



ARTÍCULO ORIGINAL

## Variabilidad genética en regiones codificantes del antígeno de superficie y el dominio de la transcriptasa inversa de la polimerasa del virus de la hepatitis B, Colombia, 2002-2014

Dioselina Peláez-Carvajal<sup>1</sup>, Nidia Janeth Forero<sup>1,2</sup>, Martha Escalante-Mora<sup>1</sup>,  
Katherine Laiton-Donato<sup>1</sup>, José Aldemar Usme-Ciro<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Virología, Subdirección de Laboratorio Nacional de Referencia, Dirección de Redes en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

<sup>2</sup> Grupo de Virología, Universidad El Bosque, Bogotá, D.C., Colombia

<sup>3</sup> Centro de Investigación en Salud para el Trópico, Facultad de Medicina, Universidad Cooperativa de Colombia, Santa Marta, Colombia

**Introducción.** Se estima que 240 millones de personas en el mundo tienen infección crónica con el virus de la hepatitis B (HBV). En Colombia, la endemia es variable y circulan diferentes genotipos virales. Las mutaciones a lo largo del genoma se han asociado con resistencia antiviral, el escape ante la reacción de anticuerpos neutralizadores tras la vacunación o a la infección natural, la infección oculta y la progresión a carcinoma hepatocelular.

**Objetivo.** Identificar los genotipos y las mutaciones presentes en la región codificante del antígeno de superficie (S) y del dominio de la transcriptasa inversa (*reverse transcriptase*, RT) de la polimerasa del HBV en muestras de suero remitidas al Instituto Nacional de Salud de Colombia para el diagnóstico de hepatitis B, entre el 2002 y el 2014.

**Materiales y métodos.** En 495 muestras de suero positivas para el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) se buscó el ADN viral, se amplificó y secuenció un fragmento de 1.591 nucleótidos y, posteriormente, se hizo el análisis filogenético correspondiente.

**Resultados.** En 66 de las muestras se logró detectar el genoma viral y 28 de ellas se secuenciaron exitosamente. El análisis filogenético permitió identificar los genotipos y subgenotipos F3 y A2. Una muestra presentó simultáneamente las sustituciones de resistencia L180M y M204V, otra presentó la sustitución I169L y en una se identificó la mutación P120Q, previamente asociada con variantes de escape. Dos muestras presentaron una delección de 105 nucleótidos en la región preS1-preS2.

**Conclusiones.** Se corroboró la circulación en Colombia de los genotipos y subgenotipos F3 y A2, así como la presencia de mutaciones de resistencia y escape. El presente estudio constituye un aporte a la epidemiología molecular del HBV en Colombia.

**Palabras clave:** virus de la hepatitis B; genotipo; ADN polimerasa dirigida por ARN; mutación.

doi: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i3.3871>

### Genetic variability in coding regions of the surface antigen and reverse transcriptase domain of hepatitis B virus polymerase, Colombia, 2002-2014

**Introduction:** Despite the availability of an effective vaccine and treatment to reduce the viral load and progressive hepatocellular injury, approximately 240 million people worldwide are chronically infected with the hepatitis B virus (HBV). In Colombia, the circulation of different viral genotypes has been confirmed. Mutations in the genome have been associated to antiviral therapy resistance, viral escape to neutralizing antibodies, occult infection and progression to hepatocellular carcinoma.

**Objective:** To identify the genotypes and the presence of mutations in the coding region of the surface (S) antigen and the reverse transcriptase (RT) domain of the polymerase of HBV obtained from serum samples for hepatitis B diagnosis received by the *Instituto Nacional de Salud* during the period 2002-2014.

**Materials and methods:** A total of 495 serum samples with previous HBsAg reactive result were used for molecular detection. A fragment of 1,591 nucleotides was sequenced, and the corresponding phylogenetic analysis was performed.

#### Contribución de los autores:

Dioselina Peláez-Carvajal: diseño del estudio y redacción del manuscrito

Nidia Janeth Forero: detección y análisis molecular

Martha Escalante-Mora: ensayos serológicos

José Aldemar Usme-Ciro: análisis molecular y redacción del manuscrito

Katherine Laiton-Donato: secuenciación y edición de secuencias

Todos los autores participaron en la interpretación y la discusión de los resultados.

**Results:** We detected the viral genome of HBV in 66 samples and 28 were successfully sequenced. The phylogenetic analysis allowed the identification of subgenotypes F3 and A2. The L180M and M204V resistance mutations were simultaneously identified in one sample, while the I169L resistance mutation was identified in another one. A single escape mutation, P120Q, was identified in one more. Two samples showed a deletion of 105 nucleotides in the preS1-preS2 region.

**Conclusions:** The circulation of genotypes/subgenotypes F3 and A2 of HBV in Colombia was corroborated, as well as the presence of some resistance and escape mutations. The present study constitutes a contribution to the molecular epidemiology of HBV in Colombia.

**Key words:** Hepatitis B virus; genotype; RNA-directed DNA polymerase; mutation.

doi: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i3.3871>

La hepatitis B constituye una de las hepatitis virales más importantes en salud pública por estar relacionada en su fase crónica con el desarrollo de cirrosis y carcinoma hepatocelular (1). La proporción de individuos adultos cuya infección aguda por HBV progresa a la fase crónica es de 5 a 10 %, en tanto que en niños menores de cinco años la proporción es de 25 a 30% y, en recién nacidos, hasta de 90 % (2).

A nivel mundial, se estima que, aproximadamente, 240 millones de personas presentan infección crónica y más de 686.000 mueren cada año como consecuencia de la enfermedad y sus complicaciones (3). La seroprevalencia de hepatitis B en Latinoamérica es de 0,48 %, aproximadamente, y en Colombia se estima en 2,29 % (4). En el 2016, se notificaron 1.967 casos de hepatitis B al sistema nacional de vigilancia epidemiológica (Sivigila), 42 % de los cuales provenía de Antioquia, Bogotá y Norte de Santander; la incidencia nacional de hepatitis B fue de cuatro casos por cada 100.000 habitantes (5). Con un patrón epidemiológico heterogéneo debido a las diferencias geográficas, étnicas, culturales y socioeconómicas, se considera que el país tiene una endemia de baja a intermedia (6), aunque en algunos departamentos, entre ellos Amazonas, Chocó, Guaviare, Magdalena y Norte de Santander, es alta (7-9).

El virus de la hepatitis B (HBV) pertenece a la familia Hepadnaviridae, género *Orthohepadnavirus*, su genoma es una molécula de ADN circular, parcialmente de doble hebra y de 3,2 kb, aproximadamente, constituido por marcos de lectura parcialmente superpuestos que codifican para las

proteínas preCore/Core, preS1/preS2/S, polimerasa y X (10). El análisis filogenético de las cepas del HBV circulantes a nivel mundial ha permitido la identificación de 10 genotipos (A-J) con una divergencia en la secuencia genómica mayor de 8 %, y la asignación de más de 30 subgenotipos definidos como aquellos linajes conformados por cepas con una divergencia de nucleótidos de 4 a 8 % (11,12). En Colombia, se ha reportado la circulación de los genotipos y subgenotipos A1, A2, C, D3, E, F1a, F1b, F3 y G (6,8,13-19), siendo el genotipo F el de mayor prevalencia en Suramérica (12).

