Kuwata S, Koike K, Iino S, Yasuda K, Yotsuyanagi H, Moriya K, Maekawa H, Yamada H, Shibata Y, Milich DR. Precore wild-type DNA and immune complexes persist in chronic hepatitis B after seroconversion: no association between genome conversion and seroconversion. *Hepatology* 1998 Jan;27(1):245-53.

Mason WS, Seal G, Summers J. Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J Virol* 1980;36:829-836.

Mason WS, Cullen J, Moraleda G, Saputelli J, Aldrich CE, Miller DS, Tennant B, Frick L, Averett D, Condreay LD, Jibert AR. Lamivudine therapy of WHV-infected woodchucks. *Virology* 1998;245:18-32.

Mayerat C, Mantegani A and Frei PC. Does hepatitis B virus (HBV) genotype influence the clinical outcome of HBV infection?. *J Viral Hepatitis* 1999;6:299-304.

Mbayed VA, Lopez JL, Telenta PF, Palacios G, Badia I, Ferro A, Galoppo C & Campos R. Distribution of hepatitis B virus genotypes in two different pediatric populations from Argentina. *Journal of Clinical Microbiology* 1998;36:3362-3365.

Melegari M, Bruno S, and Wands JR. Properties of hepatitis B virus pre-S1 deletion mutants. *Virology* 1994;199:5449-5454.

Melegari M, Scaglioni PP, Wands JR. Hepatitis B virus mutants associated with 3TC and famciclovir administration are replication defective. *Hepatology* 1998;27:628-633.

Milich DR, Jones JE, et al. Is a function of the secreted hepatitis B e antigen to induce immunological tolerance in utero?. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:6599-6603.

Miller RH, Robinson WS. Common evolutionary origin of hepatitis B virus and retroviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:2531-2535.

Miller RH, Marion PL, Robinson WS. Hepatitis B viral DNA-RNA hybrid molecules in particles from infected liver are converted to viral DNA molecules during an endogenous DNA polymerase reaction. *Virology* 1984a;139:64-72.

Miller RH, Robinson WS. Hepatitis B viral DNA forms in nuclear and cytoplasmic fractions of infected human liver. *Virology* 1984b;137:309-399.

Miller RH, Tran CT, Robinson WS. Hepatitis B virus particles of plasma and liver contain viral DNA-RNA hybrid molecules. *Virology* 1984c;139:53-63.

Minami M, Poussin K, Kew M, Okanoué T, Brechot C, Paterlini P. Precore/core mutations of hepatitis B virus in hepatocellular carcinomas developed on noncirrhotic livers. *Gastroenterology* 1996 Sep;111(3):691-700.

Mizokami M, Orito E, Ohba K, Ikeo K, Lau JYN, and Gojobori T. Constrained evolution with respect to gene overlap of hepatitis B virus. *J Mol Evol* 1997;44:83-90.

Molnar-Kimber KL, Summers J, Mason WS. Mapping of the cohesive overlap of duck hepatitis B virus DNA and of the site of initiation of reverse transcription. *J Virol* 1984;51:181-191.

Moraes MT, Gomes SA, Niel C. Sequence analysis of pre-S/S gene of hepatitis B virus strains of genotypes A, D, and F isolated in Brazil. *Arch Virol* 1996;141(9):1767-73.

Moraleda G, Saputelli J, Aldrich CE, Averett D, Condreay LD, Mason WS. Lack of effect of antiviral therapy in non dividing hepatocyte cultures on the closed circular DNA of woodchuck hepatitis virus. *J Virol* 1997; 71:9392-9.

Moriarty A, Alexander H, Lerner RA, Thornton GB. Antibodies to peptides detect new hepatitis B antigen: serological correlation with hepatocellular carcinoma. *Science* 1985;25:227:429-433.

Molnar-Kimber KL, Summers J, Mason WS. Mapping of the cohesive overlap of duck hepatitis B virus DNA and of the site of initiation of reverse transcription. *J Virol* 1984;51:181-191.

Milich DR, Jones JE, et al. Is a function of the secreted hepatitis B e antigen to induce immunological tolerance in utero?. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:6599-6603.

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.

Nakano T, Lu L, Hu X, Mizokami M, Orito E, Shapiro C, Hadler S. & Robertson BH. Characterization of hepatitis B virus genotypes among Yucpa Indians in Venezuela. *Journal of General Virology* 2001;82:359-365.

Nagaya T, Nakamura T, Tokino T, et al. The mode of hepatitis B virus DNA integration in chromosomes of human hepatocellular carcinoma. *Genes Dev* 1987;1:773-782.

Naoumov NV, Schneider R, Grötzinger T, Jung MC, Miska S, Pape GR and Will H. Precore mutant hepatitis B virus infection and liver disease. *Gastroenterology* 1992;102:538-543.

Norder H, Courouce AM, et al. Molecular basis of hepatitis B virus serotype variations within the four major subtypes. *J Gen Virol* 1992a;73:3141-3145.

Norder H, Hammas B, Lofdahl S, et al. Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of the hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. *J Gen Virol* 1992b;73:1201-1208.

Norder H, Hammas B, et al. Genetic relatedness of hepatitis B viral strains of diverse geographical origin and natural variations in the primary structure of the surface antigen. *J Gen Virol* 1993;74:1341-1348.

Norder H, Courouce AM, et al. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology* 1994;198:489-503.

Nowak M, Bonhoeffer S, Hill A, Boehme R, Thomas H, McDade H. Viral dynamics in hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:4398-402.

Odemuyiwa SO, Mulders MN, Oyedele OI, Ola SO, Odaibo GN, Olaleye DO & Muller CP. Phylogenetic analysis of new hepatitis B virus isolates from Nigeria supports endemicity of genotype E in West Africa. *Journal of Medical Virology* 2001;65:463-469.

