



CENTRO INTERNACIONAL DE ESTUDOS
DE DOUTORAMENTO E AVANZADOS
DA USC (CIEDUS)

TESIS DOCTORAL

**EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS
DE LA HEPATITIS B EN EL ÁREA
SANITARIA DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (ESPAÑA)**

Rocío Trastoy Pena

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL
**PROGRAMA DE DOCTORADO EN AVANCES EN BIOLOGÍA
MICROBIANA Y PARASITARIA**

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2019





DECLARACIÓN DE LA AUTORA DE LA TESIS

EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B EN EL ÁREA SANITARIA DE SANTIAGO DE COMPOSTELA (ESPAÑA)

Dña. Rocío Trastoy Pena

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
- 2) De ser el caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
- 3) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.
- 4) Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.

En Santiago de Compostela, 1 de Abril de 2019

Fdo. Rocío Trastoy Pena





**AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE LA TESIS
EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS DE LA HEPATITIS
B EN EL ÁREA SANITARIA DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
(ESPAÑA)**

Antonio Aguilera Guirao, profesor asociado de Ciencias de la Salud del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela

INFORMA:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por Dña. Rocío Trastoy Pena, bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Lei 40/2015.

En Santiago de Compostela, 1 de Abril de 2019

Fdo. Dr. Antonio Aguilera Guirao





AUTORIZACIÓN DEL TUTOR DE LA TESIS
EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS DE LA HEPATITIS
B EN EL ÁREA SANITARIA DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
(ESPAÑA)

Rafael Seoane Prado, catedrático del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela

INFORMA:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por Dña. Rocío Trastoy Pena y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como tutor de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Lei 40/2015.

En Santiago de Compostela, 1 de Abril de 2019

Fdo. Prof. Rafael Seoane Prado





El doctorando, Rocío Trastoy Pena, declara no tener ningún conflicto de interés en relación con la tesis doctoral.

En Santiago de Compostela, 1 de Abril de 2019

Fdo. Rocío Trastoy Pena



AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de forma especial a mi director, el Dr. Antonio Aguilera, su apoyo y ayuda en la realización de esta tesis doctoral. Él ha sido quien me embarcó en esta aventura y quien me animó a continuar en todo momento sin perder la confianza en mí, haciéndome partícipe de sus conocimientos y su pasión por la ciencia.

Mención especial requieren el Dr. José Javier Rodríguez Calviño y el Dr. Daniel Navarro de la Cruz por su inestimable contribución a este trabajo.

También quiero agradecer a los compañeros del Hospital Ramón y Cajal de Madrid su colaboración y la aportación tan importante que han hecho a esta tesis.

A todos mis compañeros Facultativos, Residentes, Técnicos e Investigadores que estuvieron junto a mí desde que empecé a trabajar en este proyecto. En particular a la Dra. Gema Barbeito por hacerme seguir hacia delante en los momentos difíciles, a la Dra. Mercedes Treviño por sus buenos consejos y a la Dra. Marisa Pérez del Molino por confiar en mí y valorar mi trabajo y esfuerzo en estos años.

A la Dra. María del Mar Tomás por enseñarme a disfrutar de mi trabajo.

A todos los profesionales que han intervenido en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con hepatitis B crónica incluidos en este estudio y sin los cuales no habría sido posible la realización del mismo.

A mis padres por quererme, educarme y hacer de mí una mejor persona. A mi hermano Javier que me obliga a superarme para ser un buen ejemplo a seguir. A Miguel que confía en mí, me quiere y me lo demuestra cada día con su infinita paciencia. Por último, a Ainhoa, la persona más importante de mi vida, que simplemente con su sonrisa me hace feliz.



ABREVIATURAS

| | |
|-----------|--|
| AAD: | antivirales de acción directa |
| AC: | área costera |
| ADN: | ácido desoxirribonucleico |
| ADNccc: | ácido desoxirribonucleico circular covalentemente cerrado |
| ADV: | adefovir dipivoxil |
| ALT: | alanina aminotransferasa |
| AM: | área metropolitana |
| Anti-HBc: | anticuerpos frente al <i>core</i> del virus de la hepatitis B |
| Anti-HBe: | anticuerpos frente al antígeno e del virus de la hepatitis B |
| Anti-HBs: | anticuerpos frente al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B |
| AR: | área rural |
| ARN: | ácido ribonucleico |
| ARNm: | ácido ribonucleico mensajero |
| ARNss: | ácido ribonucleico de cadena sencilla |
| AS: | área sanitaria |
| AST: | aspartato aminotransferasa |
| bp: | pares de bases |
| CEI-SL: | Comité de Ética de Investigación de Santiago-Lugo |
| CHC: | carcinoma hepatocelular |
| CHUS: | Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela |
| CRD: | cuaderno de recogida de datos |

| | |
|----------------|---|
| CV: | carga viral |
| DR: | repeticiones directas |
| EASL: | Asociación Europea para el Estudio del Hígado |
| ECDC: | Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades |
| ELISA: | <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> |
| Enh: | <i>enhancer</i> o región potenciadora |
| ETV: | entecavir |
| EXUDVP: | ex-usuarios de drogas por vía parenteral |
| FT-RDB: | <i>Flow-through reverse dot blot</i> |
| GTR: | <i>general time reverse</i> |
| HBC: | hepatitis B crónica |
| HBeAg: | antígeno e del virus de la hepatitis B |
| HBsAg: | antígeno de superficie del virus de la hepatitis B |
| HBx: | proteína X del virus de la hepatitis B |
| HC: | hepatitis crónica |
| HDAg: | antígeno Delta |
| HSH: | hombres que tienen sexo con hombres |
| IC: | infección crónica |
| IFN α : | interferón α |
| IgG: | inmunoglobulinas G |
| IL28B: | interleukina 28B |
| IgM: | inmunoglobulinas M |
| Kb: | kilobases |
| LAM o LMV: | lamivudina |
| LIPA: | <i>line probe assay</i> |
| MCG: | genotipo mutacional complejo |
| mg/dl: | miligramo/decilitro |
| n: | número de pacientes |
| NA o NUC: | análogos de nucleós(t)idos |

| | |
|--------------------|--|
| NGS: | <i>next generation sequencing</i> |
| noAnoD: | genotipos del virus de la hepatitis B excluyendo el A y el D |
| NTCP: | receptor polipeptídico de cotransporte sodio-taurocolato |
| ORF: | <i>open reading frame</i> o marcos abiertos de lectura |
| PAN: | poliarteritis nodosa |
| PCR: | <i>polymerase chain reaction</i> o reacción en cadena de la polimerasa |
| PEG INF α : | interferón- α pegilado |
| PgARN: | ácido ribonucleico pregenómico |
| PreC-C: | región precore/core |
| qHBsAg: | antígeno de superficie del virus de la hepatitis B cuantitativo |
| Región BCP: | región del promotor basal del <i>core</i> |
| Región PC: | región precore |
| RFLP: | <i>restriction fragment length polymorphism</i> |
| RFMP: | <i>restriction fragment mass polymorphism</i> |
| RIC: | rango intercuartílico |
| RNAasa H: | ribonucleasa H |
| RVS: | respuesta viral sostenida |
| SNP: | <i>single nucleotide polymorphism</i> |
| TAF: | tenofovir alafenamida |
| TBV o LdT: | telbivudina |
| TDF: | tenofovir disoproxil fumarato |
| UDVP: | usuarios de drogas por vía parenteral |
| UI/ml: | unidades internacionales/mililitro |
| VHB (HBV): | virus de la hepatitis B |
| VHC: | Virus de la hepatitis C |
| VHD: | Virus de la hepatitis D |
| VIH: | Virus de la inmunodeficiencia humana |



RESUMEN

La epidemiología molecular y más concretamente la prevalencia y distribución de los genotipos y subtipos del VHB en Galicia adolecen de datos recientes, que además pueden haberse modificado por diversos motivos.

En este contexto y dado que los genotipos del VHB presentan una distribución geográfica característica y pueden influir en los parámetros clínicos de la enfermedad y en la respuesta al tratamiento, nos proponemos este trabajo de tesis en base a datos reales de pacientes procedentes de nuestras consultas de Digestivo, Hepatología y Enfermedades Infecciosas del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS). Analizaremos la prevalencia y distribución de los genotipos y subtipos del VHB en nuestro área sanitaria (AS) y su asociación con otros factores epidemiológicos, clínicos y virológicos, como: vías de transmisión, respuesta al tratamiento, características demográficas, diferencias geográficas, tendencias en la prevalencia y coinfecciones con otros virus que comparten vías de transmisión. Los datos fueron anonimizados en una base de datos de SPSS y para el análisis se emplearon proporciones y el test de Chi-cuadrado (χ^2).

De los 320 pacientes con hepatitis B crónica y una mediana de edad de 52 años (RIC 64-41), 268 eran nativos (83,8%) y 219 eran hombres (68,4%). La distribución de genotipos fue la siguiente: 15,3% genotipo A (15,6% subgenotipo A2), 1,6% genotipo B, 2,5% genotipo C, 71,6% genotipo D (40,7% subgenotipo D4 y 18,3% subgenotipo D2), 3,1% genotipo E, 2,2% genotipo F, 3,1% genotipo G y 0,6% genotipo H. Con respecto a la edad de los pacientes infectados crónicamente por VHB, eran más jóvenes las mujeres, los inmigrantes y por la misma razón, los pacientes infectados por genotipos no autóctonos (B, C y E) ya que eran en su mayoría pacientes no nativos.

En el 78,4% de los casos no se ha documentado un factor de riesgo asociado a la infección por VHB, siendo la vertical la vía de transmisión conocida predominante (11,9%). Se ha visto que el área costera es la zona geográfica con mayor carga de la enfermedad (1,13‰). Sin embargo, el área metropolitana presentó un mayor índice de Shannon que refleja una mayor diversidad de genotipos, con mayor representatividad de los genotipos no autóctonos. Del total de pacientes con HBC, el 7,2% estaban coinfectados con el VHC, el 10,6% con el VIH y el 3,3% con el VHD. El genotipo A fue más prevalente en hombres, en el área rural, en pacientes con HC HBeAg positivo, fue proporcionalmente más tratado y se asoció a presencia de antígeno e y carga viral más alta en el momento del diagnóstico. Como contraste, el genotipo D predominó en mujeres, en mayores de 50 años, en el área costera, en la fase de IC HBeAg negativo y se asoció a transmisión vertical. El genotipo A presentó una mejor respuesta serológica y virológica que el genotipo D. El estudio filogenético confirmó un inesperado predominio de subgenotipo D4 dentro del genotipo D en nuestra área que no se debe a un brote epidémico y en lo relativo al genotipo A confirmó un aumento en el número de casos en los últimos años debido al incremento del subgenotipo A2.

Este estudio confirma que en Galicia la distribución de genotipos del VHB varía con la edad, el sexo, la procedencia, en las diferentes fases de la historia natural de la HBC, en la respuesta al tratamiento y en la coinfección con el VIH y/o el VHC y también dentro de las diferentes áreas geográficas y grupos epidemiológicos. A pesar de estas evidencias y de las tímidas recomendaciones aparecidas en las últimas guías, se necesitan datos adicionales, antes de poder recomendar definitivamente su determinación en la práctica clínica.

ÍNDICE

| | | |
|----------|--|----|
| 1 | INTRODUCCIÓN | 25 |
| 1.1 | Virología del VHB | 25 |
| 1.1.1 | Taxonomía | 25 |
| 1.1.2 | Estructura del VHB | 26 |
| 1.1.3 | Ciclo biológico del VHB (figura 2) | 28 |
| 1.1.4 | Clasificación..... | 30 |
| 1.1.5 | Variabilidad genética | 32 |
| 1.1.5.1 | Variantes en el gen S..... | 33 |
| 1.1.5.2 | Variantes en PC y PBC..... | 33 |
| 1.1.5.3 | Variantes en el gen POL | 34 |
| 1.2 | Genotipos | 36 |
| 1.2.1 | Genotipos del VHB y su filodinámica | 36 |
| 1.2.1.1 | Genotipo A y sus subgenotipos..... | 36 |
| 1.2.1.2 | Genotipo B y sus subgenotipos..... | 36 |
| 1.2.1.3 | Genotipo C y sus subgenotipos..... | 36 |
| 1.2.1.4 | Genotipo D y sus subgenotipos..... | 37 |
| 1.2.1.5 | Genotipo E..... | 38 |
| 1.2.1.6 | Genotipo F y sus subgenotipos | 38 |
| 1.2.1.7 | Genotipo G..... | 38 |
| 1.2.1.8 | Genotipo H..... | 39 |
| 1.2.1.9 | Genotipo I y sus subgenotipos | 39 |
| 1.2.1.10 | Genotipo J..... | 39 |
| 1.2.2 | Métodos de identificación del genotipo | 40 |
| 1.2.3 | Prevalencia y distribución de genotipos..... | 42 |
| 1.2.3.1 | A nivel global..... | 42 |
| 1.2.3.2 | Europa..... | 44 |
| 1.2.3.3 | España..... | 46 |
| 1.2.3.4 | Galicia..... | 48 |
| 1.3 | Hepatitis B | 48 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 1.3.1 | Vías de transmisión | 48 |
| 1.3.2 | Historia natural de la enfermedad..... | 50 |
| 1.3.2.1 | Hepatitis B aguda | 50 |
| 1.3.2.2 | Hepatitis B crónica..... | 51 |
| 1.3.2.2.1 | Infección crónica por VHB HBeAg positivo..... | 53 |
| 1.3.2.2.2 | Hepatitis B crónica con HBeAg positivo | 53 |
| 1.3.2.2.3 | Infección crónica con HBeAg negativo | 54 |
| 1.3.2.2.4 | Hepatitis B crónica con HBeAg negativo | 55 |
| 1.3.2.2.5 | Infección oculta por VHB | 55 |
| 1.3.3 | Complicaciones de la hepatitis B crónica..... | 57 |
| 1.3.3.1 | Cirrosis | 58 |
| 1.3.3.2 | Descompensación hepática | 58 |
| 1.3.3.3 | Carcinoma hepatocelular (CHC)..... | 59 |
| 1.3.3.4 | Manifestaciones extrahepáticas..... | 59 |
| 1.3.4 | Coinfección con VHD..... | 59 |
| 1.4 | Diagnóstico de infección por VHB | 62 |
| 1.5 | Tratamiento | 63 |
| 1.5.1 | Objetivos del tratamiento | 63 |
| 1.5.2 | Indicaciones del tratamiento..... | 65 |
| 1.5.3 | Monitorización de los pacientes no tratados | 66 |
| 1.5.4 | Estrategias de tratamiento | 67 |
| 1.5.5 | Factores predictores de respuesta a IFN vs AN..... | 69 |
| 1.6 | Importancia del genotipo..... | 69 |
| 1.6.1 | Vía de transmisión..... | 70 |
| 1.6.2 | Progresión a infección crónica | 70 |
| 1.6.3 | Seroconversión del HBeAg | 71 |
| 1.6.4 | Seroaclaramiento del HBsAg | 71 |
| 1.6.5 | Viremia..... | 72 |
| 1.6.6 | Complicaciones: Cirrosis, CHC, Transplante y Mortalidad | 72 |
| 1.6.7 | Tratamiento | 73 |
| 1.6.8 | Mutaciones en el gen S y mutaciones de resistencia | 75 |
| 2 | HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 77 |