Aunque la progresión y la gravedad de la hepatitis B responden a múltiples factores, los estudios epidemiológicos han permitido establecer asociaciones entre los diferentes genotipos y variables tales como las vías de transmisión, la progresión a la fase crónica de la enfermedad, el tiempo de progresión y la gravedad de la enfermedad (20).

Por otro lado, diversos estudios han permitido la identificación de mutaciones puntuales en el dominio de la transcriptasa inversa (*reverse transcriptase*, RT) del HBV que confieren resistencia a los principales medicamentos antivirales disponibles: lamivudina (3TC), entecavir (ETV), telbivudina (LdT), adefovir (ADV) y tenofovir (TDF) (21). Asimismo, se han identificado mutaciones puntuales y deleciones en las regiones S, preS1 y preS2 del gen de la envoltura del HBV, las cuales se han asociado con la presentación clínica de la enfermedad (22), con la neutralización a cargo de anticuerpos generados tras la vacunación o como resultado de una infección natural (23), o de casos de infección oculta por HBV (24), así como con la sensibilidad de los inmunoensayos utilizados para el diagnóstico serológico (25).

En el presente estudio, se llevó a cabo la detección molecular, la genotipificación y la identificación de mutaciones en las regiones codificantes del antígeno S y el dominio RT de la polimerasa del HBV a partir de 495 muestras de suero con

Correspondencia:

Dioselina Peláez-Carvajal, Laboratorio de Virología, Subdirección de Laboratorio Nacional de Referencia, Dirección de Redes en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Avenida calle 26 N° 51-20, Bogotá, D.C., Colombia  
Telefax:(571) 220 0770, extensión: 1428  
dpelaez@ins.gov.co

Recibido: 07/04/17; aceptado: 07/12/17

resultado positivo para HBsAg provenientes de los 32 departamentos de Colombia, las cuales se recibieron para diagnóstico de hepatitis B en el Laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Salud, durante el periodo 2002-2014.

**Materiales y métodos**

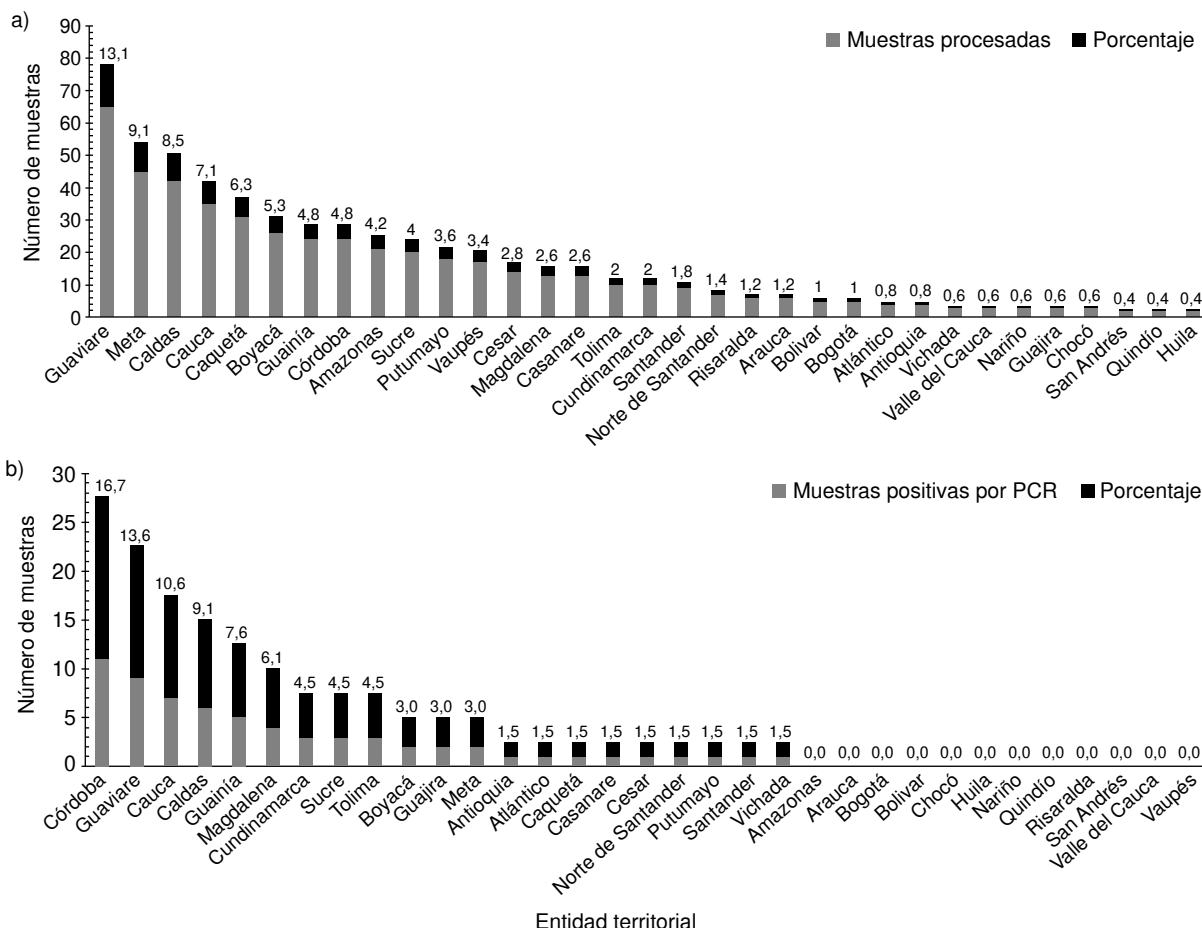
**Muestras clínicas**

Se hizo un estudio descriptivo, longitudinal y retrospectivo, de 495 muestras de sueros provenientes de 32 departamentos del país y de Bogotá, conservadas en congelación entre los -20 °C y los -30 °C en la seroteca del Grupo de Virología del Instituto Nacional de Salud para el diagnóstico de hepatitis B, y recolectadas durante el periodo 2002-2014 (figura 1a). Se seleccionaron muestras con resultado positivo en la prueba ELISA para el antígeno de superficie de HBV (HBsAg), no necesariamente confirmado mediante prueba de neutralización.

**Extracción del ADN viral y amplificación de las regiones codificantes del antígeno S y del dominio RT de la polimerasa del HBV mediante PCR**

Para la extracción del ADN viral, y ante la eventual necesidad de detectar virus con genoma de ARN (virus de hepatitis A, C, delta y E), se utilizó el estuche PureLink Viral RNA/DNA Mini Kit™ (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la amplificación y secuenciación de las regiones codificantes del antígeno S y del dominio RT de la polimerasa del HBV, se utilizaron los oligonucleótidos externos HBPr1\_Sense 5'-gggt caccatattcttggg-3' y HBPr374\_Antisense 5'-gtcc gcagatggatcgccagagg-3', previamente descritos por Stuyver, *et al.* (26), los cuales se extienden desde la posición 2816-3182...1-1281 del genoma de referencia, número de acceso en GenBank: NC\_003977.2.