Okamoto H, Imai M, Kametani M, Nakamura T, Mayumi M. Genomic heterogeneity of hepatitis B virus in a 54-year old woman who contracted the infection through materno-fetal transmission. *Japanese Journal of Experimental Medicine*. 1987;57:232-236.

Okamoto H, Tsuda F, et al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* 1988;69:2575-2583.

Okamoto H, Omi S, Wang Y, Itoh Y, Tsuda F, Tanka T, Akahane Y, Miyakawa Y, and Mayumi M. The loss of subtypic determinants in alleles d/y or w/r in hepatitis B surface antigen. *Molecular Immunology* 1989; 26:197-205.

Okamoto H, Yotsumoto S, Akahane Y, Yamanaka T, Miyazaki Y, Sugai Y, Tsuda F, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M. Hepatitis B viruses with precore region defects prevail in persistently infected hosts along with seroconversion to the antibody against e antigen. *J Virol* 1990 Mar;64(3):1298-303.

Okamoto H, Wang Y, Tanaka T, Machida A, Miyakawa Y and Mayumi M. Trans-complementation among naturally occurring deletion mutants of hepatitis B virus

and integrated viral DNA for the production of viral particles with mutants genomes in hepatoma cell lines. *J Gen Virol* 1993;74:407-414.

Okochi K, Murakami S. Observations on Australia antigen in Japanese. *Vox Sang* 1968;15:374-385.

Oler T, Gerken G, Notghi A, Lubjuhn R, Taheri H, Protzer U, Lohr HF, Schbeider PM, Meyer zum Buschenfelde KH, Rittner C. HLA-DRB1*1301 and 1302 protect against chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1997;26:503-507.

Oler T, Kruger A, Gerken G, Schneider PM, Meyer zum Buschenfelde KH, Rittner C. A tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) promoter polymorphism is associated with chronic hepatitis B infection. *Clin Exp Immunol* 1998;111:579-582.

Ono-Nita SK, Kato N, Shiratori Y, Yoshida H, Carriho FJ, Omata M. Susceptibility of lamivudine-resistant hepatitis B virus to other reverse transcriptase inhibitors. *J Clin Invest* 1999;103:1635-1640.

Orito E, Mizokami M, Ina Y, Moriyama EN, Kameshima N, Yamamoto M & Gojobori T. Host-independent evolution and a genetic classification of the hepadnavirus family based on nucleotide sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 1989;86:7059-7062.

Orito E, Ichida T, Sakugawa H, Sata M, Horiike N, Hino K, Okita K, Okanoue T, Lino S, Tanaka E, Suzuki K, Watanabe H, Hige S & Mizokami M. Geographic distribution of hepatitis B virus (HBV) genotype in patients with chronic HBV infection in Japan. *Hepatology* 2001;34:590-594.

Ou J, Laub O, Rutter W. Hepatitis B virus gene-function-the precore region targets the core antigen to cellular membranes and causes the secretion of the E-antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:1578-1582.

Paik YH, Chung HY, Ryu WS, Lee KS, Lee JS, Kim JH, Lee CK, Chon CY, Moon YM, Han KH. Emergence of YMDD motif mutant of hepatitis B virus during short-term lamivudine therapy in South Korea. *J Hepatol* 2001 Jul;35(1):92-8.

Pasek M, Goto T, Gilbert W, et al. hepatitis B virus genes and their expression in *Escherichia coli*. *Nature* 1979;282:575-579.

Patzer E, Nakamura G, Simonsen C, Levinson A, Brands R,. Intracellular assembly and packaging of hepatitis B surface-antigen particles occur in the endoplasmic-reticulum. *J Virol* 1986;58:884-892.

Perrillo R, Rakela J, Dienstag J, Levy G, Martín P, Wright T, Caldwell S, Schiff E, Gish R, Villeneuve JP, Farr G, Anschuetz G, Crowther L, Brown N. Multicenter study of lamivudine therapy for hepatitis B after liver transplantation. Lamivudine Transplant Group. *Hepatology* 1999;29(5):1581-6.

Perrillo RP. Acute flares in chronic hepatitis B: the natural and unnatural history of an immunologically mediated liver disease. *Gastroenterology* 2001 Mar;120(4):1009-22.

Peters RL. Viral hepatitis: a pathologic spectrum. *Am J Med Sci* 1975;270:17.

Pichoud C, Seigneres B, Wang Z, Trepo C, Zoulim F. Transient selection of a hepatitis B virus polymerase gene mutant associated with a decreased replication capacity and famciclovir resistance. *Hepatology* 1999 Jan;29(1):230-7.

Poch O, Sauvaget I, Delarue M, Tordo N. Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J* 1989;8:3867-3874.

Pollack JR, and Ganem D. An RNA stem-loop structure directs hepatitis B virus genomic RNA encapsidation. *J Virol* 1993;67:3254-3263.

Pollicino T, Zanetti AR, Cacciola I, Petit MA, Smedile A, Campo S, Sagliocca L, Pasquali M, Tanzi E, Longo G, and Raimondo G. Pre-S2 defective hepatitis B virus infection in patients with fulminant hepatitis. *Hepatology* 1997;26:495-499.

Prince AM, Ikram H, Hopp TP. Hepatitis B virus vaccine: identification of Ag-HBs/a and Ag-HBs/d but not Ag-HBs/y subtype antigenic determinants on a synthetic immunogenic peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:579-582.

Prince AM. An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1968;60:814-821.

Protzer-Knolle U, Naumann U, Bartenschlager R, Berg T, Hopf U, Mayer zum Büschenfelde KH, Neuhaus P, and Gerken G. Hepatitis B virus with antigenically altered hepatitis B surface antigen is selected by high-dose hepatitis B immune globulin after liver transplantation. *Hepatology* 1998;27:254-263.