| | | |
|-----------|---|----|
| 3 | MATERIAL Y MÉTODOS..... | 79 |
| 3.1 | Tipo de diseño, población y entorno..... | 79 |
| 3.2 | Metodología..... | 81 |
| 3.2.1 | Variables de estudio..... | 81 |
| 3.2.1.1 | Variables epidemiológicas..... | 81 |
| 3.2.1.1.1 | Sexo al nacer..... | 81 |
| 3.2.1.1.2 | País de nacimiento..... | 81 |
| 3.2.1.1.3 | Edad..... | 81 |
| 3.2.1.1.4 | Vías de transmisión..... | 82 |
| 3.2.1.1.5 | Coinfección con otros virus que comparten vías de transmisión..... | 82 |
| 3.2.1.1.6 | Área sanitarias y localidades..... | 83 |
| 3.2.1.2 | Variables clínicas..... | 85 |
| 3.2.1.2.1 | Asociación de los diferentes genotipos con la progresión de la enfermedad..... | 85 |
| 3.2.1.3 | Variables terapéuticas..... | 86 |
| 3.2.1.3.1 | Carga viral..... | 86 |
| 3.2.1.3.2 | Tipo de terapia administrada..... | 86 |
| 3.2.1.3.3 | Resistencias antivirales..... | 86 |
| 3.2.2 | Determinaciones..... | 87 |
| 3.2.2.1 | Determinaciones serológicas..... | 87 |
| 3.2.2.2 | Determinaciones moleculares..... | 88 |
| 3.2.2.2.1 | Determinación de la carga viral plasmática del VHB..... | 88 |
| 3.2.2.2.2 | Determinación del genotipo y subgenotipo del VHB..... | 88 |
| 3.2.2.2.3 | Determinación del subtipo de VHB..... | 89 |
| 3.2.2.2.4 | Mutaciones de resistencia..... | 90 |
| 3.2.2.2.5 | Mutaciones de escape..... | 90 |
| 3.2.2.3 | Estudio filogenético..... | 91 |
| 3.2.2.3.1 | Pacientes, muestras y secuenciación genómica de un fragmento de VHB..... | 91 |
| 3.2.2.3.2 | Alineamiento..... | 91 |
| 3.2.2.3.3 | Genotipado..... | 91 |
| 3.2.2.3.4 | Análisis filogeográfico..... | 93 |
| 3.2.2.3.5 | Análisis filodinámico..... | 94 |
| 3.2.2.3.6 | Filogenia datada..... | 94 |
| 3.2.3 | Tratamiento estadístico..... | 95 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 4 | RESULTADOS | 97 |
| 4.1 | Distribución de genotipos en el área sanitaria | 97 |
| 4.1.1 | Distribución de genotipos en cada sexo y en el total de infectados crónicos por el VHB en el área sanitaria..... | 97 |
| 4.1.2 | Distribución de genotipos por edades en el área sanitaria. | 101 |
| 4.1.3 | Distribución de genotipos y subgenotipos según el país de origen del paciente..... | 102 |
| 4.2 | Distribución de factores de riesgo en el área sanitaria | 105 |
| 4.2.1 | Distribución de factores de riesgo asociados a la infección por VHB según el grupo de edad..... | 105 |
| 4.2.2 | Asociación de los distintos genotipos de VHB con los factores de riesgo para adquirir la infección..... | 106 |
| 4.3 | Distribución de genotipos de vhb asociados a la infección en las distintas áreas del AS | 107 |
| 4.4 | Distribución de genotipos y factores de riesgo en grupos de coinfectados con el VHC, VHD y/o VIH..... | 109 |
| 4.5 | Prevalencia de infectados crónicos por VHB | 111 |
| 4.5.1 | Prevalencia de infectados crónicos en cada área | 111 |
| 4.5.2 | Prevalencia de infectados crónicos en cada localidad del AM | 111 |
| 4.5.3 | Prevalencia de infectados crónicos en cada localidad del AC | 112 |
| 4.5.4 | Prevalencia de infectados crónicos en cada localidad del AR | 113 |
| 4.6 | Distribución de genotipos en las distintas fases de la enfermedad | 115 |
| 4.7 | Asociación de los diferentes genotipos con la progresión de la enfermedad | 117 |
| 4.7.1 | Asociación de los diferentes genotipos con la progresión a cirrosis | 117 |
| 4.7.2 | Asociación de los diferentes genotipos con el desarrollo de carcinoma hepatocelular | 118 |

| | |
|--|-----|
| 4.7.3 Asociación de los distintos genotipos de VHB con la necesidad de trasplante hepático | 119 |
| 4.7.4 Distribución de genotipos en la población total de estudio versus pacientes cirróticos, pacientes con CHC y pacientes trasplantados..... | 120 |
| 4.8 Asociación de los genotipos con la respuesta al tratamiento | 121 |
| 4.9 Mutaciones de escape y Mutaciones de resistencia | 123 |
| 4.10 Tendencias en la distribución de los genotipos del VHB y distribución en la población viral circulante | 124 |
| 4.11 Comparación entre los genotipos mayoritarios en nuestro AS: genotipos A y D | 127 |
| 4.12 Estudio filogenético | 128 |
| 4.12.1 Clasificación de los genotipos de VHB encontrados en nuestra serie..... | 128 |
| 5 LIMITACIONES DEL ESTUDIO | 135 |
| 6 DISCUSIÓN | 137 |
| 7 CONCLUSIONES | 155 |
| 8 BIBLIOGRAFÍA | 159 |
| 9 ANEXOS | 189 |
| 10 ÍNDICES COMPLEMENTARIOS | 191 |
| 10.1 Índice de figuras..... | 191 |
| 10.2 Índice de tablas..... | 192 |



1 INTRODUCCIÓN

El virus de la hepatitis B (VHB) es un agente infeccioso causante de hepatitis aguda y crónica, hecho ya conocido desde la década de 1940 (1). Sin embargo, no fue hasta la década de los 60 cuando se empezó a conocer la naturaleza de este virus. Varios descubrimientos fueron clave en el estudio de la hepatitis B a lo largo de la historia, como el descubrimiento del antígeno de superficie (HBsAg), que fue llamado antígeno Australia por Blumberg, y su posterior asociación a la hepatitis B (2-5), la visualización del virión completo del virus (partícula de Dane) (6) y la identificación del antígeno e de la hepatitis B (HBeAg) (7).

Hace más de 50 años del descubrimiento de VHB, y a pesar de contar con una vacuna efectiva e implementada desde la década de los 80, la enfermedad es todavía un reto para la salud pública (8, 9). Más de 240 millones de personas sufren hepatitis B crónica (HBC) en todo el mundo, la mayoría de los casos se concentran en la región asiática del Pacífico (10) y la mortalidad anual asociada a la infección crónica por el VHB es de 600.000 personas (11).

1.1 VIROLOGIA DEL VHB

1.1.1 Taxonomía

El virus de la hepatitis B se clasifica dentro del grupo de los Hepadnavirus (familia *Hepadnaviridae*, género *Orthohepadnavirus*), 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. Estos virus, todos ellos hepatotropos, dan lugar a infecciones persistentes con concentraciones de virus muy altas y partículas incompletas en la sangre de los infectados.

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 (12).

1.1.2 Estructura del VHB

Los viriones del virus de la hepatitis B son partículas de doble envuelta, de 40-42 nm de diámetro, con una envuelta externa de lipoproteínas que contiene tres glicoproteínas o antígenos de superficie (denominados S, M y L) (6, 13). Dentro de la envuelta se encuentra la nucleocápside o núcleo que contiene el genoma viral y la polimerasa (14, 15).

Además de los viriones, las células infectadas por VHB producen dos partículas lipoproteicas subvirales: esferas de 20 nm y formas filamentosas de diámetro similar. Estas partículas con antígeno de superficie (HBsAg) contienen sólo glucoproteínas de superficie y lípidos del huésped (14, 15).

El genoma del virus de la hepatitis B tiene un tamaño de 3200 pares de bases de longitud y es parcialmente de doble cadena, organizado con un patrón circular (16). Consta de una cadena negativa completa, complementaria del ARNm, y una cadena positiva de longitud incompleta (17). El genoma contiene cuatro promotores, dos regiones potenciadoras o *enhancer* (Enh 1, Enh 2) y dos repeticiones directas (DR1, DR2).

Durante la replicación del virus, la cadena corta de ADN se completa y se forma un ADN circular covalentemente cerrado (ADNccc). El ADNccc sirve como molde para la transcripción viral, generando ARNm de 3.5, 2.4, 2.1 y 0.7 kb(17).

El genoma de VHB tiene cuatro marcos abiertos de lectura (ORF: open reading frame) (figura 1):

- Región preS1/preS2/S que codifica los tres antígenos de superficie virales: proteína S, M y L. La proteína S o antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) se sintetiza en el citoplasma del hepatocito y pasa al suero en tres formas

diferentes (partículas esféricas, tubulares y de Dane). Se presenta muy precozmente en el suero, señal evidente de la infección, y desaparece o no, según la evolución del cuadro. Está codificado en el genoma viral por el gen S y existe en dos formas, glicosilada (GP27) y no glicosilada (P24). La proteína M (o preS2) está codificada por las regiones S y pre-S2; tiene dos formas glicosiladas (GP33 y GP36). La proteína L (o preS1) está codificada por las regiones pre-S1, pre-S2 y S. También presenta una forma glicosilada (GP42) y otra no glicosilada (P39).

La proteína S constituye el grueso de las proteínas de la envuelta mientras la proteína L es necesaria para la unión del virus a la célula receptora y en el ensamblaje y liberación del virión (17).

- Región PC/CP codifica la proteína principal viral o polipéptido de la nucleocápside (HBcAg) y el antígeno e de la hepatitis B (HBeAg). La región PC codifica una secuencia señal que la dirige a su procesamiento en el Aparato de Golgi y a su liberación como HBeAg. El HBeAg juega un papel importante en la modulación de la respuesta inmune del huésped (18). El HBcAg es esencial para el ensamblaje de la cápsula y la regulación de la replicación (17).
- La región que codifica la polimerasa es específica para dicha proteína. La polimerasa viral, con acción también de reverso transcriptasa, es la responsable de la síntesis de ADN en las células infectadas y de los transcritos de ARNm (19, 20).
- La región X codifica la proteína viral X (HBx) que modula la señal de transducción de la célula del huésped y regula la expresión genética tanto del huésped como del virus (21). La proteína X es necesaria para la replicación del virus y su dispersión. Otra función de esta proteína es la de promover la infección crónica mediante diversos mecanismos como por ejemplo previniendo la apoptosis de los hepatocitos infectados (17).

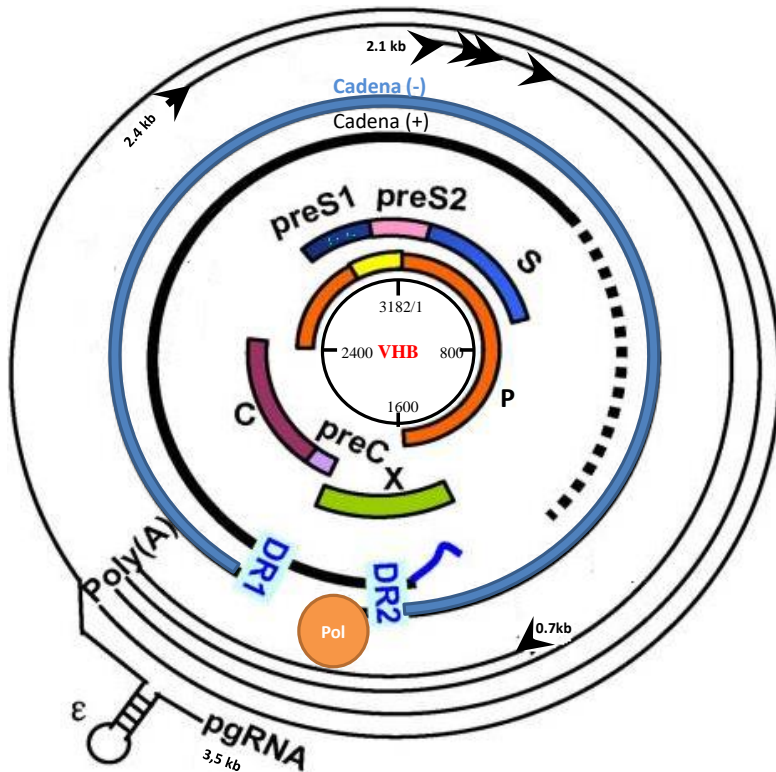


Figura 1. Representación esquemática del genoma del VHB. Imagen modificada de Gish *et al.* 2015 y Tong *et al.* 2016 (17, 22).