**Figura 1.** Muestras procesadas mediante PCR y positivas para HBV, según departamento, 2002-2014. a) Distribución de muestras analizadas según ente territorial. b) Distribución de muestras positivas en la PCR para los genes P (parcial) y S del HBV

La mezcla de reacción para la PCR incluyó 10 pmoles de cada oligonucleótido, 1,35 U de Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity™ (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), 60 mM de Tris-SO<sub>4</sub> (pH 8,9), 18 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2,4 mM de MgSO<sub>4</sub>, 480 nM de cada dNTP, 5 µl del extracto de ADN viral y agua libre de nucleasas, para un volumen final de 25 µl.

El perfil térmico consistió en una desnaturalización inicial a 94 °C durante dos minutos, seguida de 35 ciclos de amplificación (a 94 °C durante 30 segundos, a 50 °C durante 30 segundos, a 72 °C durante dos minutos) y una extensión final a 72 °C durante cinco minutos.

Los amplicones esperados, de 1.648 pb, aproximadamente, se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % en TAE 1X, se tiñeron con SYBR Safe DNA Gel Stain™ (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) y se visualizaron mediante el fotodocumentador GelDoc XR™ (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

### **Secuenciación, edición de secuencias y análisis filogenético**

Los productos de PCR positivos para ADN del HBV se purificaron utilizando el estuche QIAquick PCR Purification Kit™ (QIAGEN Inc, Valencia, CA, USA) y se secuenciaron usando el estuche BigDye Terminator, versión 3.1, Cycle Sequencing Kit™ (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), según las instrucciones del fabricante.

La secuenciación se llevó a cabo en un Genetic Analyzer ABI 3130™ (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Las secuencias obtenidas se visualizaron, editaron y ensamblaron mediante el módulo SeqMan de la suite Lasergene, versión 7.2.1™ (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) y, posteriormente, se alinearon empleando el algoritmo ClustalW con el programa MEGA 6.0 (27). Se incluyeron secuencias disponibles en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) pertenecientes a los diferentes genotipos y subtipos del HBV humano, así como el máximo número de secuencias colombianas previamente reportadas y con la longitud genómica requerida para estos análisis y, además, una secuencia de HBV derivada del mono lanudo como grupo externo (número de acceso en GenBank: AY226578).

Para la reconstrucción del árbol filogenético, se generaron dos matrices: la primera, para analizar la longitud máxima del genoma, se extendía entre las posiciones 2858-3182...1-1266 (1.591 pb).

y la segunda, para incluir el máximo número de secuencias colombianas previamente reportadas, se extendía entre las posiciones 281 y 657 (377 pb) del genoma circular de referencia NC\_003977.2. Para cada matriz se seleccionó el modelo evolutivo que mejor se ajustara a los datos, utilizando el programa jModelTest (28).

El análisis filogenético se hizo con el programa MEGA 6.0 y el método de *neighbor-joining*. El soporte de la topología del árbol se obtuvo mediante un proceso de *bootstrap* de 1.000 réplicas.

### **Análisis de mutaciones de resistencia a medicamentos antivirales y de escape**

Para la determinación del impacto de las diferentes mutaciones presentes en las secuencias del HBV circulantes en el país, se emplearon dos herramientas bioinformáticas disponibles en línea: la *HIV-grade HBV drug resistance interpretation* (DRI) (29) y la *Geno2pheno* [HBV] (G2P) (30), las cuales permiten determinar el genotipo viral, identificar las mutaciones en la región codificante del dominio RT de la polimerasa viral asociadas con resistencia a fármacos e identificar mutaciones en el marco de lectura abierto (*Open Reading Frame*, ORF) del gen que codifica para el antígeno S pequeño (S-HBsAg), previamente asociadas con escape por disminución de la unión al anticuerpo.

La DRI y la G2P se encuentran disponibles en los enlaces: [http://www.hiv-grade.de/hbv\\_grade/deployed/grade.pl?program=hbvalg](http://www.hiv-grade.de/hbv_grade/deployed/grade.pl?program=hbvalg) y <http://hbv.geno2pheno.org/>, respectivamente.

## **Resultados**

### **Distribución de las muestras por departamento**

En el estudio se incluyeron 495 muestras de sueros con resultado positivo para HBsAg, lo cual permitió tener una representación de las diferentes regiones de Colombia (figura 1a), con un mínimo de dos y un máximo de 65 sueros provenientes de cada una de las 33 entidades territoriales, incluida Bogotá. Sin embargo, la incidencia del HBV reportada por año epidemiológico por las distintas entidades territoriales, es diferente al número de muestras recibidas en el Instituto Nacional de Salud, ya que la remisión de muestras depende de la capacidad de diagnóstico de cada departamento y del nivel de referencia que registran frente al Instituto.

### **Caracterización molecular de genotipos y subgenotipos circulantes del HBV en Colombia**

Mediante amplificación por PCR convencional de 66 muestras (13,3 % del total de las muestras

procesadas) provenientes de 21 unidades territoriales del país, se obtuvo un fragmento de banda única y del tamaño esperado correspondiente al ORF S y, región codificante del dominio RT de la polimerasa del HBV. Los departamentos de Córdoba, Guaviare, Cauca, Caldas, Guainía y Magdalena, presentaron la mayor positividad, contribuyendo en conjunto con el 63,6 % de las muestras positivas mediante detección molecular (figura 1b).

Del total de muestras amplificadas por PCR, 28 (42,4 %) se secuenciaron y, mediante el análisis filogenético, se identificaron los genotipos A y F, cuyos subgenotipos fueron el A2 y el F3, respectivamente (figura 2). De las 28 secuencias, 24 (85,7 %) correspondieron al genotipo F y 4 (14,3 %) al genotipo A, similar a lo reportado para el país en estudios previos (7,13,19). El análisis filogenético mediante la matriz 1 con secuencias de longitud de 1.591 pb, permitió la identificación confiable de los subgenotipos.

Todas las secuencias de HBV de genotipo F identificadas en el presente estudio, pertenecían al subgenotipo F3 con una gran confiabilidad (soporte en el proceso de *bootstrap* de 92 %). De igual forma, todas las secuencias del HBV, genotipo A, identificadas pertenecían al subgenotipo A2, con una gran confiabilidad (soporte en el proceso de *bootstrap* de 99 %), similar a lo previamente reportado (16).

Con base en la región genómica representada por la matriz 1, cuyos sitios variables se muestran en la figura 3, se estimó la divergencia evolutiva promedio del HBV entre cada par de cepas colombianas de los subgenotipos A2 (0,003 sustituciones por sitio) y F3 (0,007 sustituciones por sitio) y entre dichos subgenotipos (0,162 sustituciones por sitio entre cada par de cepas colombianas). No se identificaron secuencias pertenecientes a los genotipos C, D, E y G, que previamente habían sido reportados en el país (16).

Teniendo en cuenta que las secuencias disponibles pertenecientes a dichos genotipos no fueron lo suficientemente extensas o no correspondían completamente a la región secuenciada en el presente estudio (matriz 1), se generó una segunda matriz (matriz 2), con el fin de establecer las relaciones filogenéticas y obtener un panorama completo de los genotipos que han circulado en el país (figura 4). En este árbol filogenético se pueden observar los diferentes genotipos representados; sin embargo, en general, no fue posible establecer

subgenotipos debido a los bajos soportes en el *bootstrap*, resultantes del análisis de un fragmento corto con una menor cantidad de sitios informativos a nivel filogenético.