Radziwill G, Tucker W, and Schaller H. Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: Domain structure and Rnase H activity. *J Virol* 1990;64:613-620.

Repp R, Rhiel S, Heermann KH, Schaefer S, Keller CNdumbe P, Lampert F and Gerlich WH. Genotyping by multiplex polymerase chain reaction for detection of endemic hepatitis B virus transmission. *J Clin Microbiol.* 1993 May;31(5):1095-102.

Robinson WS, Clayton DA, Greenman RL. DNA of human hepatitis B virus candidate. *J Virol* 1974;14:384-391.

Rodríguez-Frias R, Buti M, Jardí R, Cortina M, Viladomiu L, Esteban R, and Guardia J. Hepatitis B virus infection: Precore mutants and its relation to viral genotypes and core mutations. *Hepatology* 1995;22:1641-1647.

Sanchez LV, Maldonado M, Bastidas-Ramirez BE, Norder H, Panduro A. Genotypes and S-gene of Mexican hepatitis B virus strains. *J Med Virol* 2002 Sep;68(1):24-32.

Sadakazu Usuda, Hiroaki Okamoto, Hiroko Iwanari, Kiyoshi Baba, Fumio Tsuda, Yuzo Miyakawa and Makoto Mayumi. Serological detection of hepatitis B virus genotypes by ELISA with monoclonal antibodies to type-specific epitopes in the preS2-region product. *J Virol Methods*, June 1999, Pages 97-112.

Sanger F, Nicklen Sand Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA.* 1977;74:5463-5467.

Sattler F, Robinson WS. Hepatitis B viral DNA molecules have cohesive ends. *J Virol* 1979;32:226-233.

Scheck, N., Fisher, M., and Schaller, H. Molecular biology of the hepatitis B virus. A. McLachlan, ed. 1991; 181-192. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Scotto J, Hadchouel M, Wain-Hobson S, et al. Hepatitis B virus DNA in Dane evidence for the presence of replicative intermediates. *J Infect Dis* 1985;151:610-617.

Seeger C, Ganem D, Varmus HE. Biochemical & genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy. *Science* 1986;232:477.

Seeger C, and Maragos J. Identification of a signal necessary for initiation of reverse transcription of the hepadnavirus genome. *J Virol* 1991;65:5190-5195.

Seifer M, and Standring DN. A protease-sensitive hinge linking the two domains of the hepatitis B virus core protein is exposed on the viral capsid surface. *J Virol* 1994;68:5548-5555.

Shih JW, Cheung LC, Alter HJ, Lee LM, Gu JR. Strain analysis of hepatitis B virus on the basis of restriction endonuclease analysis of polymerase chain reaction products. *J Clin Microbiol* 1991 Aug;29(8):1640-4.

Siddiqui A, Sattler FR, Robinson WS. Restriction endonuclease cleavage map and location of unique feature of the DNA of hepatitis B virus subtype adw₂. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4664-4668.

Sokal EM, Conjeevaram HS, Roberts EA, Alvarez F, Bern EM, Goyens P, Rosenthal P, Lachaux A, Shelton M, Sarles J, Hoofnagle J. Interferon alfa therapy for chronic hepatitis B in children: a multinational randomized controlled trial. *Gastroenterology* 1998;114:988-995.

Sterneck M, Kalinia T, Otto S, Günther S, Fischer L, Burdelski M, Greten H, Broelsch CE, and Will H. Neonatal fulminant hepatitis B: Structural and functional analysis of complete hepatitis B genomes from mother and infant. *J Infect Dis* 1998;177:1378-1381.

Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF, Rossau R. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol* 2000a Jan;81(Pt 1):67-74.

Stuyver L, Van Geyt C, De Gendt S, Van Reybroeck G, Zoulim F, Leroux-Roels G, Rossau R. Line probe assay for monitoring drug resistance in hepatitis B virus-infected patients during antiviral therapy. *J Clin Microbiol* 2000b;38(2):702-7.

Stuyver LJ, Locarnini SA, Lok A, Richman DD, Carman WF, Dienstag JL, Schinazi RF. Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. *Hepatology* 2001 Mar;33(3):751-7.

Su TS, Lai CJ, Huang JL, Lin LH, Yauk YK, Chang CM, Lo SJ and Han SH. Hepatitis B virus transcript produced by RNA splicing. *J Virol* 1989;63:4011-4018.

Sugauchi F, Orito E, Ichida T, Kato H, Sakugawa H, Kakumu S, Ishida T, Chutaputti A, Lai CL, Ueda R, Miyakawa Y, and Mizokami M. Hepatitis B virus of genotype B with or without recombination with genotype C over the precore region plus the core gene. *J Virology*; June 2002;5985-5992.

Summers JA, O'Connell A, Millman I. Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:4597-4601.

Summers J, Smolec JM, Zinder R. A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75:4533-4537.

Summers J, Mason WS. Replication of the genome of a hepatitis B--like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell* 1982;Jun;29(2):403-15.

Suzuki T, Masui N, Kajino K, Saito I, and Miyamura T. Detection and mapping of spliced RNA from a human hepatoma cell line transfected with the hepatitis B virus genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:8422-8426.

Takahashi K, Machida A, Funatsu G, Nomura M, Usuda S, Aoyagi S, Tachibana K, Miyamoto H, Imai M, Nakamura T, Miyakawa Y and Mayumi M. Immunochemical structure of hepatitis B e antigen in the serum. *J Immunol* 1983;130:2903-2907.

Takayanagi M, Kakuma S, Ishikawa T, Higashi T, Yoshioka K and Wakita T. Comparison of envelope and precore/core variants of hepatitis B virus (HBV) during chronic HBV infection. *Virology* 1993;196:138-145.