1.1.3 Ciclo biológico del VHB (figura 2)

- Unión y entrada del virus en la célula

El VHB entra en el hepatocito a través del receptor polipeptídico de cotransporte sodio-taurocolato (NTCP) (23) y la envoltura viral se rompe, libera la nucleocápside al citoplasma, y ésta se dirige al núcleo conducida por la señal de localización nuclear presente en la proteína del *core* (24, 25).

- Transcripción

La nucleocápside se puede desintegrar en la membrana nuclear liberando el ADN viral para su posterior transporte al núcleo celular y,

una vez en el núcleo de los hepatocitos, el genoma infectante se convierte en un ADN circular cerrado covalentemente (ADNccc) por acción de la polimerasa viral. La cadena negativa del ADNccc sirve de molde para la transcripción de los distintos ARN virales mediante la ARN polimerasa II del hepatocito. Se generan cinco transcritos de ARN, dos de ellos genómicos y tres subgenómicos.

- Traducción

En el citoplasma, el ARN pregenómico (pgARN) se traduce en la proteína del *core* y la polimerasa viral, el ARN subgenómico se traduce en las tres proteínas de la envuelta y la proteína X.

- Encapsidación

Posteriormente, se ensamblan las nucleocápsides en el citosol, y durante este proceso una molécula de ARN genómico junto a la polimerasa viral se incorporan al *core* viral (17).

- Reversotranscripción

Tras la encapsidación del ARN viral, la reverso transcriptasa empieza la síntesis de las dos cadenas de ADN de forma secuencial. La primera cadena en sintetizarse es la negativa y lo hace a partir del pgARN encapsidado que actúa como molde para la retrotranscripción y que es degradado por la función de ribonucleasa H (RNAasa H) que posee la polimerasa viral.

- Síntesis de ADNccc y/o liberación de las partículas virales

La partícula del *core* que contiene el genoma de ADN ya formado puede entonces regresar al núcleo para la síntesis de nuevo ADNccc o bien las nucleocápsides maduras (con ADN parcialmente de doble cadena) se recubren en el retículo endoplasmático con una envuelta lípido-proteica característica, son transportadas al aparato de Golgi y desde allí son liberadas al espacio extracelular (26).

Las proteínas de la envuelta tras ser sintetizadas en los ribosomas de los hepatocitos, inicialmente se insertan en la membrana del retículo endoplasmático para posteriormente formar en el lumen del retículo endoplasmático partículas S no infecciosas compuestas sólo por proteína S y lípidos.

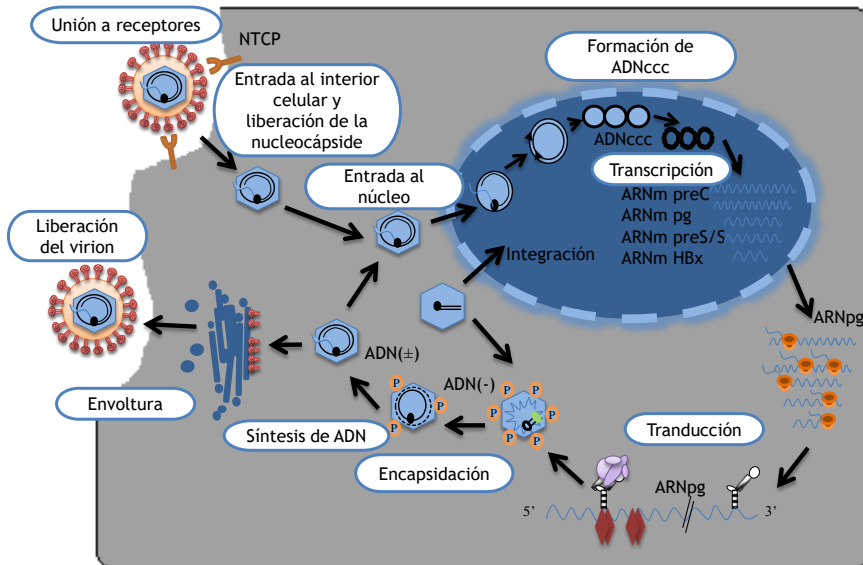


Figura 2. Ciclo biológico del virus de la hepatitis B. Modificada de Tong *et al.* 2016 (22)

1.1.4 Clasificación

El VHB se clasifica en nueve subtipos serológicos (adw2, adw4, adr, adrq-, ayw1, ayw2, ayw3, ayw4 y ayr) basándose en los determinantes antigénicos del antígeno de superficie (27).

En 1988, Okamoto *et al.* fueron los primeros en clasificar el VHB en genotipos (28). Actualmente, basándose en una divergencia genética de >7,5% en el genoma completo hay descritos 10 genotipos distintos del VHB (A, B, C, D, E, F, G, H, I y J) (29-31).

Cuando la divergencia es mayor al 4% pero inferior al 7,5% de la secuencia nucleotídica del genoma completo se describen los subgenotipos (32). Se han descrito numerosos subgenotipos dentro de los genotipos A-D y F (30).

Divergencias menores al 4% en el genoma completo del VHB determinan la existencia de los distintos “clados” (33).

Kramvis y otros autores han estudiado la relación entre los subtipos serológicos del VHB y los distintos genotipos y subgenotipos del virus (28, 29, 31, 34-36). Existe una correlación amplia y estadísticamente

significativa entre los subtipos serológicos y los genotipos, y en algunos casos, los subtipos serológicos pueden usarse para diferenciar subgenotipos (33). Sin embargo, los datos analizados son escasos y son necesarios más estudios. Además, se ha visto que un mismo subtipo puede clasificarse en diferentes genotipos (31, 37) (Tabla 1).

Tabla 1. Relación entre los genotipos, subgenotipos y subtipos serológicos del VHB

| Genotipo | Subgenotipo | Subtipo serológico |
|----------|---|--------------------|
| A | A1 | adw2/ayw2 |
| | A2 | adw2 |
| | quasi-subgenotipo A3 (A3,A4,A5) | ayw1 |
| | A4 (A6) | ayw1 / adw4* |
| B | B1 | adw2 |
| | B2 | adw2 |
| | quasi-subgenotipo B3 (B3, B5, B7-B9, B6 China) | adw2 |
| | B4 | ayw1/adw2 |
| | B5 (B6) | adw2 / adr* |
| C | C1 | adr |
| | quasi-subgenotipo C2 (C2, C14, secuencias no definidas) | adr |
| | C3 | adr |
| | C4 | ayw2/ayw3 |
| | C5 | adw2 |
| | C6-C12 | adr |
| | C13-C15 | adr |
| | C16 | ayr* |
| D | D1 | ayw2 |
| | D2 | ayw3 |
| | D3 | ayw2/ayw3 |
| | D4 | ayw2 |
| | D5 | ayw3/ayw2 |
| | D6 | ayw2 / ayw4*/adw3* |
| E | | ayw4 |
| F | F1 | adw4 |
| | F2 | adw4 |
| | F3 | adw4 |
| | F4 | adw4 / adw2*/ayw4* |
| G | | adw2 |
| H | | adw4 |
| I | I1 | adw2 |
| | I2 | ayw2 |
| J | | ayw3 |

*Subtipo raro en este genotipo. Tabla modificada de UpToDate 2018 "Clinical significance of HBV genotypes" y Kramvis *et al.* 2014 (31, 37).

1.1.5 Variabilidad genética

La variabilidad genética del virus de la hepatitis B se debe a la mutación natural y a la recombinación.

La tasa de mutación es alta debido fundamentalmente a que la reverso transcriptasa carece de función correctora de errores. Sin embargo, como consecuencia de las restricciones del solapamiento de los marcos abiertos de lectura y la presencia de ARN secundario codificado por regiones no solapantes, la tasa de mutación de las diferentes regiones del genoma del VHB varía (38, 39). Se estima que la tasa de sustitución de nucleótidos por lugar y por año es de $1.4-3.2 \times 10^{-5}$, lo que supera en 10 veces la tasa de otros virus ADN y en 100 veces la del genoma humano (32).

La recombinación es otro mecanismo potencial para el desarrollo de cepas divergentes de VHB y se ha descrito entre diferentes genotipos del virus (40). Es frecuente la coexistencia de más de un genotipo con alta prevalencia en una determinada región, especialmente para los genotipo B y C en zonas de Asia y el Pacífico, o los genotipos A y D en los países occidentales. Por lo tanto, la infección mixta con diferentes genotipos del VHB no es infrecuente y tiene interés virológico y clínico (41). La coinfección con diferentes genotipos de VHB conduce además a la recombinación de diferentes cepas virales (42). La recombinación intergenotípica de cepas de VHB se ha descrito ampliamente. La mayoría de recombinantes son híbridos B/C o A/D. Los genotipos A y C mostraron una mayor tendencia a la recombinación con otros genotipos (43). Analizando en torno a 3400 secuencias completas de VHB, Shi *et al* identificaron 44 patrones de recombinación intergenotípica. Sólo los genotipos H y J no mostraron recombinación, frente al genotipo I que está compuesto exclusivamente de recombinantes y al 93% del genotipo B que son recombinantes. Los puntos de recombinación ocurren más frecuentemente en las regiones *precore* (PC) y del promotor basal del *core* (BCP), con puntos de la región que codifica el antígeno de superficie y la región del *core* (8, 40, 44).

Debido a su alta variabilidad genética, el VHB existe como una quasi-especie viral, una población viral heterogénea compuesta por genomas muy similares pero no idénticos (45). La cepa predominante

se selecciona en base a factores como la respuesta inmune del huésped, la capacidad de replicación viral y las presiones externas como por ejemplo la terapia antiviral (46). Las mutaciones en la región *precore* (PC) y la región del promotor basal del *core* (BCP) son las más frecuentes y tienen como resultado la reducción o supresión total de la producción de HBeAg.

Dentro de los marcadores moleculares del VHB, además de los genotipos, se han descrito grupos de variantes genéticas que se observan con una frecuencia significativa en muestras de pacientes y que son de especial interés en el curso de la infección por el VHB ya que constituyen potenciales marcadores virológicos de la infección por este virus al demostrar que tienen implicaciones en el diagnóstico, patogénesis y tratamiento de la HBC. Entre estas variantes encontramos las de la envuelta viral, las de la región *precore/core*, y las de la polimerasa viral. Estas últimas asociadas a la resistencia antiviral.

1.1.5.1 Variantes en el gen S

Se han descrito variantes con mutaciones de aminoácidos en el HBsAg dentro y en las cercanías del determinante “a”, delimitado por los aminoácidos 121 a 149 de la región S, que pueden escapar a la protección de la vacuna. Además, la generación de estos mutantes de escape en el gen S puede ocasionar también reactivaciones del VHB en pacientes previamente inmunizados con anti-HBs, así como errores en el diagnóstico serológico de la hepatitis B, cuando éste se basa en la detección del HBsAg (30, 47-49).

1.1.5.2 Variantes en PC y PBC

Las variantes de la región *precore/core* (preC-C) son aquellas que impiden o disminuyen la expresión del HBeAg.

Las principales variantes que impiden la expresión del HBeAg contienen en su mayoría cambios en la región del promotor basal del *core* (PBC), principalmente la doble mutación A1762T y G1764A (30). Por estos motivos no se puede considerar al HBeAg

estrictamente como un marcador de replicación viral, ya que su negatividad no se relaciona con la ausencia de replicación.

Por lo que se refiere a su significado clínico, la presencia de estas variantes (junto a la delección pre-S) suele asociarse a determinados genotipos virales y a formas más graves de enfermedad hepática con progresión a cirrosis y CHC, habiéndose incluso asociado alguna de ellas con el proceso de hepatocarcinogénesis y con casos de hepatitis fulminante (50). A este respecto, se ha descrito que el llamado genotipo mutacional complejo (MCG), que agrupa a las 8 mutaciones más frecuentes en las regiones X/PC (G1613A, C1653T, T1753V, A1762T, G1764A, A1846T, G1896A y G1899A) puede ser utilizado como indicador de riesgo para el desarrollo de CHC, pudiendo servir de guía en el algoritmo de cribado de éste en pacientes con HBC (30).

Por otra parte, la influencia de estas variantes sobre la respuesta a los agentes antivirales es controvertida ya que existen muy pocas evidencias sobre su utilidad como factores pronóstico a dicha respuesta.

1.1.5.3 Variantes en el gen POL

Tal y como se comentará más adelante, la terapia antiviral es la única opción para prevenir la progresión de la enfermedad crónica en la infección por el VHB. El objetivo de ésta es reducir la carga viral al nivel más bajo posible, para asegurar un grado de supresión virológica que conduzca a la remisión bioquímica, mejora histológica y a la prevención de las complicaciones. Además, la reducción sostenida de la carga viral a niveles indetectables también es necesaria para reducir el riesgo de resistencia a análogos de nucleós(t)idos (NUC), ya que el principal problema concerniente al tratamiento prolongado con estos antivirales es sin duda la selección de variantes portadoras de mutaciones que les confieren resistencia (47).

Actualmente, la terapia antiviral oral con los agentes de mayor potencia y barrera genética como el ETV y TDF se ha convertido en el pilar del tratamiento de la HBC, principalmente debido a los efectos de su supresión viral potente y duradera y también debido en parte a la

sencillez de su dosificación diaria y a la ausencia significativa de resistencias y efectos adversos (47, 51).

Las mutaciones de resistencia se seleccionan en diferentes regiones del gen de la polimerasa y son específicas de cada fármaco o familia de fármacos, aunque también se han identificado mutaciones que pueden conferir resistencia cruzada entre los diferentes antivirales. Entre estas sustituciones destacan para los L-nucleósidos las mutaciones en la región YMDD (rtM204V/I) y la mutación rtL180M que les confieren resistencia en los análisis *in vitro*.

En los alquilfosfonatos, la resistencia a Adefovir (ADV) se ha asociado al cambio de aminoácido rtA181T y rtN236T en los dominios B y D de la polimerasa del VHB. Por lo que se refiere al Tenofovir, señalar que su elevada barrera genética para el desarrollo de resistencias hace que la emergencia de éstas en los pacientes a tratamiento sea excepcional.