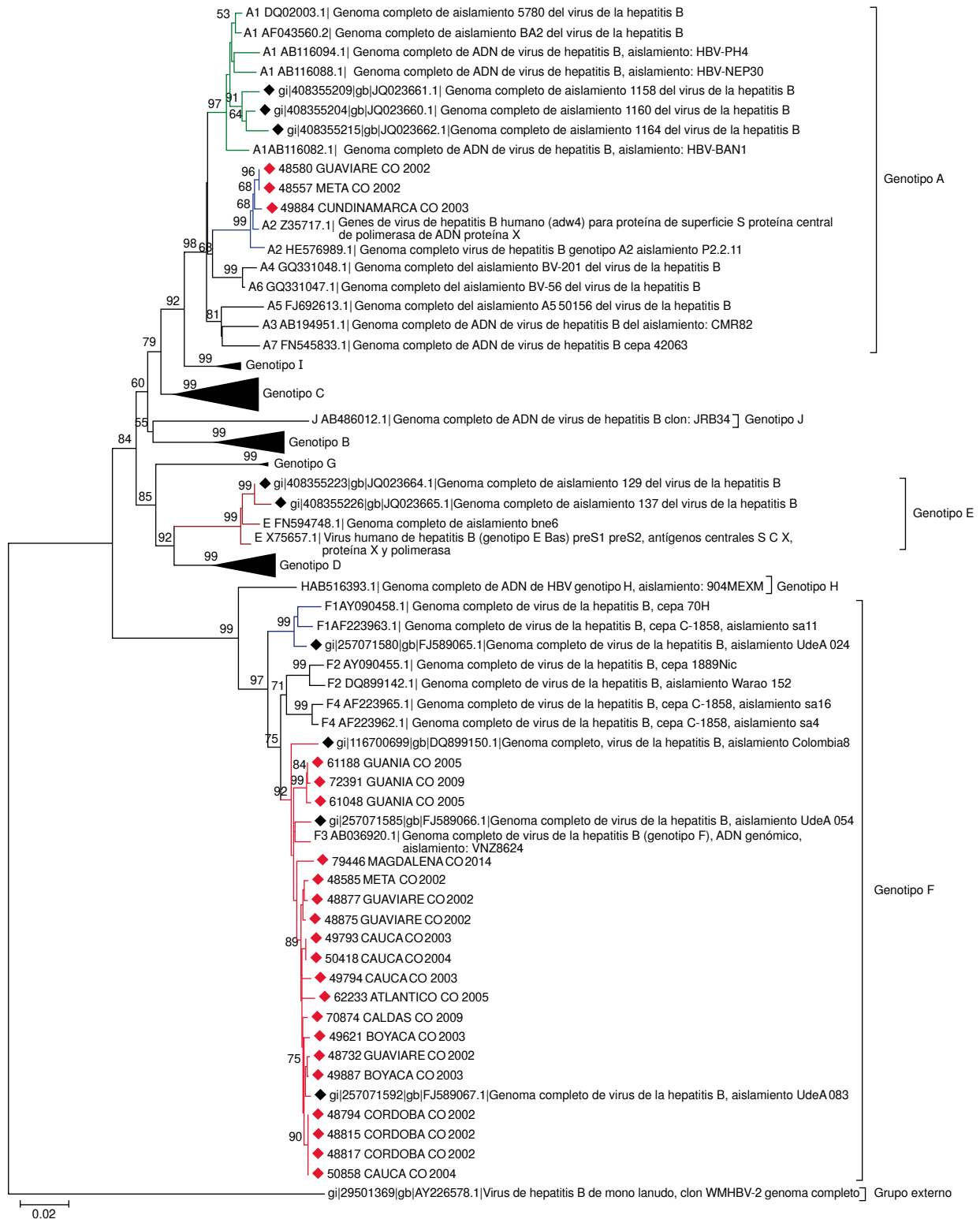
La secuencia de la muestra identificada con el código 49791\_Cauca\_CO\_2003, presentó un gran número de sitios variables, los cuales se designaron según el código internacional de ambigüedad de nucleótidos (figura 3). La gran frecuencia de sustituciones no sinónimas en dicha secuencia (figura 5), sugiere la presencia de una infección simultánea con dos diferentes cepas del HBV; sin embargo, sería necesaria la clonación y secuenciación de los clones del producto de la PCR para confirmar o refutar dicha hipótesis.

#### **Mutaciones en el ORF S y la región codificante del dominio RT de la polimerasa del HBV circulante en Colombia y su asociación con resistencia a medicamentos antivirales y con el escape**

Mediante el uso de herramientas bioinformáticas, se identificaron mutaciones asociadas con resistencia a medicamentos antivirales en dos de las muestras secuenciadas. La secuencia de la cepa 49884\_Cundinamarca\_CO\_2003, perteneciente al genotipo A, presentó simultáneamente dos sustituciones (L180M y M204V) previamente asociadas con resistencia a LdT, 3TC y ETV (31,32), e identificadas recientemente en un paciente colombiano con hepatopatía en estado terminal (33) (figura 5). La secuencia de la cepa 60265\_Cesar\_CO\_2004, perteneciente al genotipo F, presentó la sustitución I169L asociada con resistencia a ETV. De todas maneras, en los artículos pertinentes se señala la necesidad de acopiar mayor evidencia clínica sobre dicha asociación (34).