Talbodec N, Lorient MA, Gigou M, Guignon V, Boyer N, Bezeaud A, Erlinger S, Benhamou JP and Marcellin P. Hepatitis B virus precore mutations and Ag-HBe negative reactivation of chronic hepatitis B after interferon therapy. *Liver* 1995;15:93-98.

Tassopoulos NC, Volpes R, Pastore G, Heathcote J, Buti M, Goldin RD, Hawley S, Barber J, Condreay L, Gray DF. Efficacy of lamivudine in patients with hepatitis B e antigen-negative/hepatitis B virus DNA-positive (precore mutant) chronic hepatitis B. Lamivudine Precore Mutant Study Group. *Hepatology* 1999 Mar;29(3):889-96.

Telenta PF, Poggio GP, et al . Increased prevalence of genotype F hepatitis B virus isolates in Buenos Aires, Argentina. *J Clin Microbiol* 1997;35:1873-1875.

Theamboonlers A, Jantaradsamee P, Kaew-In N, Tangkijvanich P, Hirsch P & Poovorawan Y. The predominant genotypes of hepatitis B virus in Thailand. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 1999;93:737-743.

Tipples GA, Ma MM, Fischer KP, Bain VG, Kneteman NM, Tyrrel DLJ. Mutation in HBV RNA-dependent DNA polymerase confers resistance to lamivudine in vivo. *Hepatology* 1996;24:714-717.

Toh H, Hayashida H, Miyata T. Sequence homology between retroviral reverse transcriptase and putative polymerases of hepatitis B and cauliflower mosaic virus. *Nature* 1983;305:827-829.

Tong SP, Brotman B, Li JS, Vitvitski L, Pascal D, Prince AM, and Trepo C. In vitro and in vivo replication capacity of the precore region defective hepatitis B virus variants. *J Hepatol* 1991;13(Suppl.4):S68-S73.

Tong SP, Li JS, Vitvitski L, and Trepo C. Replication capacities of natural and artificial precore stop codon mutants of hepatitis B virus: Relevance of pregenome encapsidation signal. *Virology* 1992;191:237-245.

Tong SP, Li JS, Vitvitski L, Kay A and Trepo C. Evidence for a basepaired region of hepatitis B virus mutations abolishing HBe protein expression. *J Virol* 1993;67:5651-5655.

Toukan A. Strategy for the control of hepatitis B virus infection in the Middle East and North Africa. *Vaccine* 1990;8(suppl);S117-S121.

Trautwein C, Schrem H, Tillman HL, Kubicka S, Walker D, Böker KHW, Maschek HJ, Pichlmayr R, and Manns MP. Hepatitis B virus mutations in the pre-S genome before and after liver transplantation. *Hepatology* 1996;24:482-488.

Trey C. The fulminant hepatic failure surveillance study: brief review of the effects of presumed etiology and age of survival. *Can Med Assoc J* 1972;106:525-527.

Tuttleman JS, Pugh JC, Summers JW. In vitro experimental infection of primary duck hepatocyte cultures with DHBV. *J Virol* 1986;58:17-25.

Twu JRS, Robinson WS. The hepatitis B virus X-gen can trans-activate heterologous viral sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2046-2050.

Vartanian JP, Meyerhans A, Sala M and Wain-Hobson S. G→A hypermutation of the human immunodeficiency virus type 1 genome: evidence for dCTP pool imbalance during reverse transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:3092-3096.

Wang HP, and Rogler CE. Topoisomerase I-mediated integration of hepatitis B virus DNA in vitro. *J Virol* 1991;65:2381-2392.

Wang J, Lee AS and Ou JH. Proteolytic conversion of hepatitis B virus antigen precursor to end product occurs in a postendoplasmic reticulum compartment. *J Virol* 1991;65:5080-5083.

Will H, Reiser W, Weimer T, et al. Replication strategy of human hepatitis B virus. *J Virol* 1987;61:904-911.

Wong DKH, Cheung AM, O'Rourke K, Naylor CD, Detsky AS, Heathcote J. Effect of alpha-interferon treatment in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. A meta-analysis. *Ann Intern Med* 1993;119:312-323.

Xiong X, Yang H, Westland CE, Zou R, Gibbs CS. In vitro evaluation of hepatitis B virus polymerase mutations associated with famciclovir resistance. *Hepatology* 2000 Jan;31(1):219-24.

Yaginuma K, Shirakata Y, Kobayashi M, Koike K. Hepatitis B virus (HBV) particles are produced in a cell-culture system by transient expression of transfected HBV-DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:2678-2682.

Yamamoto K, Horikita M, Tsuda F, Itoh K, Akahane Y, Yotsumoto S, Okamoto H, Miyakawa Y and Mayumi M. Naturally occurring escape mutants of hepatitis B virus with various mutations in the S gene in carriers seropositive for antibody to hepatitis B surface antigen. *J Virol* 1994;68:2671-2676.

Yang W and Summers J. Illegitimate replication of linear hepadnavirus DNA through nonhomologous recombination. *J Virol*. 1995;69:4029-4036.

Yang W, Mason WS, Summers J. Covalently closed circular viral DNA formed from two types of linear DNA in woodchuck hepatitis virus-infected liver. *J Virol* 1996;Jul;70(7):4567-75.

Yeh CT, Chien RN, Chu CM, Liaw YF. Clearance of the original hepatitis B virus YMDD-motif mutants with emergence of distinct lamivudine-resistant mutants during prolonged lamivudine therapy. *Hepatology* 2000 Jun;31(6):1318-26.

Yoakum GH, Korba BE, Lechner JR, et al. High-frequency transfection and cytopathology of hepatitis B virus core antigen gene in human cells. *Science* 1983;222:385-389.