Por último, aunque la resistencia a ETV (D-ciclopentano) es infrecuente (<1,2%) en los pacientes naïves a NUC, sin embargo el riesgo es alto en pacientes que presentan o presentaron resistencia a lamivudina (LAM). Ésta se caracteriza por la presencia o selección de mutaciones en diferentes dominios de la polimerasa.

Por lo tanto, el estudio de estas variantes genéticas (junto con la monitorización de la carga viral) se presenta como una herramienta virológica clave para un correcto manejo terapéutico de los pacientes con HBC.

Sin embargo, dadas las pautas actuales de manejo del tratamiento de la HBC, la identificación de sustituciones de aminoácidos asociadas con la resistencia tiene poco valor clínico, ya que esta información rara vez influye en la elección de la terapia. Por lo que las pruebas de resistencia generalmente no se están recomendando ni solicitando, al asumirse que los incrementos en la carga viral son indicativos de la resistencia antiviral. No obstante, la resistencia a los NUC solo puede ser confirmada con ensayos genotípicos o fenotípicos en el laboratorio, y es especialmente concluyente su determinación con la presencia de la mutación cruzada A181V/T que puede implicar la excepcional administración combinada de ETV y TDF (47).

1.2 GENOTIPOS

1.2.1 Genotipos del VHB y su filodinámica

1.2.1.1 Genotipo A y sus subgenotipos

El genotipo A se caracteriza por una inserción de 6 nucleótidos en el extremo carboxilo terminal del gen *core*. El genotipo A se clasifica en los subgenotipos A1, A2, A4 y el quasi-subgenotipo A3(31).

El genotipo A es el segundo más ubicuo. El subgenotipo A1 se extiende por el sur y este de África y el sur de Asia y América. El subgenotipo A2 es el más extendido por Europa y norte de América y también se encuentra en el sur de África (52).

Hannoun *et al.* han sugerido que el origen del genotipo A está en África y han planteado la hipótesis de que los navegantes portugueses en el siglo XVI y XVII hayan traído a Europa el subgenotipo A2, así como el subgenotipo A1 haya llegado a Asia como consecuencia del comercio y los viajes entre África y el sur de Asia (53).

1.2.1.2 Genotipo B y sus subgenotipos

Basándose en la filogenia y en una divergencia genética de >4%, los subgenotipos de B se han clasificado en: B1, B2, B4-B6 y el quasi-subgenotipo B3 (44). El subgenotipo B1, presente predominantemente en Japón, y B5, presente en población Inuit Canadiense, representan el genotipo B sin recombinación con el genotipo C en la región *precore/core*, al contrario de lo que ocurre con los demás subgenotipos de B (54). El subgenotipo B1 fue probablemente el antecesor de B5, siendo portado por población indígena durante la migración desde Alaska y Siberia hacia América del Norte y Groenlandia (55, 56).

1.2.1.3 Genotipo C y sus subgenotipos

El genotipo C es el genotipo de VHB más antiguo (57). Tiene el mayor número de subgenotipos, C1-C16, lo que refleja la larga

duración de su endemicidad en humanos (58). El subgenotipo C4 está descrito únicamente en población indígena del norte de Australia que desciende de un grupo fundador que emigró desde África hace más de 50.000 años (59, 60).

1.2.1.4 Genotipo D y sus subgenotipos

El genotipo D es el más prevalente en el norte y este de Europa, en el este y centro del área mediterránea, norte de África y Este medio, pero también presenta una alta prevalencia en el subcontinente Indio y ciertas islas del Océano Índico, además también se ha identificado en Oceanía (52). Estudios recientes han concluido que el genotipo D se clasifica en 6 subgenotipos (D1-D6) (31). El subgenotipo D1 es el más prevalente en Grecia, Turquía y norte de África; el D2 predomina en el noreste de Europa y Albania; y el D3 en Italia y Serbia (52). El subgenotipo D4, presente en población aborigen de Papúa Guinea y Australia (35) y en un pequeño porcentaje de población Inuit Canadiense (56), es de aparición temprana durante las migraciones humanas intercontinentales. Es más, se ha descrito un recombinante del subgenotipo D4 en Sudán. Es posible que el subgenotipo D4 sea originario de África y con el tiempo haya sido reemplazado por otros subgenotipos de D (61). El subgenotipo D5 parece ser el más antiguo de los subgenotipos de D (62), pero otros estudios filogenéticos no apoyan esta hipótesis (57, 61).

Una reconstrucción filogeográfica del genotipo D en Europa y la cuenca Mediterránea indica que éste genotipo se originó en la segunda mitad del siglo XIX en India y que probablemente el subgenotipo D5 fue el primero en divergir. Después los subgenotipos D1-D3 divergieron en Asia central y se expandieron a Europa y la cuenca Mediterránea por dos vías: una ruta suroeste (relacionada con la expansión de D1), a través del Medio Este y que alcanzó el norte de África y el sureste Mediterráneo, y una ruta noroeste (asociada a D2) que cruzó la Unión Soviética y alcanzó el este de Europa y el Mediterráneo a través de Albania (63).

1.2.1.5 Genotipo E

El genotipo E se corresponde con un único subtipo serológico ayw4 y se diferencia del resto de genotipos por una delección en la región preS1. Este genotipo es endémico en el oeste y el norte de África y tiene una baja diversidad genética, lo que indica una emergencia reciente de menos de 200 años (64). Al contrario de lo que ocurre con el subgenotipo A1, el genotipo E no se ha dispersado por el mundo con el comercio de esclavos lo que indica que su aparición es posterior (65). El genotipo E se encuentra en casi exclusivamente en África y en descendientes de africanos. Algunos estudios datan el antecesor común más reciente de este genotipo en 130 años y otros en 6000 años, lo que sugiere que podría haber sido reintroducido recientemente (65).

1.2.1.6 Genotipo F y sus subgenotipos

Todo el genotipo F pertenece al subtipo serológico adw4 y se clasifica en los subgenotipos F1-F4. Se encuentra en poblaciones amerindias de América Central y Sudamérica, así como en Alaska (31).

El subgenotipo F1 es muy prevalente en América Central, Alaska y sureste americano; el F2 es muy prevalente en Venezuela y también está presente en Brasil; F3 está presente en el centro (Panamá) y norte de América Latina (Colombia y Venezuela) y F4 está presente en Bolivia y Argentina (52).

Los estudios filodinámicos del genotipo F y sus subgenotipos no son concluyentes por la falta de acuerdo en relación a la tasa de sustitución del virus.

1.2.1.7 Genotipo G

El genotipo G se caracteriza por una inserción de 36 nucleótidos en la región del *core* y dos codones de parada en las posiciones 2 y 28 de la región *precore/core*, lo que impide la expresión de HBeAg (66). Por esta razón, algunos autores sostienen la hipótesis de que el

genotipo G sólo puede establecer infección crónica en presencia de otros genotipos del virus, más frecuentemente el subgenotipo A2 (67, 68). El genotipo G es menos divergente que el genotipo E. Se cree que tiene un origen africano (66, 67).

1.2.1.8 Genotipo H

El genotipo H prevalece en población mejicana, tanto indígena como mestiza, lo que apoya la hipótesis de una larga historia en los descendientes de los aztecas previa a la llegada de los Europeos (69). Está estrechamente relacionado con el genotipo F.

1.2.1.9 Genotipo I y sus subgenotipos

El genotipo I fue propuesto en 2008 tras la secuenciación del genoma completo de una única cepa presente en un hombre vietnamita (70). Se describieron dos subgenotipos, I1 e I2, con los subtipos virológicos adw2 y ayw2, respectivamente (71).

La amplia distribución geográfica del genotipo I sugiere que ha sido endémico en gran parte de Asia durante mucho tiempo. El genotipo I es un recombinante de los genotipos A, C, G y un genotipo indeterminado. Cuando se analiza el genoma completo se observa similitud genética con el genotipo C, mientras que si se analiza solo la polimerasa se asemeja al genotipo A (72).

1.2.1.10 Genotipo J

Esta cepa se aisló de un único hombre Japonés con carcinoma hepatocelular (73). Locarnini *et al.* concluyeron que el genotipo J era un recombinante en la región S del genotipo C y una cepa de VHB de gibón (42). Aunque el genotipo J cumple los criterios para ser clasificado como un nuevo genotipo, puede representar una transmisión cruzada entre especies, por lo que se requieren más estudios para confirmar su existencia.

1.2.2 Métodos de identificación del genotipo

Varios son los métodos de genotipado de VHB desarrollados hasta la fecha. Todos ellos presentan unas características de sensibilidad, especificidad, tiempo de respuesta y coste variables. Las técnicas de genotipado más comunes se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Técnicas de genotipado del VHB más comunes (Modificada de Madan *et al.* 2012).

| Técnica de genotipado | Ventajas | Desventajas |
|-----------------------|---|--|
| Secuenciación directa | Técnica de referencia Detecta genotipos nuevos | Alto coste y laboriosa |
| INNO-LIPA | Sencilla, barata y detecta coinfecciones | Mayor coste que ELISA y PCR La presencia de SNPs en posiciones iniciales puede afectar a la detección |
| RFLP | Sencilla, barata y detecta coinfecciones | La presencia de SNPs en posiciones iniciales puede afectar a la detección |
| ELISA | Sencilla, barata y aplicable a gran número de muestras, no requiere PCR | Resultados indeterminados hasta en el 23% de los casos |
| PCR Multiplex | Alta sensibilidad, rápida, alto rendimiento | La presencia de SNPs en posiciones iniciales puede afectar a la detección |
| PCR tiempo real | Alta sensibilidad, rápida y contaminación cruzada poco probable | La presencia de SNPs en posiciones iniciales puede afectar a la detección |
| ADN Microarray Chips | Alta sensibilidad, rápida, alto rendimiento y detecta mutaciones | Alto coste La presencia de SNPs en posiciones iniciales puede afectar a la detección |

ADN: ácido desoxirribonucleico; ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay): inmunoensayo enzimático; PCR (polymerase chain reaction): reacción en cadena de la polimerasa; RFLP (restriction fragment length polymorphism): polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción; SNP (single nucleotide polymorphism): polimorfismo de un único nucleótido.

El método de referencia es la secuenciación completa del genoma seguida del análisis filogenético conjunto de las secuencias generadas y de las secuencias de referencia. Aunque este método es muy sensible y permite la detección de nuevos genotipos y de genotipos recombinantes, es un método caro y requiere mucho tiempo para su realización, y además presenta como desventaja principal la detección únicamente del genotipo predominante en la mezcla. Una alternativa a la secuenciación completa del genoma es el análisis de un solo gen (37). La sensibilidad de la secuenciación de un solo gen depende del grado de homología de la secuencia así como del tamaño de ésta (74, 75).

TRUGENE VHB Genotyping kit (Siemens Medical Solutions Diagnostics, NY, USA) es un kit comercial de secuenciación directa actualmente en desuso. Es un kit dos en uno ya que se pueden detectar simultáneamente el genotipo y las mutaciones de la secuencia en muestras de suero o plasma (76). Actualmente en el mercado hay disponible otro kit comercial de secuenciación directa, Abbott VHB sequencing assay® basado en la tecnología de PCR a tiempo real y secuenciación de tipo Sanger de la región codificante de la polimerasa del genoma viral. Este kit también es capaz de detectar simultáneamente el genotipo viral y la resistencia a fármacos (77).

Las técnicas de hibridación reversa (INNO-LiPA) han demostrado ser útiles para el genotipado y además pueden identificar las infecciones mixtas (74).

También se puede determinar el genotipo del VHB con técnicas de inmunoensayo enzimático (ELISA “Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay”) usando anticuerpos monoclonales frente a epítomos específicos de cada genotipo en la región preS2 (78).

Otra alternativa es el RFLP (Restriction fragment length polymorphism) que se basa en la amplificación por PCR del gen S, la digestión con enzimas de restricción y la separación de los fragmentos por electroforesis (79).

También se han desarrollado numerosas PCR multiplex (80-83) para el genotipado de VHB.

La espectrometría de masas (MALDI-TOF) constituye un prometedor método de genotipado por su rapidez, facilidad de

automatización y por tanto, capacidad de manejo de grandes volúmenes de muestras y lo más importante, por obtener resultados que concuerdan en gran medida con los obtenidos por secuenciación (84).

El subtipado serológico es otro método de genotipado que tiene utilidad en los estudios epidemiológicos y de *screening* poblacional por su bajo coste, su fácil realización y su alto rendimiento (75, 85). Además se ha demostrado en un estudio de Laperche *et al.* que el subtipado serológico es superior a los estudios moleculares para genotipar portadores de VHB con carga viral indetectable.

Otras técnicas descritas para genotipar VHB son *Oligonucleotide microarray chips*, *Flow-through reverse dot blot* (FT-RDB), *Restriction fragment mass polymorphism* (RFMP), *PCR invader assay* y PCR en tiempo real (76).

1.2.3 Prevalencia y distribución de genotipos

1.2.3.1 A nivel global

Aproximadamente un 30% de la población mundial muestra evidencia serológica de infección actual o pasada por VHB (86). Se estima que hay 257 millones de personas en el mundo con infección crónica por el virus de la hepatitis B (87). El 15-40% de las personas infectadas desarrollarán una enfermedad grave, resultando en 1.2 millones de muertes al año (9).

La hepatitis B crónica es endémica en el Sur de Asia, China, África sub-sahariana, Micronesia y Polinesia, y las poblaciones indígenas de Alaska, norte de Canadá, Groenlandia, Australia y Nueva Zelanda. En estas regiones de alta prevalencia, más del 7% de la población está crónicamente infectada por VHB (88). Aproximadamente un 45% de la población mundial vive en zonas con alta prevalencia (89). En regiones del sur de Europa Central y del Este, la cuenca amazónica, medio Este y la India las tasas de prevalencia son moderadas, en torno a 2-7% (90). Son regiones de baja prevalencia de hepatitis B crónica (<2%) el norte de América, Reino Unido y norte de Europa (9).