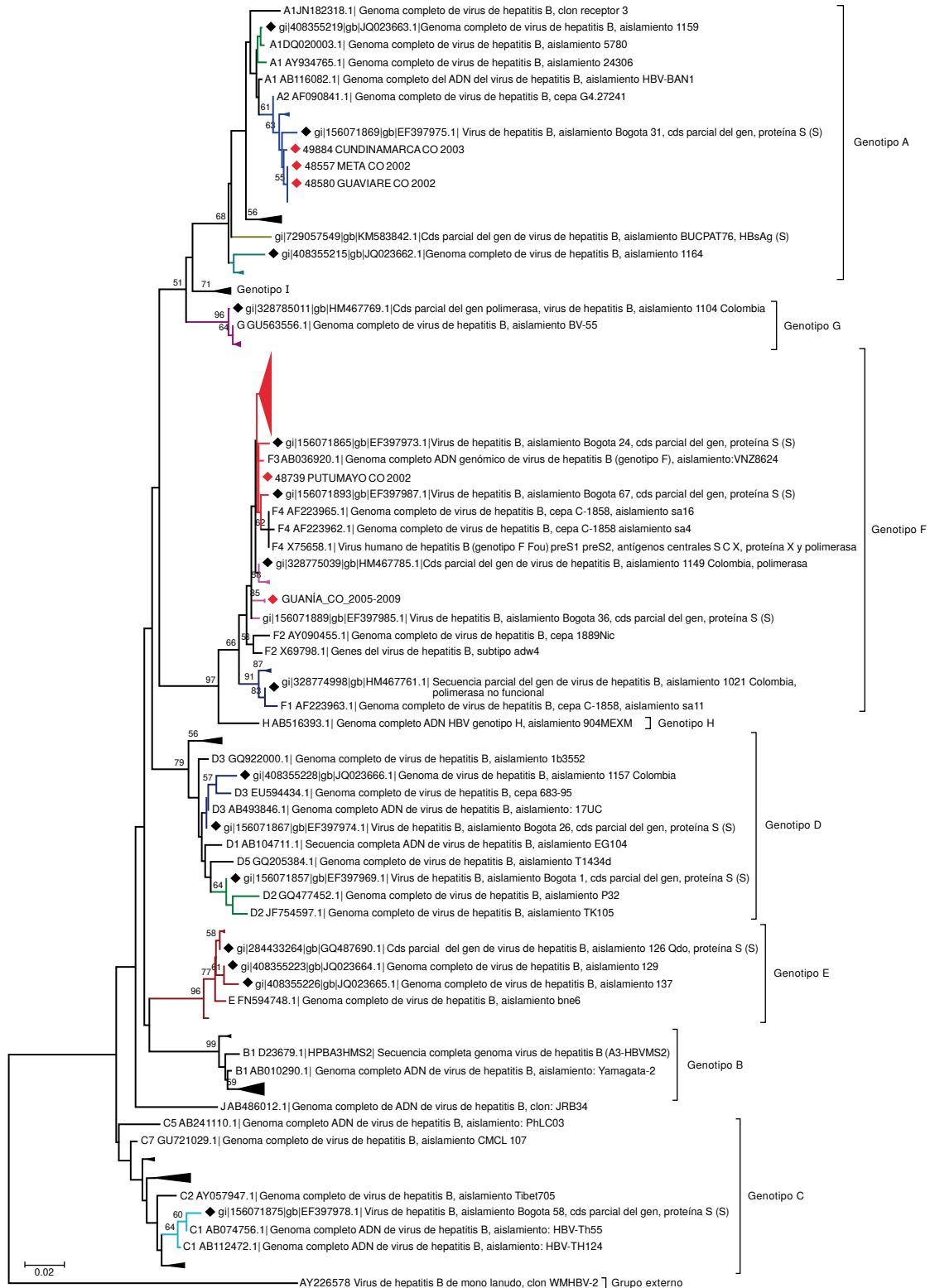
En cuanto a la identificación de mutaciones en el S-HBsAg, únicamente la secuencia de la cepa 48877\_Guaviare\_CO\_2002, perteneciente al genotipo F, presentó la mutación de escape P120Q (figura 6). Las tres mutaciones asociadas con la resistencia a los medicamentos antivirales, se identificaron en muestras provenientes de hombres con edades entre los 17 (dos mutaciones) y los 51 años, en tanto que la mutación de escape se identificó en una mujer de 22 años, cuyo antecedente de vacunación no se pudo determinar (cuadro 1).

Dos de las secuencias del HBV obtenidas en el presente estudio, presentaron una delección en la región preS1-preS2 (figura 7) y, aunque dicha delección no involucró el antígeno S pequeño



**Figura 2.** Inferencia filogenética por *neighbor-joining* (NJ) del HBV, basada en el gen de la polimerasa viral (parcial de 1.591 pb). Se utilizó el método de NJ con 1.000 réplicas en el proceso de *bootstrap* y el modelo de sustitución de nucleótidos K2P+G (Shape: 0,77). La secuencia del virus de la hepatitis B del mono lanudo (número de acceso en GenBank: AY226578) se utilizó como grupo externo solo con fines de visualización. Los rombos rojos representan las cepas colombianas secuenciadas en el presente estudio y, los negros, las cepas colombianas previamente depositadas en GenBank.





**Figura 4.** Genotipos del HBV presentes en Colombia. Inferencia filogenética por *neighbor-joining* basada en un fragmento de 377 pb (posiciones 1.155-1.531 del genoma de referencia NC\_003977). Se utilizaron 1.000 réplicas de *bootstrap* y el modelo de sustitución de nucleótidos K2P+G (Shape: 0,23). La secuencia del HBV del mono lanudo (número de acceso en GenBank: AY226578) se utilizó como grupo externo con fines de visualización. Los rombos rojos representan las cepas colombianas secuenciadas en el presente estudio y, los negros, las cepas colombianas previamente depositadas en GenBank.





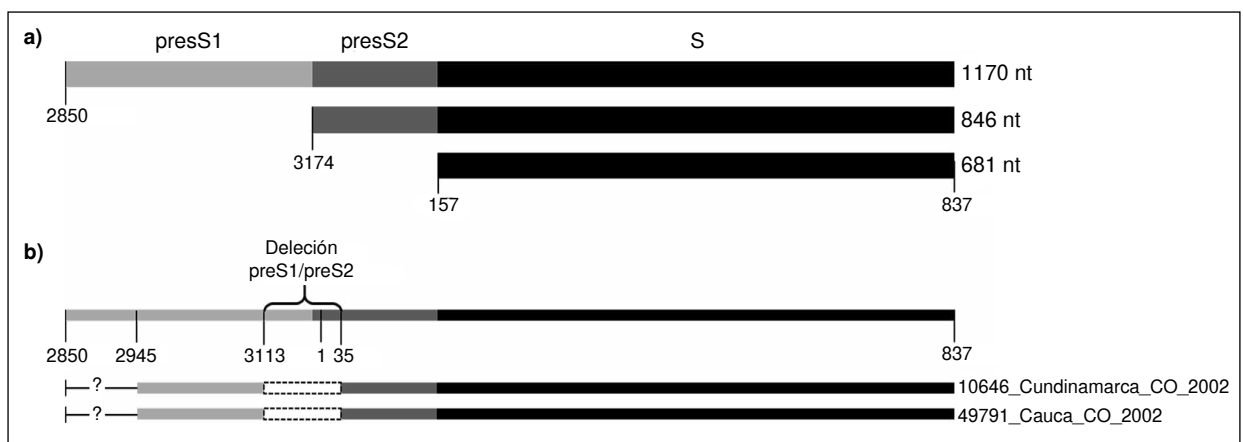
**Cuadro 1.** Mutaciones de resistencia y escape en los genes P y S del HBV, Colombia, 2002-2014

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

\* Código interno del Laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Salud

HBV-DRI: *HIV-grade HBV drug resistance interpretation*

M: masculino; F: femenino; LdT: telbivudina; 3TC: lamivudina; ETV: entecavir; FTC: emtricitabine



**Figura 7.** Región codificante de los antígenos de superficie del HBV. a) Representación gráfica de los antígenos de superficie grande (L-HBsAg), mediano (M-HBsAg) y pequeño (S-HBsAg) del HBV. b) Delimitación de la región correspondiente a la delección presente en dos cepas del HBV colombianas. Las posiciones genómicas se calcularon con base en el genoma de referencia del HBV, número de acceso en GenBank NC\_003977.2. La región delimitada con signo de interrogación no se pudo resolver en los electroferogramas obtenidos.

de que la PCR fue optimizada y la utilización de controles positivos permitió demostrar su correcto funcionamiento en todos los ensayos, el porcentaje de detección observado fue relativamente bajo (13,3 %) debido a la inclusión de muestras sin resultado confirmatorio del HBsAg mediante ensayo de neutralización; está documentado que existe un porcentaje de falsos positivos en los ensayos mediante la técnica ELISA debido a la unión inespecífica de antígenos. En 28 (42,4%) de las 66 muestras amplificadas, se lograron la secuenciación y el ensamblaje de la región genómica esperada. A pesar de que algunas muestras lograron amplificarse y secuenciarse parcialmente, se excluyeron por carecer de la región completa objeto del análisis, o por arrojar electroferogramas de baja resolución que impedían su correcto ensamblaje.