Yuan TT, Faruqi A, Shih JW and Shih C. The mechanism of natural occurrence of two closely linked HBV precore predominant mutations. *Virology* 1995;211:144-156.

Zoulim F, Trepo C. Drug therapy for chronic hepatitis B: antiviral efficacy and influence of hepatitis B virus polymerase mutations on the outcome of therapy. *J Hepatol* 1998 Jul;29(1):151-68.

ANEXOS

VIII. ANEXOS

Anexo I

Comparación de genotipos sobre la muestra aleatoria de 48 virus extraídos al azar del GenBank.

	YMDD	NCBI	Genotipo	
AB010289	B		B	Concordancia
AB010291	B		B	Concordancia
AB014363	C		C	Concordancia
AB014374	C		C	Concordancia
AB014385	C		C	Concordancia
AB014394	C		C	Concordancia
AB014395	C		C	Concordancia
AB036913	F	F	F	Concordancia
AB032433	G		Chimpancé	FALSO
AB033550	C		C	Concordancia
X98077	B		B	Concordancia
AB036915	F	F	F	Concordancia
AB036918	F	F	F	Concordancia
AB042282	C		C	Concordancia
AB048701	D		D	Concordancia
AB048703	D		D	Concordancia
AB050018	C		C	Concordancia
AB056514	G		G	Concordancia
AB073830	B		B	Concordancia
AB073834	B		B	Concordancia
AB073839	B		B	Concordancia
AF068756	C		C	Concordancia
AF121243	B		B	Concordancia
AF151735	D		D	Concordancia
AF223954	C		C	Concordancia
AF223956	C		C	Concordancia
AF223959	C		C	Concordancia
AF223960	C		C	Concordancia
AF223961	C		C	Concordancia
AF241409	G		C con algode A	FALSO
AF297620	A		A	Concordancia
AF297623	A		A	Concordancia
AF305327	G		Chimpancé	FALSO
AF411411	C		C	Concordancia
AF462041	A		A	Concordancia
AJ131956	D		D	Concordancia
AJ309369	A	A	A	Concordancia

AY033072	B		B	Concordancia
AY077735	G		Gibon	FALSO
D50519	C		C	Concordancia
M54923	B		B	Concordancia
U95551	D		D	Concordancia
X02763	A		A	Concordancia
X14193	C		C	Concordancia
X75656	C	C	C	Concordancia
X97850	B		B	Concordancia
AB036914	F	F	F	Concordancia
M38454	C		C	Concordancia

Anexo II

Secuencia del gen S de la muestra de genotipo G alineada con las secuencias consideradas representativas de cada genotipo.