Los genotipos del virus de la hepatitis B presentan una distribución etno-geográfica característica (figura 3 y tabla 3). Algunos de ellos son ubicuos, como el genotipo A, que está presente en el noroeste de Europa, Norte América y África Central, y el genotipo D, que pese a estar presente en todo el mundo es más prevalente en el área Mediterránea, Este Medio y sur de Asia (35, 91). Los genotipos B y C se encuentran sólo en Asia (28), el genotipo E en África subsahariana y el F en América del Sur y América Central (35, 92). El genotipo G se ha encontrado en Francia y Estados Unidos (93), mientras que el genotipo H parece encontrarse solamente en América Latina (94).

Más recientemente, se han propuesto dos nuevos genotipos, el primero de ellos, el genotipo I, presente en el noroeste de China, este de la India, Laos y Vietnam. Y el segundo, genotipo J, aislado en un paciente Japonés con carcinoma hepatocelular (52).

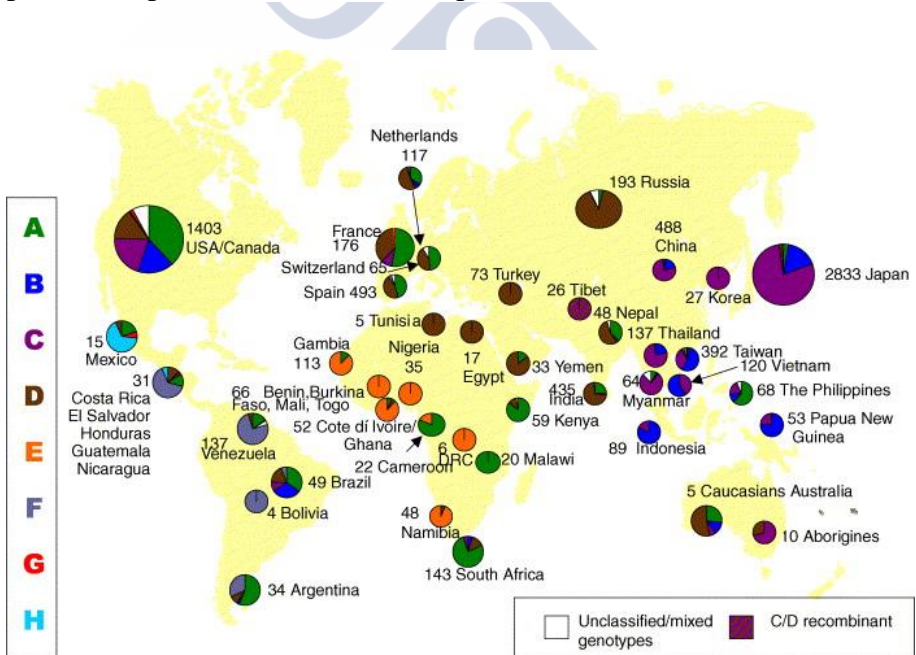


Figura 3. Distribución global de los ocho genotipos del virus de la hepatitis B. Los números al lado de los gráficos circulares son el número de aislamientos genotipados. El tamaño del gráfico circular se ajustó para que todos los segmentos del gráfico circular estén visibles (95). Con permiso de Elsevier.

Tabla 3. Prevalencia de genotipos del VHB en las distintas áreas geográficas. Adaptada de Croagh CMN *et al.* 2015(30)

| Área geográfica | Distribución de genotipos |
|---|---|
| África subsahariana (Egipto, Argelia, Libia) | Genotipo D |
| Oeste de África (Guinea Bissau, Ghana, Camerún) | Genotipo E y también A |
| África central | Genotipo E y también A |
| Este de África (Malawi, Tanzania) | Genotipo A |
| Sur de África | Genotipo A |
| Cuenca mediterránea europea | Genotipo D. Genotipo A también en España |
| Oeste de Europa | Mezcla de genotipos A y D |
| Este de Europa | A (República Checa, Polonia) y D (Rusia, Croacia, Rumanía) |
| Norte de América | Mezcla de genotipos A y D. Genotipos F y B en nativos de Alaska |
| América central | Genotipo H (México) Genotipo F (Costa Rica) |
| Sur de América | Genotipo F predominante y Genotipos A y D en Brazil/Argentina |
| Oeste de Asia (Irán, Yemen, Arabia Saudí, Turquía) | Genotipo D |
| Asia central (Uzbekistán, Tajikistán, Afganistán, Pakistán) | Genotipo D |
| Sur de Asia (India, Pakistán) | Genotipo D en India pero también Genotipo A |
| Australia | Genotipo A, B, C y D |

1.2.3.2 Europa

En zonas del este y sur de Europa, la prevalencia de hepatitis B crónica es mayor que en el resto de Europa. Se estima que 4.49 millones de personas tienen hepatitis B crónica en el continente europeo. En 2013, los países europeos reportaron un total de 13.629 casos de hepatitis B crónica (7.4 casos por 100.000 habitantes) al ECDC.

Los datos sobre las prevalencias de los distintos genotipos del VHB en Europa son limitados (96-102). Los genotipos A y D se han visto que son los prevalentes en la cuenca mediterránea (103). Sin embargo, no hay datos en relación a los subtipos antigénicos

asociados a estos genotipos y el origen de algunas cepas encontradas no pudo ser evaluado.

En los países de la cuenca mediterránea, en particular Grecia, Italia y España, el genotipo D es el genotipo predominante. El genotipo D también se encuentra en un 50% de los casos de Europa del Este, con el genotipo A en el 30% aproximadamente. Aunque algunos países tienen una proporción mayor de genotipo A, como Polonia (86%) y República Checa (67%), el genotipo D se encuentra en la mayoría de los pacientes de Rusia (93%), Rumanía (67%) y Croacia (80%). Las proporciones de genotipos A y D son similares (30-40%) en el resto de Europa con contribuciones menores de otros genotipos como el B y el C, debido mayormente a las migraciones (30).

Un estudio de Amsterdam sugiere que la distribución de genotipos en el Oeste de Europa está influenciada significativamente por la llegada de portadores de VHB desde otros continentes (104). Por esta razón, se espera que la epidemiología molecular del VHB cambie en los países con una alta tasa de inmigración (36).

En 2015, Bissinger *et al.* estudiaron un total de 408 pacientes seguidos en un centro alemán, de los cuales más del 85% eran inmigrantes o descendientes de inmigrantes. Realizaron el genotipado de 276 de estos pacientes y encontraron que el genotipo D era el más frecuente seguido del genotipo A (68,1% y 19,9%, respectivamente). Con sus resultados concluyeron que la distribución de genotipos de VHB estaba estrechamente relacionada con la tipología de inmigración y con el patrón geográfico de origen. También encontraron que sólo en los pacientes de Europa Central el genotipo A era predominante (55.8%) seguido por el genotipo D (38.5%) (105).

En 2011 se realizó en Grecia un estudio epidemiológico en 135 pacientes con infección crónica por VHB y se obtuvo la siguiente distribución de genotipos: 98% de genotipo D, 1% de genotipo A y 0,5% de genotipo B así como de genotipo C (102).

En Montenegro en el año 2015 Vratnica *et al.* llevaron a cabo un estudio de prevalencia y distribución de genotipos y subgenotipos en 150 pacientes infectados crónicamente por VHB y obtuvieron que los subgenotipos D2 y D3 eran los más prevalentes (representando un

36,8% y 32,3%, respectivamente) seguidos por el subgenotipo A2 (19,8%) y el D1 (5,1%) (106).

1.2.3.3 España

Según se puede consultar en la web del *Center for Disease Control and Prevention* (107) actualmente en España la prevalencia de infección crónica por el VHB se encuentra por debajo del 2%, prevalencia baja. Los estudios realizados en España sobre la prevalencia de HBC son escasos (12, 36, 98, 108-110).

La posición geográfica de España, junto a las relaciones históricas con el continente americano, hacen que éste país sea la principal puerta de entrada en Europa de inmigrantes procedentes de África y América Latina, y como consecuencia de la importación de cepas exóticas de VHB que pueden emerger en Europa (36).

Pocos estudios se han hecho en nuestro país de la prevalencia y distribución de genotipos del VHB, si bien en todos ellos se concluye que los genotipos A y D son los predominantes.

Sánchez-Tapias *et al.* en el año 2002 encontraron que en un total de 269 pacientes con HBC, el genotipo A representaba el 52%, el genotipo D el 35% y el genotipo F el 7% (98).

Echevarría *et al.* en el año 2004 analizaron las muestras de 278 portadores de VHB con carga viral detectable, encontrando que los genotipos A y D eran los más frecuentes (89,5%). El genotipo D era el predominante, pero su prevalencia era significativamente menor en los portadores HBeAg positivos. Se identificaron cepas de genotipo F infectando a cuatro pacientes nativos. Mientras todas las cepas de los genotipos B y C infectaban a pacientes asiáticos, el genotipo E se identificó en pacientes africanos y en dos pacientes nativos que nunca habían viajado a África (111).

Echevarría *et al.* en el año 2005 estudiaron 269 cepas de portadores de VHB que vivían en España y encontraron un 25,3% del genotipo A, 0,7% del genotipo B, 2,2% del genotipo C, 66,2% del genotipo D, 3,7% del genotipo E y un 1,9% del genotipo F. Todas las cepas de los genotipos B y C estudiadas eran de inmigrantes Chinos, y

todas menos una del genotipo E provenían de inmigrantes del África sub-Sahariana (36).

Rodríguez-Frias *et al.* en el año 2005 encontraron la siguiente distribución de genotipos en un total de 486 pacientes con HBsAg positivo: los genotipos D (48.1%) y A (39.5%) fueron los más frecuentes, seguidos de F (4.1%) y B, C y E (<1%) (108).

Pena-López *et al.* en el año 2005 realizaron el estudio de genotipado del VHB en muestras de 84 pacientes infectados crónicamente residentes en Gran Canaria y obtuvieron la siguiente distribución de genotipos: genotipo A representaba un 54,8%, D un 23,8%, F un 2,4% y el genotipo C un 1,2%. Además encontraban un 17,9% de coinfecciones por más de un genotipo (112).

Toro *et al.* en el año 2006 estudiaron el genotipo del VHB en 43 pacientes inmigrantes residentes en Canarias y concluyeron que el genotipo predominante era el D, seguido por el genotipo A (A2 y A3) y el E (113).

Basaras *et al.* en el año 2007 identificaron el genotipo de VHB en 14 pacientes con hepatitis B crónica y obtuvieron que 64,3% eran de genotipo D y el 28,6% de genotipo A, encontraron además un caso de coinfección de genotipos D y E (114).

Rivas *et al.* en el año 2013 analizaron el genotipo de VHB en un total de 34 pacientes inmigrantes de procedencia africana residentes en España infectados crónicamente por el virus y obtuvieron que los genotipos predominantes eran el A y E (64,7% y 29,4%, respectivamente) (115).

En el reciente estudio epidemiológico GEHEP 010 que analizó los datos obtenidos en un total de 5.420 pacientes infectados crónicamente por VHB y procedentes de 17 hospitales españoles se ha obtenido la siguiente distribución de genotipos de VHB: genotipo A representaba un 30,1%, genotipo B un 2,1%, genotipo C un 3,3%, genotipo D un 51,5%, genotipo E un 3,6%, genotipo F un 5,1%, genotipo G un 0,4%, genotipo H un 0,3% y un 3,6% eran coinfecciones (116).

1.2.3.4 Galicia

No hay estudios que muestren la prevalencia de la hepatitis B en nuestra Comunidad Autónoma y pocos son los trabajos sobre prevalencia y distribución de genotipos de VHB en nuestra área.

Rodríguez-Novoa *et al.* en el año 2004 encontraron la siguiente distribución de genotipos en 102 muestras de pacientes con HBC usando dos métodos distintos de genotipado. Los resultados obtenidos por secuenciación de la región YMDD fueron: 82% genotype D; 14% genotype A; 3% genotype F and 1% genotype G. Con el método de RFLP encontraron: 81% genotype D, 10% genotype A, 3% genotype C, 3% genotype F and 3% no tipables. Los resultados fueron concordantes excepto en 3 de los casos (12).

En un estudio de Costa *et al.* en el año 2016 sobre prevalencia y distribución del genotipo D en el noroeste de España, se encuentra que analizando un total de 206 pacientes infectados por el genotipo D, el subgenotipo más frecuente es el D4 (59%) seguido por el D2 (30%) (109).

Alba *et al.* analizaron en el año 2015 un total de 356 muestras de pacientes infectados por VHB en el Área Sanitaria de Santiago de Compostela y compararon la distribución de genotipos en los pacientes nacidos antes o después del año 1975, concluyendo que existía un desplazamiento en la proporción de genotipos, descendiendo el genotipo D de forma significativa mientras aumentaban paulatinamente el resto de genotipos (117).

1.3 HEPATITIS B

1.3.1 Vías de transmisión

El virus de hepatitis B se puede detectar en suero, orina, saliva, secreciones nasofaríngeas, lágrimas, secreciones vaginales, sangre menstrual y semen (89). El virus puede, por tanto, transmitirse por vía perinatal, percutánea o sexual, o por contacto directo persona-persona en presencia de llagas o heridas abiertas. La vía de transmisión más frecuente es la perinatal (118).

El predominio de las distintas vías de transmisión varía geográficamente. En áreas de alta prevalencia de la infección, como el sur de Asia y China, la transmisión perinatal y horizontal de forma muy temprana en la infancia es la más frecuente, resultando en unos altos índices de cronicidad (95% perinatal, 30% antes de los 5 años de edad). La transmisión perinatal es probable que ocurra en el nacimiento o en el período neonatal. Dada la eficacia de la vacunación intraútero, la infección es improbable que ocurra. Los factores determinantes para que se produzca transmisión vertical son el estado de HBeAg y los niveles de ADN del virus (9). En Estados Unidos la tasa de transmisión en mujeres con HBeAg positivo y sin vacunación es del 90%, comparada con un 32% en mujeres con antígeno e negativo (119). Varios estudios muestran que en la cuenca Mediterránea y África, menos del 5% de los adultos jóvenes con HBsAg positivo y de las mujeres en edad reproductiva son HBeAg positivo (120, 121).