Los análisis filogenéticos del HBV han sido relevantes desde el punto de vista epidemiológico y clínico, pues han permitido rastrear el origen ancestral y reciente de los virus, estimar el tiempo de aparición de los diferentes genotipos y subgenotipos, establecer asociaciones entre los genotipos, las diferentes vías de transmisión y las manifestaciones clínicas de la enfermedad, y predecir la respuesta al tratamiento antiviral (21,39). Además, se han convertido en un complemento importante en el estudio de brotes para establecer la cadena de transmisión (40).

En el continente americano circula predominantemente el genotipo F; la información filogenética sugiere que este genotipo se originó en poblaciones amerindias de Norteamérica, Centroamérica y Suramérica hace 8.900 años, aproximadamente (42,43). El genotipo F se ha relacionado con una mayor frecuencia de carcinoma hepatocelular y muerte (44,45). Este genotipo se ha venido detectando en Colombia desde hace varias décadas y su mayor frecuencia se ha demostrado en diferentes estudios (8,16,17,46). En concordancia, los resultados del presente estudio mostraron que una alta proporción (85,7 %) de las muestras caracterizadas pertenecen al subgenotipo F3 del genotipo F. Asimismo, el genotipo A, cuyo origen en África se remonta a 9.600 años, aproximadamente, y el subgenotipo A2, establecido en Europa hace alrededor de 5.000 años (43), han alcanzado una amplia distribución mundial y se pudo identificar en el 14,3 % de las muestras caracterizadas. La circulación de este genotipo en el país había sido reportada en estudios previos

(7,16) y el subgenotipo A2 se ha asociado con un mayor riesgo de progresión a la fase crónica de la enfermedad en la población japonesa (47).

Una de las principales limitaciones del presente estudio fue la imposibilidad de obtener información clínica de los pacientes, debido a que las fichas de notificación y las historias clínicas no suministraban la información completa; además, el periodo de estudio fue extenso, lo que impidió completar u obtener los datos clínicos. En este sentido, el estudio se limitó a la descripción de la diversidad de los virus que circularon en el país en el periodo de 2002 a 2014 y de la presencia de mutaciones en el HBV con relevancia epidemiológica.

En la actualidad existen diferentes medicamentos antivirales para el control de la infección por HBV. Sin embargo, la presión selectiva que representan los tratamientos antivirales, la alta tasa de sustitución de nucleótidos del HBV ( $4,57 \times 10^{-5}$  sustituciones/nucleótido/año) (48) y el elevado grado de replicación ( $10^{12}$  viriones/día) (49), son factores determinantes que favorecen la aparición de mutaciones de resistencia.

El alto costo de los tratamientos antivirales disponibles y la necesidad de conocer *a priori* la existencia de mutaciones de resistencia, justifican el estudio de la variabilidad genética de las cepas del HBV que circulan en el país, con el fin de predecir la efectividad de los diferentes tratamientos y contribuir con información útil para la adopción de decisiones.

Teniendo en cuenta que las muestras analizadas en el presente estudio fueron remitidas para el diagnóstico de pacientes con sospecha de hepatitis viral, se puede inferir que estos no habían recibido tratamiento antiviral. Por lo tanto, la identificación de dos mutaciones de resistencia (L180M y M204V) de forma simultánea en el HBV de la muestra proveniente de un paciente de Cundinamarca, sugiere que este adquirió la infección a partir del contacto con un individuo previamente tratado con LdT, 3TC, ETV o emtricitabine (FTC). La mutación I169L en el dominio RT del HBV se identificó en una muestra procedente del departamento del Cesar; aunque es más frecuente encontrar la mutación I169T en dicho dominio, y esta se ha asociado claramente con resistencia a ETV, la presencia de leucina en esta posición podría estar relacionada también con dicha resistencia, y es así como fue interpretada por las herramientas en línea HBV DRI y Geno2Pheno.

Por último, se estima que el surgimiento de variantes de escape en la secuencia que codifica el determinante "a" o en regiones cercanas, tendrá importantes implicaciones en salud pública (23,50). Estas mutaciones están relacionadas principalmente con el escape frente a la neutralización por parte de los anticuerpos generados tras la inmunización con la vacuna, o por infección natural por el HBV, y podrían tener un impacto negativo en el diagnóstico mediante pruebas serológicas basadas en la detección del HBsAg (23,51).

En el análisis de las secuencias del gen S del HBV, se identificó la mutación P120Q en la muestra de un paciente proveniente del departamento del Guaviare, la cual fue reactiva para el HBsAg con el método ELISA. Dicha mutación se ha relacionado con una reacción disminuida en diferentes ensayos serológicos comerciales, como el Vitros ECi HBsAg™ (Ortho-Clinical Diagnostics, Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido) y el Auszyme Dynamic™ (Abbott Laboratories, North Chicago, USA) (52,53). Asimismo, se reportó la aparición de esta mutación en un paciente recién nacido de una madre infectada en Corea, a quien se le había administrado de forma simultánea la vacuna y el tratamiento profiláctico con inmunoglobulina (54).

En la región preS/S comúnmente se presentan deleciones (55) y mutaciones puntuales (56), las cuales se han asociado con falla hepática aguda, cirrosis y hepatitis colestásica 'fibrosante' (22,57,58). En el presente estudio, dos de las muestras correspondientes al periodo de 2002 a 2003 presentaron una deleción en la región preS1-preS2, cuyas implicaciones biológicas y clínicas se estudiarán y discutirán en estudios posteriores.

El presente estudio permitió corroborar la circulación en Colombia de los genotipos y subgenotipos F3 y A2 del HBV, así como la circulación predominante del subgenotipo F3. Se identificaron las mutaciones L180M y M204V de resistencia a los medicamentos antivirales, cuya presencia simultánea en la secuencia se detectó en la muestra proveniente de un mismo paciente; en la secuencia de otro paciente, se identificó la mutación I169L, la cual también podría conferir resistencia antiviral. En la región codificante del HBsAg, se identificó la mutación P120Q, la cual se ha considerado como variante de escape. Además, se encontró una deleción de 105 nucleótidos que se extendían a la región codificante de preS1 y de preS2, cuyas implicaciones biológicas y clínicas se desconocen.

El presente estudio constituye un aporte a la epidemiología molecular del HBV en Colombia y a la identificación de mutaciones asociadas con resistencia a los medicamentos antivirales y con mutaciones de escape en las regiones codificantes S y el dominio RT de la polimerasa, lo cual constituye una información valiosa para la adopción de decisiones durante el proceso de elección y seguimiento de la efectividad de los tratamientos antivirales.

### Agradecimientos

A la Unidad de Secuenciación y Genómica del Grupo de Virología del Instituto Nacional de Salud, al Programa Nacional de Ciencia y Tecnología en Salud del Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, Colciencias, y a la Asociación Colombiana para el Avance de la Ciencia, ACAC.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

### Financiación

El presente estudio fue financiado por el Convenio de cooperación entre Colciencias y el Instituto Nacional de Salud No. 769-2013, Código de proyecto: 2104-569-35036.