81 gen S	1	10	20	30	40	50	60	70
AB064313.gen S	ATGGGAAACA	TCACATCAGG	ATTCCTAGGA	CCCCGTGCTCG	TGTTACAGGC	GGGGTTTTTC	TTGTTGACAA	
HBV A V00866	ATGGGAAACA	TCACATCAGG	ATTCCTAGGA	CCCCGTGCTCG	TGTTACAGGC	GGGGTTTTTC	TTGTTGACAA	
HBV B D23679	ATGGGAAACA	TCACATCAGG	ATTCCTAGGA	CCCCGTGCTCG	TGTTACAGGC	GGGGTTTTTC	TTGTTGACAA	
HBV C V00867	ATGGGAAACA	TCACATCAGG	ATTCCTAGGA	CCCCGTGCTCG	TGTTACAGGC	GGGGTTTTTC	TTGTTGACAA	
HBV D J02203	ATGGGAAACA	TCACATCAGG	ATTCCTAGGA	CCCCGTGCTCG	TGTTACAGGC	GGGGTTTTTC	TTGTTGACAA	
HBV F X75663	ATGGGAAACA	TCACATCAGG	ATTCCTAGGA	CCCCGTGCTCG	TGTTACAGGC	GGGGTTTTTC	TTGTTGACAA	
HBV E X75664	ATGGGAAACA	TCACATCAGG	ATTCCTAGGA	CCCCGTGCTCG	TGTTACAGGC	GGGGTTTTTC	TTGTTGACAA	
81 gen S	80	90	100	110	120	130	140	
AB064313.gen S	GAAATCCTCAC	AATACCCGAC	AGTCTAGACT	CGTGGTGGAC	TTCTCTCAAT	TTTCTAGGGG	GAGTGCCCGT	
HBV A V00866	GAAATCCTCAC	AATACCCGAC	AGTCTAGACT	CGTGGTGGAC	TTCTCTCAAT	TTTCTAGGGG	GAGTGCCCGT	
HBV B D23679	GAAATCCTCAC	AATACCCGAC	AGTCTAGACT	CGTGGTGGAC	TTCTCTCAAT	TTTCTAGGGG	GAGTGCCCGT	
HBV C V00867	GAAATCCTCAC	AATACCCGAC	AGTCTAGACT	CGTGGTGGAC	TTCTCTCAAT	TTTCTAGGGG	GAGTGCCCGT	
HBV D J02203	GAAATCCTCAC	AATACCCGAC	AGTCTAGACT	CGTGGTGGAC	TTCTCTCAAT	TTTCTAGGGG	GAGTGCCCGT	
HBV F X75663	GAAATCCTCAC	AATACCCGAC	AGTCTAGACT	CGTGGTGGAC	TTCTCTCAAT	TTTCTAGGGG	GAGTGCCCGT	
HBV E X75664	GAAATCCTCAC	AATACCCGAC	AGTCTAGACT	CGTGGTGGAC	TTCTCTCAAT	TTTCTAGGGG	GAGTGCCCGT	
81 gen S	150	160	170	180	190	200	210	
AB064313.gen S	GTGTCTTGGC	CTAAAATTCGC	AGTCCCCAAAC	CTCCAATCAC	TCACCAATCT	CCTGTCTCTC	AACCTTGCTCT	
HBV A V00866	GTGTCTTGGC	CTAAAATTCGC	AGTCCCCAAAC	CTCCAATCAC	TCACCAATCT	CCTGTCTCTC	AACCTTGCTCT	
HBV B D23679	GTGTCTTGGC	CTAAAATTCGC	AGTCCCCAAAC	CTCCAATCAC	TCACCAATCT	CCTGTCTCTC	AACCTTGCTCT	
HBV C V00867	GTGTCTTGGC	CTAAAATTCGC	AGTCCCCAAAC	CTCCAATCAC	TCACCAATCT	CCTGTCTCTC	AACCTTGCTCT	
HBV D J02203	GTGTCTTGGC	CTAAAATTCGC	AGTCCCCAAAC	CTCCAATCAC	TCACCAATCT	CCTGTCTCTC	AACCTTGCTCT	
HBV F X75663	GTGTCTTGGC	CTAAAATTCGC	AGTCCCCAAAC	CTCCAATCAC	TCACCAATCT	CCTGTCTCTC	AACCTTGCTCT	
HBV E X75664	GTGTCTTGGC	CTAAAATTCGC	AGTCCCCAAAC	CTCCAATCAC	TCACCAATCT	CCTGTCTCTC	AACCTTGCTCT	
81 gen S	220	230	240	250	260	270	280	
AB064313.gen S	GGCTATCGCT	GGATGTGTCT	GCGGCGTTTT	ATCATATTCC	TCCTCATCCT	GCTGCTATGC	CTCATCTTCT	
HBV A V00866	GGCTATCGCT	GGATGTGTCT	GCGGCGTTTT	ATCATATTCC	TCCTCATCCT	GCTGCTATGC	CTCATCTTCT	
HBV B D23679	GGCTATCGCT	GGATGTGTCT	GCGGCGTTTT	ATCATATTCC	TCCTCATCCT	GCTGCTATGC	CTCATCTTCT	
HBV C V00867	GGCTATCGCT	GGATGTGTCT	GCGGCGTTTT	ATCATATTCC	TCCTCATCCT	GCTGCTATGC	CTCATCTTCT	
HBV D J02203	GGCTATCGCT	GGATGTGTCT	GCGGCGTTTT	ATCATATTCC	TCCTCATCCT	GCTGCTATGC	CTCATCTTCT	
HBV F X75663	GGCTATCGCT	GGATGTGTCT	GCGGCGTTTT	ATCATATTCC	TCCTCATCCT	GCTGCTATGC	CTCATCTTCT	
HBV E X75664	GGCTATCGCT	GGATGTGTCT	GCGGCGTTTT	ATCATATTCC	TCCTCATCCT	GCTGCTATGC	CTCATCTTCT	
81 gen S	290	300	310	320	330	340	350	
AB064313.gen S	TGTTGGTTCT	TCTGGACTAT	CAAGGTATGT	TGCCCGTTTT	TCCTCTGATT	CCAGGATCTC	CGACCAACCAG	
HBV A V00866	TGTTGGTTCT	TCTGGACTAT	CAAGGTATGT	TGCCCGTTTT	TCCTCTGATT	CCAGGATCTC	CGACCAACCAG	
HBV B D23679	TGTTGGTTCT	TCTGGACTAT	CAAGGTATGT	TGCCCGTTTT	TCCTCTGATT	CCAGGATCTC	CGACCAACCAG	
HBV C V00867	TGTTGGTTCT	TCTGGACTAT	CAAGGTATGT	TGCCCGTTTT	TCCTCTGATT	CCAGGATCTC	CGACCAACCAG	
HBV D J02203	TGTTGGTTCT	TCTGGACTAT	CAAGGTATGT	TGCCCGTTTT	TCCTCTGATT	CCAGGATCTC	CGACCAACCAG	
HBV F X75663	TGTTGGTTCT	TCTGGACTAT	CAAGGTATGT	TGCCCGTTTT	TCCTCTGATT	CCAGGATCTC	CGACCAACCAG	