En áreas de baja prevalencia de la infección, la expansión por vía sexual y percutánea (fundamentalmente el uso de agujas para administración de drogas) es predominante (9, 51). En este contexto, la infección por VHB se manifiesta fundamentalmente como una hepatitis aguda en la edad adulta. La progresión a enfermedad crónica es poco frecuente en adultos inmunocompetentes, ocurriendo en <1% de los casos (122, 123). Los pacientes VIH o inmunodeprimidos por otras causas tienen un mayor riesgo de cronicidad (124).

El riesgo de infectarse por vía sexual es mayor en personas con un gran número de parejas sexuales, hombres que tienen sexo con hombres (HSH) y personas con historia de otras infecciones de transmisión sexual (51).

La transmisión de VHB relacionada con las transfusiones sanguíneas es una vía poco común actualmente en los países donde se hace un cribado de HBsAg y anti-HBc en todas las donaciones (9), pero es todavía frecuente en países en vías de desarrollo (51). Las tasas de transmisión por esta vía pueden aún ser todavía menores con la introducción de técnicas moleculares para la detección de ácidos nucleicos (9).

La transmisión nosocomial de VHB todavía ocurre a pesar de la disponibilidad de vacunación y de la profilaxis post-exposición, aunque la infección por VHB en trabajadores sanitarios ha disminuido drásticamente en los países con programas de vacunación para este gremio (125). La vía más común es el contacto paciente-paciente o paciente-trabajador sanitario por pinchazos con jeringuillas o agujas de sutura o heridas hechas con bisturí. Las enfermeras, personal de diálisis, cirujanos, dentistas y sus asistentes tienen un alto riesgo de infectarse (9). La vacunación incompleta del personal sanitario, el fallo en la aplicación de las precauciones básicas y un tratamiento incorrecto de los desechos como las agujas, son las principales razones por las que ocurren los contagios. El conocimiento del estatus del paciente no previene de la exposición. Los niveles de ADN del VHB son el principal marcador de infectividad (9).

La transmisión por donación de órganos es bien conocida y todas las donaciones se someten a un cribado de HBsAg. Los donantes de hígado con anticuerpos frente al *core* positivos también pueden transmitir la infección. Esto es menos frecuente en otros tipos de trasplante como el renal (126).

El contacto doméstico y el contacto íntimo no sexual, así como vivir en condiciones de hacinamiento también son posibles factores de riesgo para adquirir la infección (51).

1.3.2 Historia natural de la enfermedad

1.3.2.1 Hepatitis B aguda

El período de incubación de la hepatitis B aguda es de 1 a 4 meses tras la infección. La presentación clínica varía, pudiendo manifestarse como una infección asintomática en dos tercios de los pacientes, una hepatitis icterica y muy raramente ocurre un fallo hepático fulminante (9). La presentación de los síntomas y el progreso de la enfermedad depende de la edad a la que se adquiere la infección (51). El cuadro clínico de la enfermedad se caracteriza por presencia de fiebre, artralgias y erupciones que pueden ocurrir en el período prodrómico, seguido de síntomas inespecíficos, anorexia, náuseas, ictericia y

malestar en el cuadrante superior derecho. Los síntomas clínicos coinciden con las alteraciones bioquímicas. El diagnóstico bioquímico de la hepatitis B aguda se caracteriza por elevación de la concentración de alanina aminotransferasa (ALT) y bilirrubina en suero. Los valores de ALT en la hepatitis B aguda son normalmente superiores a 500 UI/ml, y mayores que los niveles de AST (aspartato aminotransferasa). Las elevaciones de bilirrubina suelen ser moderadas, 5-10 mg/dl. Los síntomas y la ictericia desaparecen normalmente tras 1 o 3 meses, aunque la fatiga puede persistir más tiempo.

El fallo hepático fulminante es la complicación más grave de la hepatitis B aguda y ocurre en <0,5% de los pacientes (9).

1.3.2.2 Hepatitis B crónica

La hepatitis B aguda puede evolucionar a hepatitis crónica (HC) con tasas muy variables dependiendo de la edad en el momento de la infección y de la vía de transmisión (127). La mayoría de los casos de hepatitis B crónica (HBC) ocurre en poblaciones endémicas como resultado de la transmisión perinatal y horizontal en etapas tempranas de la vida (9). Las tasas más altas de transición de hepatitis B aguda a crónica (>80%) se han encontrado en casos de transmisión materno-fetal y neonatal de madres con HBeAg positivo (128). Durante la infancia y la adolescencia la tasa disminuye a un 20-30% y ya en la etapa adulta se sitúa en <1% de los casos, con excepción de pacientes inmunocomprometidos (127). El curso natural de la enfermedad está determinado por la interacción entre la replicación viral y la respuesta inmune del hospedador (9). Por ello, las altas tasas de cronicidad en neonatos y niños pequeños se deben a la inmadurez del sistema inmune en este rango de edad. Además, estudios de secuenciación de la cepas infectantes han revelado que es un requisito imprescindible para la cronicidad de la infección que la cepa sea salvaje (*wild type*) en su región *precore*, y por tanto, que sea productora de HBeAg (129, 130).

El HBsAg aparece en el suero a las 2-10 semanas tras la exposición a VHB y normalmente desaparece a los 4-6 meses. Los

anticuerpos anti-HBs pueden aparecer varias semanas tras el aclaramiento serológico del antígeno de superficie en pacientes que se recuperan. La persistencia de HBsAg tras 6 meses se usa para definir la transición a hepatitis crónica (51).

No todos los pacientes con infección crónica por VHB tienen hepatitis crónica. La nueva nomenclatura para los estados crónicos de VHB se basa en dos características clave de la cronicidad: infección y hepatitis (131). Es posible que tras un análisis de los marcadores de replicación viral y de actividad de la enfermedad, no sea posible la clasificación inmediata en una de estas fases tal y como se representa en la tabla 4. Se requiere una monitorización seriada de estos marcadores para la correcta clasificación y aun así es posible que algunos pacientes queden en una zona gris. Las fases de la infección crónica por VHB no son necesariamente sucesivas (Figura 4) (131).

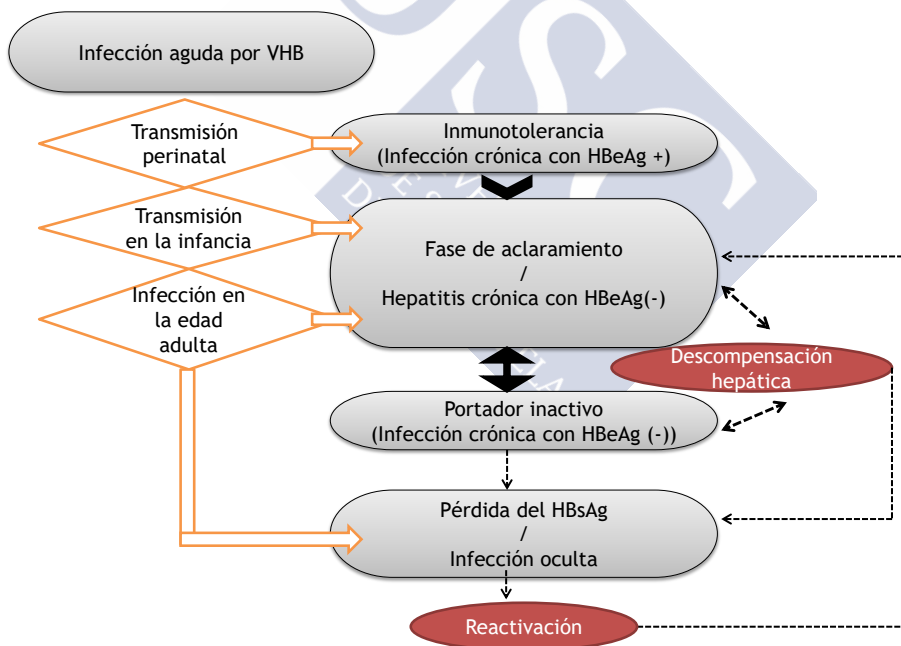


Figura 4. Historia natural de la infección aguda por VHB según la vía de transmisión. Transición dinámica entre las distintas fases de la enfermedad. Diagrama adaptado de Gish *et al.* 2015 (17)

1.3.2.2.1 Infección crónica por VHB HBeAg positivo

Esta fase de la enfermedad anteriormente denominada inmunotolerancia, y también llamada de “alta replicación y baja inflamación”, se caracteriza por altos niveles de replicación viral, con cargas virales en suero del orden de 10^{12} UI/ml, y HBeAg detectable, pero sin evidencia de enfermedad hepática activa, que se manifiesta con ausencia de síntomas, niveles de ALT normales y una histología de la biopsia hepática sin alteraciones. Hay un alto nivel de integración del ADN de VHB y una expansión clonal de hepatocitos que sugieren una hepatocarcinogénesis incipiente en este estadio temprano de la enfermedad. Una única variante prevalece sobre las quasi-especies de VHB y la respuesta específica de las células T frente a VHB es débil o indetectable (132). La fase de inmunotolerancia dura de 10 a 30 años, en los cuales se produce una tasa de aclaramiento espontáneo de HBeAg muy baja que se ha visto que es de un 15% tras 20 años de infección (133).

1.3.2.2.2 Hepatitis B crónica con HBeAg positivo

La hepatitis B crónica con HBeAg positivo o fase de aclaramiento se caracteriza por presencia de HBeAg en suero, niveles altos de ADN viral y ALT elevada. La fase de aclaramiento normalmente se alcanza en la segunda o tercera década de la vida. La transición de la fase de inmunotolerancia a la de aclaramiento viene marcada por el incremento de la inmunidad específica mediada por células T frente a VHB, disminución de la cantidad de ADN de VHB, aumento de los niveles de ALT en suero y cambios en la histología hepática. La presión inmune promueve un aumento de la diversidad de quasi-especies virales. Esta fase puede durar años, durante los cuales la actividad de la enfermedad fluctúa y los daños hepáticos se acumulan. El factor más importante que va a determinar la evolución de la enfermedad es el tiempo durante el cual la replicación viral está por encima de 2000 UI/ml. En un pequeño porcentaje de pacientes, los cambios bruscos de ALT resultan en una descompensación hepática y más raramente en la muerte por fallo hepático.

La seroconversión del HBeAg marca el final de esta fase y se corresponde con una caída brusca de la carga viral y una mejora de la histología hepática. Sin embargo, el VHB no se elimina totalmente del hígado y el ADN circular covalentemente cerrado persiste como reservorio en el núcleo de los hepatocitos.

La tasa de aclaramiento espontáneo de HBeAg aumenta hasta un 10-20% anual durante esta fase de la enfermedad (133).

El resultado de la fase de hepatitis B crónica con HBeAg positivo es variable. La mayoría de pacientes alcanzan la seroconversión del HBeAg y la supresión de ADN viral y entran en una fase de infección con HBeAg negativo. En otros, sin embargo, el control del virus falla y progresan a una fase de hepatitis B crónica con HBeAg negativo.

1.3.2.2.3 Infección crónica con HBeAg negativo

Durante la infección crónica con HBeAg negativo, también llamada fase de portador inactivo o fase de control inmune, los pacientes tienen el HBeAg negativo y están presentes los anticuerpos anti-HBe. Se establece un umbral arbitrario, 2000 UI/ml, por debajo del cual la replicación de VHB parece no tener significación clínica (134). En algunos pacientes, el ADN de VHB ya no es detectable. El daño hepático remite, normalizándose los valores de ALT y resolviéndose la actividad necroinflamatoria en la histología. La actividad de las células T que actúan específicamente contra el virus es alta y mantiene la supresión viral (135). La población de quasi-especies virales es diversa, con una selección positiva de las cepas defectivas en HBeAg que son capaces de persistir pero con una reducción del fenotipo que permite la replicación (136, 137).

La seroconversión del HBsAg se considera como la “curación”, ocurre en un 1-3% de los casos por año (138), y está asociada a un buen pronóstico, a pesar de que el genoma de VHB persiste en el hígado. Por esta razón, siempre queda un cierto riesgo de reactivación en el contexto de un posible inmunosupresión.

1.3.2.2.4 Hepatitis B crónica con HBeAg negativo

La hepatitis B crónica con HBeAg negativo o fase de escape inmunológico representa la reactivación del VHB y se caracteriza por infección crónica con HBeAg negativo, aumento de los niveles de ADN del VHB (comúnmente >2.000 UI/mL) y niveles fluctuantes de alanina aminotransferasa (ALT). Estos pacientes tienen un riesgo elevado de progresión a cirrosis, de insuficiencia hepática y de carcinoma hepatocelular.

En algunos pacientes continúan los niveles de replicación altos y la enfermedad hepática progresa, pero el HBeAg permanece negativo. Esto normalmente ocurre cuando emergen variantes del virus que son fenotípicamente HBeAg negativas y genotípicamente, presentan mutaciones en la región *precore* (PC) o en la región del promotor basal del *core* (BCP). No está claro si esta fase se produce como consecuencia de una transición suave por la fase de aclaramiento del HBeAg positivo o como consecuencia de una reactivación a partir de la fase de control inmune.

1.3.2.2.5 Infección oculta por VHB

La fase de HBsAg negativo se caracteriza por la ausencia de antígeno de superficie en suero y la presencia de anti-HBc, con o sin anticuerpos detectables frente a HBsAg. Esta fase, que también se conoce como infección oculta por VHB, se define como la presencia de ADN detectable en un paciente con HBsAg no cuantificable. En algunos casos esto se debe a la presencia de un antígeno de superficie modificado que no se detecta con los métodos comerciales. Sin embargo, en la mayoría de los casos se debe a la fuerte supresión de la expresión viral. La mayoría de estos pacientes tienen una cantidad muy pequeña de ADN de VHB en suero. Durante esta fase se puede detectar ADNccc en el hígado. El aclaramiento del HBsAg previo a la aparición de cirrosis se asocia a un mínimo riesgo de progresión de la enfermedad (cirrosis, descompensación hepática o CHC) y a una mejor supervivencia. Sin embargo, si la cirrosis se desarrolla antes de desaparecer el HBsAg del suero, el riesgo de CHC persiste (131). La

infección oculta por VHB es más frecuente en zonas endémicas de la enfermedad (9).