### Referencias

1. **Dienstag JL.** Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med.* 2008; 359:1486-500. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0801644>
2. **Paganelli M, Stephenne X, Sokal EM.** Chronic hepatitis B in children and adolescents. *J Hepatol.* 2012;57:885-96. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.03.036>
3. **World Health Organization.** Hepatitis B. Fact sheet. 2016. Fecha de consulta: 1° de julio de 2017. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>
4. **Schweitzer A, Horn J, Mikolajczyk RT, Krause G, Ott JJ.** Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: A systematic review of data published between 1965 and 2013. *Lancet.* 2015;386:1546-55. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)61412-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)61412-X)
5. **Instituto Nacional de Salud.** Sivigila. Boletín epidemiológico semanal. Semana epidemiológica No. 52 de 2016. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 2016. Fecha de consulta: 22 de febrero de 2017. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2016%20Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20semana%2052%20-.pdf>
6. **Alvarado-Mora MV, Fernández MF, Gomes-Gouvêa MS, de Azevedo-Neto RS, Carrilho FJ, Pinho JR.** Hepatitis B (HBV), hepatitis C (HCV) and hepatitis delta (HDV) viruses in the Colombian population--how is the epidemiological situation? *PLoS One.* 2011;6:e18888. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018888>

7. **Ríos-Patiño D, di Filippo VD, Insuasty EM, Rendón JC, Ríos WA, Medina LC, et al.** Hepatitis B infections in individuals with exposure factors in Quibdó and Apartadó, Colombia. *Rev Colomb Gastroenterol.* 2015;30:11-8.
8. **Di Filippo-Villa D, Cortés-Mancera F, Payares E, Montes N, de la Hoz F, Arbeláez MP, et al.** Hepatitis D virus and hepatitis B virus infection in Amerindian communities of the Amazonas state, Colombia. *Virology.* 2015;12:172. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0402-5>
9. **Beltrán M, Navas MC, Arbeláez MP, Donado J, Jaramillo S, De la Hoz F, et al.** Seroprevalence of hepatitis B virus and human immunodeficiency virus infection in a population of multiply-transfused patients in Colombia, Sur América. *Biomédica.* 2009;29:232-43. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v29i2.25>
10. **Seeger C, Zoulim F, Mason WS.** Hepadnaviruses. In: Knipe D, Howley P, editors. *Fields virology.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 2185-221.
11. **Norder H, Courouce AM, Coursaget P, Echevarría JM, Lee SD, Mushahwar IK, et al.** Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: Genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology.* 2004;47:289-309. <https://doi.org/10.1159/000080872>
12. **Shi W, Zhang Z, Ling C, Zheng W, Zhu C, Carr MJ, et al.** Hepatitis B virus subgenotyping: History, effects of recombination, misclassifications, and corrections. *Infect Genet Evol.* 2013;16:355-61. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.03.021>
13. **Bautista-Amorocho H, Castellanos-Domínguez YZ, Rodríguez-Villamizar LA, Velandia-Cruz SA, Becerra-Peña JA, Farfán-García AE.** Epidemiology, risk factors and genotypes of HBV in HIV-infected patients in the northeast region of Colombia: High prevalence of occult hepatitis B and F3 subgenotype dominance. *PLoS One.* 2014;9:e114272. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114272>
14. **Cortés-Mancera F, Loureiro CL, Hoyos S, Restrepo JC, Correa G, Jaramillo S, et al.** Etiology and viral genotype in patients with end-stage liver diseases admitted to a hepatology unit in Colombia. *Hepat Res Treat.* 2011;2011:363205. <https://doi.org/10.1155/2011/363205>
15. **Alvarado-Mora MV, Romano CM, Gomes-Gouvêa MS, Gutiérrez MF, Carrilho FJ, Pinho JR.** Molecular epidemiology and genetic diversity of hepatitis B virus genotype E in an isolated Afro-Colombian community. *J Gen Virol.* 2010;91:501-8. <https://doi.org/10.1099/vir.0.015958-0>
16. **Alvarado-Mora MV, Romano CM, Gomes-Gouvêa MS, Gutiérrez MF, Botelho L, Carrilho FJ, et al.** Molecular characterization of the hepatitis B virus genotypes in Colombia: A Bayesian inference on the genotype F. *Infect Genet Evol.* 2011;11:103-8. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.10.003>
17. **Devesa M, Loureiro CL, Rivas Y, Monsalve F, Cardona N, Duarte MC, et al.** Subgenotype diversity of hepatitis B virus American genotype F in Amerindians from Venezuela and the general population of Colombia. *J Med Virol.* 2008;80:20-6. <https://doi.org/10.1002/jmv.21024>
18. **Alvarado-Mora MV, Romano CM, Gomes-Gouvêa MS, Gutiérrez MF, Carrilho FJ, Pinho JR.** Phylogenetic analysis of complete genome sequences of hepatitis B virus from an Afro-Colombian community: Presence of HBV F3/A1 recombinant strain. *Virology.* 2012;9:244. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-244>
19. **Rendón JC, Cortés-Mancera F, Duque-Jaramillo A, Ospina MC, Navas MC.** Analysis of hepatitis B virus genotypes by restriction fragment length polymorphism. *Biomédica.* 2016;36:79-88. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i0.2976>
20. **Kramvis A.** Genotypes and genetic variability of hepatitis B virus. *Intervirology.* 2014;57:141-50. <https://doi.org/10.1159/000360947>
21. **Tong S, Revill P.** Overview of hepatitis B viral replication and genetic variability. *J Hepatol.* 2016;64(Suppl.):S4-16. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.01.027>
22. **Fan YF, Lu CC, Chen WC, Yao WJ, Wang HC, Chang TT, et al.** Prevalence and significance of hepatitis B virus (HBV) pre-S mutants in serum and liver at different replicative stages of chronic HBV infection. *Hepatology.* 2001;33:277-86. <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.21163>
23. **Jaramillo CM, Navas MC.** Variantes de escape del virus de la hepatitis B. *Rev Chil Infectol.* 2015;32:190-7. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182015000300008>
24. **Biswas S, Candotti D, Allain JP.** Specific amino acid substitutions in the S protein prevent its excretion *in vitro* and may contribute to occult hepatitis B virus infection. *J Virol.* 2013;87:7882-92. <https://doi.org/10.1128/JVI.00710-13>
25. **Coleman PF.** Surveillance for hepatitis B surface antigen mutants. *J Med Virol.* 2006;78(Suppl.1):S56-8. <https://doi.org/10.1002/jmv.20609/abstract>
26. **Stuyver L, De Gendt S, van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF, et al.** A new genotype of hepatitis B virus: Complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol.* 2000;81:67-74. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-1-67>
27. **Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S.** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013;30:2725-9. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
28. **Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D.** jModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods.* 2012;9:772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
29. **Rhee SY, Margeridon-Thermet S, Nguyen MH, Liu TF, Kagan RM, Beggel B, et al.** Hepatitis B virus reverse transcriptase sequence variant database for sequence analysis and mutation discovery. *Antiviral Res.* 2010;88:269-75. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2010.09.012>
30. **Beggel B, Neumann-Fraune M, Doring M, Lawyer G, Kaiser R, Verheyen J, et al.** Genotyping hepatitis B virus dual infections using population-based sequence data. *J Gen Virol.* 2012;93:1899-907. <https://doi.org/10.1099/vir.0.043042-0>
31. **Mukaide M, Tanaka Y, Shin IT, Yuen MF, Kurbanov F, Yokosuka O, et al.** Mechanism of entecavir resistance of hepatitis B virus with viral breakthrough as determined by long-term clinical assessment and molecular docking simulation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:882-9. <https://doi.org/10.1128/AAC.01061-09>
32. **He X, Wang F, Huang B, Chen P, Zhong L.** Detection and analysis of resistance mutations of hepatitis B virus. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8:9630-9.