HBV E X75664	TGTTGGTTCT	TCTGGACTAT	CAAGGTATGT	TGCCCGTTTT	TCCTCTGATT	CCAGGATCTC	CGACCAACCAG	
81 gen S	360	370	380	390	400	410	420	
AB064313.gen S	TACGGGACCC	TGCCAAAACCT	GCACGACTCT	TGCTCAAGGC	AACTCTATGT	ATCCCTCATG	TTGCTGTACA	
HBV A V00866	TACGGGACCC	TGCCAAAACCT	GCACGACTCT	TGCTCAAGGC	AACTCTATGT	ATCCCTCATG	TTGCTGTACA	
HBV B D23679	TACGGGACCC	TGCCAAAACCT	GCACGACTCT	TGCTCAAGGC	AACTCTATGT	ATCCCTCATG	TTGCTGTACA	
HBV C V00867	TACGGGACCC	TGCCAAAACCT	GCACGACTCT	TGCTCAAGGC	AACTCTATGT	ATCCCTCATG	TTGCTGTACA	
HBV D J02203	TACGGGACCC	TGCCAAAACCT	GCACGACTCT	TGCTCAAGGC	AACTCTATGT	ATCCCTCATG	TTGCTGTACA	
HBV F X75663	TACGGGACCC	TGCCAAAACCT	GCACGACTCT	TGCTCAAGGC	AACTCTATGT	ATCCCTCATG	TTGCTGTACA	
HBV E X75664	TACGGGACCC	TGCCAAAACCT	GCACGACTCT	TGCTCAAGGC	AACTCTATGT	ATCCCTCATG	TTGCTGTACA	
81 gen S	430	440	450	460	470	480	490	
AB064313.gen S	AAACCTTCGG	ACGGAAATTG	CACCTGTATT	CCCATCCCAT	CATCTTGGGC	TTTCGCAAAA	TACCTATGGG	
HBV A V00866	AAACCTTCGG	ACGGAAATTG	CACCTGTATT	CCCATCCCAT	CATCTTGGGC	TTTCGCAAAA	TACCTATGGG	
HBV B D23679	AAACCTTCGG	ACGGAAATTG	CACCTGTATT	CCCATCCCAT	CATCTTGGGC	TTTCGCAAAA	TACCTATGGG	
HBV C V00867	AAACCTTCGG	ACGGAAATTG	CACCTGTATT	CCCATCCCAT	CATCTTGGGC	TTTCGCAAAA	TACCTATGGG	
HBV D J02203	AAACCTTCGG	ACGGAAATTG	CACCTGTATT	CCCATCCCAT	CATCTTGGGC	TTTCGCAAAA	TACCTATGGG	
HBV F X75663	AAACCTTCGG	ACGGAAATTG	CACCTGTATT	CCCATCCCAT	CATCTTGGGC	TTTCGCAAAA	TACCTATGGG	
HBV E X75664	AAACCTTCGG	ACGGAAATTG	CACCTGTATT	CCCATCCCAT	CATCTTGGGC	TTTCGCAAAA	TACCTATGGG	
81 gen S	500	510	520	530	540	550	560	
AB064313.gen S	AGTGGGCCCTC	AGTCCGTTTT	TCTTGGCTCA	GTTTACTAGT	GCCATTTGTT	CAGTGGTTCC	TAGGGGTTTT	
HBV A V00866	AGTGGGCCCTC	AGTCCGTTTT	TCTTGGCTCA	GTTTACTAGT	GCCATTTGTT	CAGTGGTTCC	TAGGGGTTTT	
HBV B D23679	AGTGGGCCCTC	AGTCCGTTTT	TCTTGGCTCA	GTTTACTAGT	GCCATTTGTT	CAGTGGTTCC	TAGGGGTTTT	
HBV C V00867	AGTGGGCCCTC	AGTCCGTTTT	TCTTGGCTCA	GTTTACTAGT	GCCATTTGTT	CAGTGGTTCC	TAGGGGTTTT	
HBV D J02203	AGTGGGCCCTC	AGTCCGTTTT	TCTTGGCTCA	GTTTACTAGT	GCCATTTGTT	CAGTGGTTCC	TAGGGGTTTT	
HBV F X75663	AGTGGGCCCTC	AGTCCGTTTT	TCTTGGCTCA	GTTTACTAGT	GCCATTTGTT	CAGTGGTTCC	TAGGGGTTTT	
HBV E X75664	AGTGGGCCCTC	AGTCCGTTTT	TCTTGGCTCA	GTTTACTAGT	GCCATTTGTT	CAGTGGTTCC	TAGGGGTTTT	
81 gen S	570	580	590	600	610	620	630	
AB064313.gen S	CCCCACTGTCT	TGGCTTTTCA	CTATATGGAT	GATGTGGTAT	TGGGGGCCAA	ATCTGTACAA	CATCTTGAGT	
HBV A V00866	CCCCACTGTCT	TGGCTTTTCA	CTATATGGAT	GATGTGGTAT	TGGGGGCCAA	ATCTGTACAA	CATCTTGAGT	
HBV B D23679	CCCCACTGTCT	TGGCTTTTCA	CTATATGGAT	GATGTGGTAT	TGGGGGCCAA	ATCTGTACAA	CATCTTGAGT	
HBV C V00867	CCCCACTGTCT	TGGCTTTTCA	CTATATGGAT	GATGTGGTAT	TGGGGGCCAA	ATCTGTACAA	CATCTTGAGT	
HBV D J02203	CCCCACTGTCT	TGGCTTTTCA	CTATATGGAT	GATGTGGTAT	TGGGGGCCAA	ATCTGTACAA	CATCTTGAGT	
HBV F X75663	CCCCACTGTCT	TGGCTTTTCA	CTATATGGAT	GATGTGGTAT	TGGGGGCCAA	ATCTGTACAA	CATCTTGAGT	
HBV E X75664	CCCCACTGTCT	TGGCTTTTCA	CTATATGGAT	GATGTGGTAT	TGGGGGCCAA	ATCTGTACAA	CATCTTGAGT	
81 gen S	640	650	660	670	680	690	700	
AB064313.gen S	CCCTTTATAC	CGCTGTACC	AATTTTCTTT	TGCTTTTGGG	TATACATCTA	A		
HBV A V00866	CCCTTTATAC	CGCTGTACC	AATTTTCTTT	TGCTTTTGGG	TATACATCTA	A		
HBV B D23679	CCCTTTATAC	CGCTGTACC	AATTTTCTTT	TGCTTTTGGG	TATACATCTA	A		
HBV C V00867	CCCTTTATAC	CGCTGTACC	AATTTTCTTT	TGCTTTTGGG	TATACATCTA	A		
HBV D J02203	CCCTTTATAC	CGCTGTACC	AATTTTCTTT	TGCTTTTGGG	TATACATCTA	A		
HBV F X75663	CCCTTTATAC	CGCTGTACC	AATTTTCTTT	TGCTTTTGGG	TATACATCTA	A		
HBV E X75664	CCCTTTATAC	CGCTGTACC	AATTTTCTTT	TGCTTTTGGG	TATACATCTA	A		