Mención especial requiere la hepatitis crónica adquirida en la edad adulta, que se caracteriza por una fase de inmunotolerancia ausente, con una progresión inmediata a la fase de aclaramiento inmune. La progresión de la enfermedad va a estar condicionada por el estado inmune del paciente, en los inmunocompetentes la tasa de seroconversión espontánea o inducida por tratamiento es alta y raramente progresan a estados cirróticos. Sin embargo, en los pacientes inmunocomprometidos el curso de la enfermedad suele ser más agresivo. La coinfección con VIH confiere un mayor riesgo de cirrosis y de morbilidad en relación a la enfermedad hepática (139).

Cada una de las fases de la hepatitis B crónica se asocia con unos patrones característicos de ALT, niveles de ADN del VHB, estado del HBsAg, histología hepática y respuesta a la terapia antiviral. Las distintas fases de la infección no son esenciales ni estáticas y se pueden suceder en una u otra dirección, es decir, la transición entre las distintas fases es dinámica (Figura 4) (17).

Tabla 4. Características serológicas y clínicas de las distintas fases de la hepatitis B crónica. Adaptada de EASL 2017(131).

| | HBeAg + | | HBeAg - | |
|-----------------------------|------------------------|--|-------------------|---------------------------|
| | IC | HC | IC | HC |
| Nomenclatura antigua | INMUNO-TOLERANCIA | INMUNO-REACTIVA HBeAg + | PORTADOR INACTIVO | HEPATITIS CRÓNICA HBeAg - |
| HBsAg | alto | alto/intermedio | bajo | intermedio |
| HBeAg | + | + | - | - |
| Carga viral | >10 ⁷ UI/ml | 10 ⁴ -10 ⁷ UI/ml | <2000 UI/ml | >2000 UI/ml |
| ALT | normal | elevada | normal | elevada |
| Daño hepático | no/escaso | leve/severo | no | leve/severo |

IC: infección crónica; HC: hepatitis crónica; HBsAg: antígeno de superficie; HBeAg: antígeno e; ALT: alanina aminotransferasa

1.3.3 Complicaciones de la hepatitis B crónica

La progresión de la hepatitis B crónica a enfermedades hepáticas graves, como el carcinoma hepatocelular, está determinada por las características genéticas del huésped, así como factores virales y ambientales (Tabla 5) (11, 140-142).

Las principales complicaciones de la hepatitis B crónica (HBC) son la cirrosis, la descompensación hepática y el hepatocarcinoma. Las manifestaciones extrahepáticas también pueden ocurrir. Entre el 15% y el 40% de los individuos con HBC van a desarrollar secuelas hepáticas a lo largo de su vida, con un mayor riesgo en hombres (143, 144). Se ha visto que niveles de ADN de VHB de >2000 UI/ml suponen un riesgo para la progresión clínica de la enfermedad a cirrosis y a carcinoma hepatocelular (CHC) (145, 146).

Tabla 5. Factores de riesgo asociados a la progresión de la enfermedad en pacientes con hepatitis B crónica (Modificada de Kao *et al.* 2011(141))

| | |
|-----------------------------|---|
| Factores virales | Alta carga viral |
| | Genotipo (C>B; D>A) |
| | Mutaciones en el promotor basal del <i>core</i> (BCP) |
| | Deleción en la región pre-S |
| Factores del huésped | Avanzada edad |
| | Género masculino |
| | Alteraciones genéticas |
| | Historia familiar de CHC |
| Factores ambientales | Etnicidad (Asiáticos>Caucásicos) |
| | Exposición a aflatoxina |
| | Consumo de alcohol |
| | Fumar |
| | Coinfección con VHC y/o VHD y/o VIH |
| | Diabetes mellitus |
| Obesidad | |
| Síndrome metabólico | |

1.3.3.1 Cirrosis

Los principales factores de riesgo para la progresión a cirrosis son la carga viral alta, la presencia de fibrosis en la biopsia hepática y los niveles de ALT elevados. Otros factores que pueden influir en la progresión a cirrosis son el genotipo viral, la cuantificación del antígeno de superficie, coinfección con otros virus como el virus de la hepatitis C (VHC), el virus de la hepatitis D (VHD) y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), y el consumo de alcohol (147).

Se ha visto que ciertos factores virales tienen influencia en la progresión de la enfermedad. En países asiáticos, donde los genotipos B y C predominan, se ha visto una mayor y más rápida progresión a cirrosis en los pacientes infectados con el genotipo C (148, 149). Esto se debe en parte a que los pacientes infectados con el genotipo C tienen una mayor edad cuando seroconvierte el HBeAg y de ahí el papel clave que representa una viremia prolongada. El genotipo C se asocia a una enfermedad más avanzada que el genotipo D en los países occidentales. No hay estudios que comparen todos los genotipos (9). Además del genotipo, las variantes víricas asociadas a HBC con HBeAg negativo tienen un papel patogénico. Se ha visto que están asociadas a una enfermedad progresiva y más severa. Un significativo número de pacientes con HBC con HBeAg negativo presentan cirrosis en la biopsia hepática (150, 151). La mutación BCP (promotor basal del *core*) se ha identificado como un factor de riesgo para el desarrollo de cirrosis (152). Sin embargo, el papel de la mutación en la región *precore* todavía no está establecido.

1.3.3.2 Descompensación hepática

La descompensación hepática ocurre como una complicación de la cirrosis. El riesgo de descompensación a los cinco años es de 20%-23%. Los factores de riesgo son: viremia, edad y marcadores de la función de síntesis alterados (albúmina baja, plaquetas bajas, bilirrubina alta y ascitis). Una vez que ocurre la descompensación, la supervivencia esperada en 5 años es de 14%-35% (9).

1.3.3.3 Carcinoma hepatocelular (CHC)

Hasta un 40% de los hombres y un 15% de las mujeres con infección por VHB mueren a consecuencia de la cirrosis hepática o del CHC (153). En población cirrótica, la incidencia del CHC puede ser de 8000 casos por 100.000 personas/año (154). La incidencia de CHC es menor en población blanca con hepatitis B crónica que en población asiática. Se estima que la incidencia anual de CHC es de 2%-3% en población cirrótica con HBsAg positivo y de <1% en población no cirrótica (155).

La mayoría de CHC asociado a VHB se desarrolla en pacientes cirróticos pero entorno al 20% no. Hay varios factores asociados con un aumento del riesgo de sufrir CHC (tabla 5) (51):

- Factores del huésped: edad superior a 50 años, sexo masculino, presencia de cirrosis, historia familiar de CHC, raza africana o asiática, obesidad y diabetes mellitus.
- Factores del virus: altos niveles de replicación viral, genotipo (C>B) y variantes de la región del promotor basal del *core*.
- Factores ambientales: coinfección con VHC o VHD, consumo de alcohol y aflatoxina.

1.3.3.4 Manifestaciones extrahepáticas

La hepatitis B se asocia a múltiples manifestaciones extrahepáticas que en su mayoría están mediadas por complejos inmunes circulantes (156). El pródromo de la infección aguda o síndrome artritis-dermatitis, la poliarteritis nodosa (PAN), la glomerulonefritis asociada a la hepatitis B, la crioglobulinemia mixta esencial y las manifestaciones neurológicas son las manifestaciones extrahepáticas más comunes (9).

1.3.4 Coinfección con VHD

La hepatitis D crónica constituye la forma más severa de hepatitis vírica, afectando a 20 millones de personas infectadas por VHB en

todo el mundo (157). El agente causal de la hepatitis delta es el virus de la hepatitis delta (VHD), descrito por primera vez en 1980 por Rizzetto *et al.* (158-160).

El VHD pertenece a la familia *Deltaviridae* y al género *Deltavirus*, aunque presenta una gran similitud con los viroides y virusoides que infectan plantas. Este virus es denominado comúnmente como virus satélite del VHB ya que no es capaz de producir infección en ausencia de este último (157, 161).

La estructura del VHD consta de una envuelta lipoproteica esférica constituida por el HBsAg que envuelve el virión (35-37 nm). El antígeno Delta (HDAg) y el genoma viral que consiste en una molécula de ARN de cadena sencilla circular (ARNss) con polaridad negativa y 1,7 Kb constituyen el virion (157, 161). El antígeno Delta, la única proteína codificada por el VHD, es una fosfoproteína que puede estar en dos formas: la forma corta (HDAg-S) que regula la replicación viral y la forma larga (HDAg-L) que promueve la envoltura del virión (161, 162).

El virión se adhiere a los hepatocitos mediante una interacción entre HBsAg y los receptores NTCP (polipéptido de cotransporte socio-taurocolato) presentes en la célula huésped, el virión entra en la célula y pierde su envoltura. La ribonucleoproteína se importa al núcleo de la célula para comenzar la replicación del ARN dando lugar mediante el mecanismo de círculo rodante, típico de viroides, a ARNm y ARN antígenómico, que a su vez sirve como una plantilla para nuevas transcripciones genómicas de ARN. Por su parte, el ARNm se exporta al citoplasma donde se traduce a HDAg-S y HDAg-L. Las nuevas moléculas de HDAg-S regresan al núcleo celular para apoyar la replicación de más ARN. Las dos formas de HDAg se asocian con el nuevo ARN genómico para formar nuevas ribonucleoproteínas, que se exportan al citoplasma donde interactuarán con las proteínas de la envoltura del VHB a través de HDAg-L en el retículo endoplásmico para formar nuevas partículas virales. Estas partículas por la gemación en un compartimento intermedio se exportan desde el hepatocito a través de la red trans-Golgi para volver a infectar nuevas células (157, 161, 163).

El virus Delta se transmite por vía parenteral y para que se produzca la infección es necesaria la coinfección simultánea por VHB o bien que el hospedador ya esté infectado previamente por este virus y tenga el HBsAg positivo (superinfección) (164). En caso de infección simultánea por ambos virus la tasa de curación espontánea es del 90% al contrario de lo que ocurre cuando se trata de una superinfección, que el paciente evoluciona a enfermedad crónica en el 90% de los casos (161, 163).

La infección por VHD se encuentra en todo el mundo. Sin embargo, la prevalencia e incidencia y las características clínicas y epidemiológicas varían geográficamente. En la cuenca amazónica el VHD es endémico e infecta al 70% de los infectados crónicos con VHB, mientras en África la prevalencia está entorno al 20% y en América del Norte es sólo del 1%. Se han descrito ocho genotipos (1-8) del virus Delta que se distribuyen por distintas áreas geográficas del mundo. El genotipo 1 está presente por todo el mundo y es el genotipo mayoritario. El resto de genotipos presentan una distribución más localizada, encontrándose los genotipos 2 y 4 en Taiwan y Japón, el genotipo 3 en la cuenca amazónica y los genotipos 5-8 en África (161, 163, 164).

Con el uso de la vacuna frente a VHB la circulación del virus Delta ha disminuido en los países desarrollados. Sin embargo, la inmigración es un factor a tener en cuenta por la posible llegada de pacientes originarios de zonas endémicas tanto de VHB como de VHD, lo que conlleva la posible transmisión de estos virus en países europeos (164).

Jelen *et al.* en el año 2016 realizó un estudio de la prevalencia de VHD en Eslovenia y además recogió de la bibliografía existente todos aquellos trabajos que estudiaban dicha prevalencia en diferentes países europeos. Estos autores concluyeron que ciertos países Europeos como Francia, Alemania, España y Reino Unido, debido a la inmigración desde zonas endémicas de VHD (África, Europa del Este y Turquía, fundamentalmente), la prevalencia de VHD había comenzado a aumentar (165).

Recientemente, Aguilera *et al.* han publicado un estudio de prevalencia de hepatitis delta crónica en España en el que se observa una baja prevalencia de la enfermedad en los últimos años que además va disminuyendo (166). En otro trabajo de la misma área sanitaria se ha visto que la circulación del VHD en usuarios de drogas por vía parenteral ha disminuido drásticamente (167).

El diagnóstico de la hepatitis Delta se centra en las determinaciones serológicas (búsqueda de anticuerpos IgG e IgM anti-HD) en pacientes con HBsAg positivo. En caso de seropositividad se debe hacer un estudio más amplio para diferenciar entre coinfección y superinfección pues la evolución y el manejo de la enfermedad son diferentes. También es necesario hacer determinaciones moleculares para conocer la carga viral y el genotipo (161).

El tratamiento actual frente a la hepatitis Delta es el interferón- α pegilado (PEG IFN α) o el trasplante hepático (163).

1.4 DIAGNOSTICO DE INFECCION POR VHB

Los marcadores serológicos de la infección por VHB incluyen el HBsAg, anti-HBs, HBeAg, anti-HBe, y anti-HBc IgM e IgG. El HBsAg determina la infección. Durante la infección aguda, el anti-HBc (tanto IgG como IgM inicialmente), aparece 1-2 semanas tras la aparición del HBsAg al mismo tiempo que se elevan las concentraciones de aminotransferasas, y la IgG persiste durante la infección crónica. La IgM anti-HBc puede aparecer en exacerbaciones de la hepatitis crónica pero en títulos menores a los de la infección aguda (51).

La presencia de anti-HBs implica inmunidad frente a la infección por VHB. Es el único marcador detectado en personas vacunadas y se presenta en asociación con el anti-HBc IgG en aquellos individuos que tienen una infección pasada por VHB.

En algunos casos con HBsAg negativo, el anti-HBc IgG es positivo pero el anti-HBs no, un patrón serológico que se denomina anti-HBc aislado. La mayoría de pacientes con este patrón serológico ha tenido contacto con el VHB y muchos tienen ADN del virus

detectable en el hígado e incluso algunos en suero (168), lo que se llama infección oculta (169). Los pacientes con anti-HBc aislado pueden sufrir una reactivación en un contexto de inmunosupresión, con la consiguiente reaparición del HBsAg (170).