33. **Rendón JC, Cortés-Mancera F, Restrepo-Gutiérrez JC, Hoyos S, Navas MC.** Molecular characterization of occult hepatitis B virus infection in patients with end-stage liver disease in Colombia. *PLoS One.* 2017;12:e0180447. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180447>
34. **Kim DY, Chang HY, Lim SM, Kim SU, Park JY, Kim JK, et al.** Quasispecies and pre-existing drug-resistant mutations of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B. *Gut Liver.* 2013;7:329-34. <https://doi.org/10.5009/gnl.2013.7.3.329>
35. **Beltrán M, Berrío-Pérez M, Bermúdez MI, Rey-Benito G, Camacho B, Forero P, et al.** Detección de hepatitis B oculta en donantes de bancos sangre, Colombia 2008-2009. *Biomédica.* 2011;31:580-9. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v31i4.446>
36. **de la Hoz F.** Comportamiento de la notificación por Sivigila para hepatitis B, 1997-2001. *Inf Quinc Epidemiol Nac.* 2001; 6:253-68.
37. **Idrovo-Cubides V, Suárez Q CY, Álvarez-Quintero P.** Epidemiología e historia natural de la hepatitis B. *Rev Colomb Gastroenterol.* 2009;24:4s-12s.
38. **Beltrán O, Varón A, Restrepo JC.** Hepatitis B postrasplante. *Rev Colomb Gastroenterol.* 2009;24(Supl.1):33-8S.
39. **Kramvis A, Kew MC.** Relationship of genotypes of hepatitis B virus to mutations, disease progression and response to antiviral therapy. *J Viral Hepat.* 2005;12:456-64. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2005.00624.x/abstract>
40. **Tolosa N, Cuéllar C, Quijada H, Pacheco OE, Escalante M, Usme-Ciro JA, et al.** Estudio de conglomerado de casos de hepatitis B en el Establecimiento Penitenciario de Mediana y Alta Seguridad (EPMAS) "Doña Juana", municipio La Dorada (Caldas), año 2014. *Inf Quinc Epidemiol Nac.* 2016;21:216-37.
41. **Mohanty K.** The first case of criminalization of transmission of hepatitis B in the UK: Defendant sentenced to two years' imprisonment on the grounds of hepatitis B deoxyribonucleic acid sequencing. *Int J STD AIDS.* 2009;20:587-9. <https://doi.org/10.1258/ijsa.2008.008483>
42. **Campos RH, Mbayed VA, Pineiro YL.** Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Latin America. *J Clin Virol.* 2005;34(Suppl.2):S8-s13. [https://doi.org/10.1016/S1386-6532\(05\)80028-9](https://doi.org/10.1016/S1386-6532(05)80028-9)
43. **Paraskevis D, Magiorkinis G, Magiorkinis E, Ho SY, Belshaw R, Allain JP, et al.** Dating the origin and dispersal of hepatitis B virus infection in humans and primates. *Hepatology.* 2013;57:908-16. <https://doi.org/10.1002/hep.26079>
44. **Livingston SE, Simonetti JP, McMahon BJ, Bulkow LR, Hurlburt KJ, Homan CE, et al.** Hepatitis B virus genotypes in Alaska Native people with hepatocellular carcinoma: Preponderance of genotype F. *J Infect Dis.* 2007;195:5-11. <https://doi.org/10.1086/509894>
45. **Sánchez-Tapias JM, Costa J, Mas A, Bruguera M, Rodes J.** Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. *Gastroenterology.* 2002;123:1848-56. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.37041>
46. **Norder H, Courouce AM, Magnius LO.** 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. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1060>
47. **Matsuura K, Tanaka Y, Hige S, Yamada G, Murawaki Y, Komatsu M, et al.** Distribution of hepatitis B virus genotypes among patients with chronic infection in Japan shifting toward an increase of genotype A. *J Clin Microbiol.* 2009;47:1476-83. <https://doi.org/10.1128/JCM.02081-08>
48. **Orito E, Mizokami M, Ina Y, Moriyama EN, Kameshima N, Yamamoto M, et al.** Host-independent evolution and a genetic classification of the hepadnavirus family based on nucleotide sequences. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86: 7059-62.
49. **Girones R, Miller RH.** Mutation rate of the hepadnavirus genome. *Virology.* 1989;170:595-7.
50. **Waters JA, Kennedy M, Voet P, Hauser P, Petre J, Carman W, et al.** Loss of the common "A" determinant of hepatitis B surface antigen by a vaccine-induced escape mutant. *J Clin Invest.* 1992;90:2543-7. <https://doi.org/10.1172/JCI116148>
51. **Carman WF, Korula J, Wallace L, MacPhee R, Mimms L, Decker R.** Fulminant reactivation of hepatitis B due to envelope protein mutant that escaped detection by monoclonal HBsAg ELISA. *Lancet.* 1995;345:1406-7.
52. **Avellón A, Echevarría JM.** Frequency of hepatitis B virus 'a' determinant variants in unselected Spanish chronic carriers. *J Med Virol.* 2006;78:24-36. <https://doi.org/10.1002/jmv.20516/abstract>
53. **Kfoury-Baz EM, Zheng J, Mazuruk K, van Le A, Peterson DL.** Characterization of a novel hepatitis B virus mutant: Demonstration of mutation-induced hepatitis B virus surface antigen group specific "a" determinant conformation change and its application in diagnostic assays. *Transfus Med.* 2001;11:355-62. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3148.2001.00323.x>
54. **Lee KM, Kim YS, Ko YY, Yoo BM, Lee KJ, Kim JH, et al.** Emergence of vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus with multiple surface gene mutations in a Korean child. *J Korean Med Sci.* 2001;16:359-62. <https://doi.org/10.3346/jkms.2001.16.3.359>
55. **Chen BF, Liu CJ, Jow GM, Chen PJ, Kao JH, Chen DS.** High prevalence and mapping of pre-S deletion in hepatitis B virus carriers with progressive liver diseases. *Gastroenterology.* 2006;130:1153-68. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.01.011>
56. **Pollicino T, Amaddeo G, Restuccia A, Raffa G, Alibrandi A, Cutroneo G, et al.** Impact of hepatitis B virus (HBV) preS/S genomic variability on HBV surface antigen and HBV DNA serum levels. *Hepatology.* 2012;56:434-43. <https://doi.org/10.1002/hep.25592>
57. **Zhang D, Dong P, Zhang K, Deng L, Bach C, Chen W, et al.** Whole genome HBV deletion profiles and the accumulation of preS deletion mutant during antiviral treatment. *BMC Microbiol.* 2012;12:307. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-307>
58. **Santantonio T, Jung MC, Schneider R, Fernholz D, Milella M, Monno L, et al.** Hepatitis B virus genomes that cannot synthesize pre-S2 proteins occur frequently and as dominant virus populations in chronic carriers in Italy. *Virology.* 1992;188:948-52. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90559-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90559-8)