Anexo III. Secuencia del gen S del aislado correspondiente al genotipoG publicada en el GenBank.

LOCUS AY168428 681 bp DNA linear VRL 21-DEC-2002
 DEFINITION Hepatitis B virus isolate ST81 surface protein Ag-HBs (S) gene, complete cds.
 ACCESSION AY168428
 VERSION AY168428.1 GI:27357186
 KEYWORDS .
 SOURCE Hepatitis B virus
 ORGANISM Hepatitis B virus
 Viruses; Retroid viruses; Hepadnaviridae;
 Orthohepadnavirus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 681)
 AUTHORS Rodriguez-Novoa,S.M., Aguilera,A. and Regueiro,B.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (23-OCT-2002) Microbiologia, Hospital Provincial, Ramon Baltar/sn, Santiago de Compostela, Spain
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..681
 /organism="Hepatitis B virus"
 /isolate="ST81"
 /db_xref="taxon:10407"
 /country="Spain"
 /note="genotype: G"
 gene 1..681
 /gene="S"
 CDS 1..681
 /gene="S"
 /codon_start=1
 /product="surface protein Ag-HBs"
 /protein_id="AAN86638.1"
 /db_xref="GI:27357187"
 /translation="MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGG
 VPVCPGLNSQSPTS NHSPISCPPTCPGYRWMCLRRFIIIFL FILLCLIFLLVLLDYQG
 MLPVCPLIPGSSTTSTGPCKTCTTPAQGNSMYPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFK
 YLWEWASVRF SWLSLLVPFVQWVGLSPTVWLSAIWMMWYGP NLYNILSPFIPLLPI
 FFCLWVYI "
 BASE COUNT 132 a 188 c 143 g 218 t
 ORIGIN
 1 atggagaaca tcacatcagg attcctagga cccctgctcg tgttacaggc ggggtttttc
 61 ttgttgacaa gaatcctcac aataccgcag agtctagact cgtggtggac ttctctcaat
 121 tttctagggg gagtgcccgt gtgtcctggc ctaaattcgc agtccccaac ctccaatcac
 181 tcaccaatct cctgtcctcc aacttgtcct ggctatcgct ggatgtgtct gcggcgtttt
 241 atcatattcc tcttcaccc tctgtctatgc ctcatcttct tgttggttct tctggactat
 301 caaggtatgt tgcccgtttg tccctctgatt ccaggatcct cgaccaccag tacgggaccc
 361 tgcaaaacct gcacgactcc tgctcaaggc aactctatgt atccctcatg ttgctgtaca
 421 aaaccttcgg acggaaattg cacctgtatt cccatcccat catcttgggc tttcgcaaaa
 481 tacctatggg agtgggcctc agtccgtttc tcttggtca gtttactagt gccatttgtt
 541 cagtggttcg tagggctttc ccccactgtc tggctttcag ctatatggat gatgtgggat
 601 tgggggcca atctgtacaa catcttgagt ccctttatac cgctgttacc aattttcttt
 661 tgtctttggg tatacatcta a
 //

```

LOCUS      AY168427  681 bp DNA linear VRL 21-DEC-2002
DEFINITION Hepatitis B virus isolate ST21 surface protein Ag-HBs (S)
gene,complete cds.
ACCESSION  AY168427
VERSION    AY168427.1  GI:27357184
KEYWORDS   .
SOURCE     Hepatitis B virus
  ORGANISM Hepatitis B virus
            Viruses; Retroid viruses; Hepadnaviridae;
            Orthohepadnavirus.
REFERENCE  1 (bases 1 to 681)
  AUTHORS  Rodriguez-Novoa,S.M., Aguilera,A. and Regueiro,B.
  TITLE    Direct Submission
  JOURNAL  Submitted (22-OCT-2002) Microbiologia, Hospital
  Provincial, Ramon
            Baltar/sn, Santiago de Compostela, Spain
FEATURES   Location/Qualifiers
  source   1..681
            /organism="Hepatitis B virus"
            /mol_type="genomic DNA"
            /isolate="ST21"
            /db_xref="taxon:10407"
            /note="genotype: A"
  gene    1..681
            /gene="S"
  CDS    1..681
            /gene="S"
            /codon_start=1
            /product="surface protein Ag-HBs"
            /protein_id="AAN86637.1"
            /db_xref="GI:27357185"

/translation="MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGG
PPVCLGQNSQSPTSNSHPTSCPPICPGYRWMCLRRFIIIFLIFLLLCLIFLLVLLDYQG
MLPVCPLIPGSTTTSTGPCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTDGNCTCIPIPSSWAFAK
YLWEWASVRFWSLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSAMWMIWYWGPSLYSIVSPFIPLLP
FFCLWVYI"
BASE COUNT      138 a      183 c      142 g      218 t
ORIGIN
   1 atggagaaca tcacatcagg attcctagga ccctgctcg tgttacaggc ggggtttttc
  61 ttgttgacia gaatcctcac aataccgcag agtctagact cgtggtggac ttctctcaat
 121 tttctagggg gaccaccgtg gtgtcttggc caaaattcgc agtccccaac ctccaatcac
 181 tcaccaacct cctgtcctcc aatttgtcct ggttatcgct ggatgtgtct gcggcgtttt
 241 atcatattcc tcttcatcct gctgctatgc ctcatcttct tattggttct tctggattat
 301 caaggtatgt tgcccgtttg tcctctaatt ccaggatcaa caacaaccag tacgggacca
 361 tgcaaaacct gcacgactcc tgctcaaggc aactctatgt ttccctcatg ttgctgtaca
 421 aaacctacgg atggaaattg cacctgtatt cccatcccat cgtcctgggc tttcgcaaaa
 481 tacctatggg agtgggcctc agtccgtttc tcatggctca gtttactagt gccatttgtt
 541 cagtggttcg tagggctttc cccactgtt tggctttcag ctatgtggat gatttggtat
 601 tgggggcaaa gtctgtacag catcgtgagt ccctttatac cgctgttacc aattttcttt
 661 tgtctctggg tatacattta a
//

```