El HBeAg y el anti-HBe se usaron en el pasado para determinar la replicación viral y la infectividad, pero actualmente están en desuso debido a la introducción de la determinación de ADN del virus.

El ADN de VHB es una medida directa de la carga viral, que muestra la replicación del virus. La mayoría de ensayos para determinar el ADN viral usan la rt-PCR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real) con un límite de detección de 10-20 UI/ml y un rango lineal de detección de 10^9 UI/ml. Las concentraciones de ADN viral durante la HBC pueden variar desde indetectables hasta 10^9 UI/ml (51).

A lo largo de los últimos años, se han aprobado en Europa y Asia ensayos comerciales para cuantificar el HBsAg. Se ha visto una correlación entre la cuantificación de HBsAg en suero y la actividad transcripcional del ADNccc (ADN circular covalentemente cerrado) en hígado, especialmente en los pacientes con HBeAg positivo (171). La monitorización de HBsAg predice la respuesta a interferón y qué pacientes con HBeAg negativo y transaminasas normales tendrán una progresión de la enfermedad (171, 172).

1.5 TRATAMIENTO

1.5.1 Objetivos del tratamiento

El objetivo final del tratamiento a largo plazo de la hepatitis B crónica es mejorar la supervivencia evitando la progresión a cirrosis e impidiendo el desarrollo de descompensación hepática, CHC y muerte. Este objetivo se consigue suprimiendo la replicación viral de forma mantenida. La infección por el VHB no puede ser erradicada por la persistencia de ADN circular covalentemente cerrado (ADNccc) en el núcleo de los hepatocitos.

Otros objetivos adicionales de la terapia antiviral son prevenir la transmisión madre-hijo, la reactivación de la hepatitis B y prevenir y tratar las manifestaciones extrahepáticas asociadas a VHB.

La probabilidad de alcanzar estas metas depende de la duración de la terapia y también de la edad del paciente y de la fase de la enfermedad en que se encuentre al empezar el tratamiento. En los pacientes con fibrosis o cirrosis establecida se pretende alcanzar la regresión de la misma.

En los pacientes con CHC, las terapias con análogos de nucleótidos buscan suprimir la replicación viral para estabilizar la enfermedad y evitar su progresión y además reducir el riesgo de recurrencia de CHC en caso de curación.

En pacientes con hepatitis B aguda, prevenir el riesgo de fallo hepático agudo o subagudo es el principal objetivo. También se busca mejorar la calidad de vida acortando el tiempo de enfermedad y disminuir el riesgo de cronificación (131).

Con la reciente aparición de los antivirales de acción directa (AAD) para el tratamiento de la VHC y a la vista de los resultados de estas terapias, se ha abierto la discusión sobre cuál es la “cura” para la hepatitis B. Al contrario que ocurre con el VHC, en el caso del VHB pese a conseguirse una respuesta viral sostenida (RVS), el riesgo de reactivación como consecuencia de una inmunosupresión o del uso de medicaciones antiinflamatorias persiste (173-176). La eliminación completa de todo el ADN viral, incluido el ADNccc de los hepatocitos, parece imposible de alcanzar (17).

Por tanto, la finalidad de las terapias frente al VHB es:

- Inducir una supresión de larga duración del ADN del virus.
- Inducir la pérdida de HBeAg, con o sin seroconversión de anti-HBe, en pacientes con el antígeno e positivo.
- Normalizar los valores de ALT.
- Inducir la pérdida de HBsAg, con o sin seroconversión del anti-HBs.

1.5.2 Indicaciones del tratamiento

La indicación de tratamiento es la misma para los pacientes HBeAg positivo y HBeAg negativo, y debe basarse en la combinación de 3 criterios (figura 5):

- Valores de ALT.
- Niveles de ADN-VHB.
- Lesión hepática valorada por biopsia hepática y/o elastometría.

Está indicado el tratamiento en:

- Pacientes con hepatitis B crónica con HBeAg positivo o negativo que presenten niveles de ADN por encima de 2.000 UI/ml y niveles de ALT en suero por encima del límite normal de 40 UI/ml o una necroinflamación o fibrosis moderada.
- Pacientes con cirrosis compensada o descompensada, con niveles de ADN detectables e independientemente de los niveles de ALT.
- Pacientes con carga viral por encima de 20.000 UI/ml y niveles de ALT superiores al doble del valor normal independientemente del grado de fibrosis.
- Pacientes con infección crónica por VHB con HBeAg positivo, con valores normales de ALT y alta carga viral, pueden ser tratados si superan los 30 años independientemente de la severidad de las lesiones hepáticas.
- Pacientes con infección crónica por VHB con HBeAg positivo o negativo e historia familiar de CHC o cirrosis y manifestaciones extrahepáticas pueden ser tratados incluso si no cumplen los criterios para la indicación de tratar.

Las indicaciones de tratamiento también deben tener en cuenta la edad del paciente, el estado de salud, el riesgo de transmisión y la historia familiar de CHC, cirrosis y manifestaciones extrahepáticas.

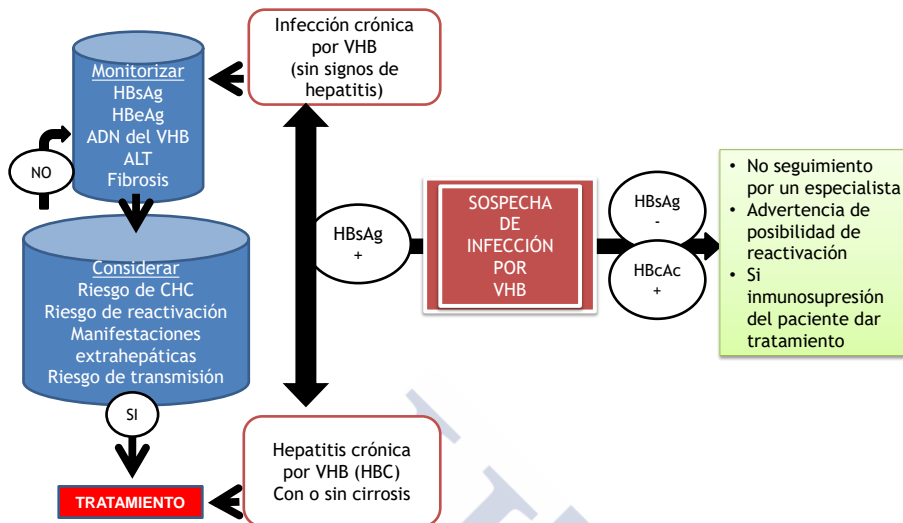


Figura 5. Algoritmo de manejo del paciente con infección por VHB. Modificado de EASL 2017 (131)

1.5.3 Monitorización de los pacientes no tratados

Los pacientes que no cumplen los criterios para ser candidatos a terapia antiviral deben ser monitorizados periódicamente con determinaciones del nivel de carga viral, nivel de ALT en suero y severidad de la fibrosis con marcadores no invasivos (131).

Los pacientes que se deben someter a monitorización son:

- Pacientes con infección crónica por VHB HBeAg positivo que son menores de 30 años (control cada 3-6 meses).
- Pacientes con infección crónica por VHB con HBeAg negativo y carga viral <2000 UI/ml (control cada 6-12 meses).
- Pacientes con infección crónica por VHB con HBeAg negativo y carga viral ≥ 2000 UI/ml (control cada 3 meses durante el primer año y luego cada 6 meses).

1.5.4 Estrategias de tratamiento

Actualmente, hay dos principales opciones de tratamiento para los pacientes con hepatitis B (tabla 6): tratamiento con análogos de nucleós(t)idos (ANs o NUC) o con interferón α (IFN α), actualmente pegilado (Peg IFN α). Los AN aprobados en Europa para el tratamiento de la hepatitis B incluyen la lamivudina (LAM), adefovir dipivoxil (ADV), entecavir (ETV), telbivudine (TBV), tenofovir disoproxil fumarato (TDF) y tenofovir alafenamida (TAF). Pueden clasificarse en los que tienen una baja barrera a la resistencia a VHB (LAM, ADV, TBV) y los que presentan una alta barrera a la resistencia (ETV, TDF, TAF).

La principal ventaja de los tratamientos con ANs de alta barrera a la resistencia es su alta eficacia antiviral a largo plazo que lleva a una carga viral indetectable en la mayoría de pacientes y su buen perfil de seguridad. Los AN se pueden usar de forma segura en todos los pacientes y son la única alternativa de tratamiento en pacientes con enfermedad hepática descompensada, trasplantados de hígado, pacientes con manifestaciones extrahepáticas, hepatitis B aguda o exacerbación severa de la hepatitis crónica. También son la única opción para prevenir la reactivación del virus en pacientes inmunodeprimidos y para prevenir la transmisión en pacientes con alta viremia.

La alta barrera a la resistencia junto a otros factores ya mencionados previamente, hace que el Entecavir y el Tenofovir sean las mejores opciones para tratar la hepatitis B crónica. Concretamente, la resistencia primaria al Entecavir se detecta solamente en el 1% de los pacientes (177). En España hasta la fecha no se había detectado ningún caso de resistencia primaria a Entecavir (178). En Europa el 2% de los pacientes tratados con Entecavir sin exposición previa a otros análogos de nucleós(t)idos presentan resistencia al mismo (177). Dado que las resistencias a los antivirales de acción directa aparecen fundamentalmente debido al incumplimiento de las pautas de tratamiento y la búsqueda primaria de mutaciones de resistencia no es crucial para el inicio del tratamiento, son muy importantes los estudios genotípicos para confirmar la resistencia.

El objetivo de instaurar un tratamiento con PegIFN α es inducir un control inmunológico a largo plazo con un tratamiento de duración limitada. La principal desventaja del tratamiento con PegIFN α es su alta variabilidad en la respuesta y su perfil de seguridad poco favorable lo que hace que muchos pacientes no sean aptos para recibir este tratamiento. La selección de pacientes de acuerdo a la actividad de la enfermedad, el genotipo de VHB, el estado de la enfermedad, la carga viral y el estado de HBsAg y HBeAg puede ser útil para determinar la probabilidad de respuesta individual al tratamiento con PegIFN α .

Teóricamente, un tratamiento combinado con NA y PegIFN α puede proporcionar ventajas al combinar la potente acción antiviral de los NA y la modulación inmune del IFN α . Sin embargo, no hay evidencia de la superioridad de tratamientos combinados y no hay suficientes estudios con respecto a la selección de pacientes, el tiempo de administración y la duración de los tratamientos combinados (131).

Tabla 6. Características principales de las dos estrategias para tratar la HBC.
Adaptada de EASL 2017 (131).

Desventajas de ambos tratamientos sombreadas de gris.

| | PegIFN α | ANs (ETV, TDF, TAF) |
|--------------------------------------|--|--|
| Vía administración | Inyección subcutánea | Oral |
| Tolerancia | Baja | Alta |
| Duración del tratamiento | 48 semanas | Duradero hasta pérdida de HBsAs |
| Problemas de seguridad a largo plazo | Muy raro que persistan los efectos adversos | Poco probables |
| Contraindicaciones | Muchas | Pocas |
| Estrategia | Inducción de la respuesta inmune duradera con un tratamiento definido en el tiempo | Inhibición de la replicación viral frenar la progresión de la enfermedad |
| Nivel de supresión viral | Moderado | Muy alto |
| Efecto en la pérdida de HBeAg | Moderado | Bajo, pasando a moderado a partir del segundo año |
| Efecto en los niveles de HBsAg | Variable | Bajo |

| | PegIFNa | ANs (ETV, TDF, TAF) |
|---|---|---|
| Riesgo de recidiva | Bajo, si la respuesta se mantiene de 6-12 meses tras finalizar el tratamiento | Moderada si se administra un tratamiento de consolidación tras la negativización de HBeAg |
| Reglas para interrupción de tratamiento | Si | No |
| Riesgo de desarrollo de resistencias | No | Escaso |

1.5.5 Factores predictores de respuesta a IFN vs AN.

Los parámetros predictores para la respuesta al tratamiento con interferón son la edad, los niveles de ADN viral, el sexo, los niveles de ALT, el índice de actividad inflamatoria hepática, el estado del HBeAg y el genotipo (11).

En cuanto al tratamiento con análogos de nucleós(t)idos, la respuesta no varía en función de los genotipos (11).

1.6 IMPORTANCIA DEL GENOTIPO

La prevalencia y distribución geográfica de los genotipos y subgenotipos del VHB es característica de cada uno de ellos. Además, la influencia de los diferentes genotipos del VHB en la historia natural de la enfermedad y la respuesta al tratamiento antiviral siguen sin estar claras (179). No obstante, cada vez hay más evidencia de que los genotipos del VHB influyen en la progresión a infección crónica y carcinoma hepatocelular, seroconversión del HBeAg, seroconversión de HBcAg, niveles de viremia, mutaciones en la región *precore* y/o el promotor basal del *core* y en la respuesta al tratamiento antiviral y a la vacunación frente al virus (11, 31, 47). Por otra parte, la variabilidad genética del VHB expresada en los diferentes genotipos y su distribución en todo el mundo y en relación con los antecedentes étnicos hacen de la clasificación de los genotipos una herramienta útil en los estudios epidemiológicos y de transmisión (180)

Hay numerosos estudios publicados que tratan de esclarecer la asociación de los diferentes genotipos del VHB con las características de la enfermedad y con los resultados clínicos. Muchos de estos estudios proporcionan comparaciones de dos genotipos prevalentes en una región (30). La tabla 7 resume las principales conclusiones extraídas de estos trabajos, que se explican detalladamente a continuación.

1.6.1 Vía de transmisión

La distribución geográfica de los genotipos del VHB puede estar relacionada con la vía de exposición. Por ejemplo, los genotipos B y C son más frecuentes en áreas altamente endémicas, como los países asiáticos, donde la transmisión es fundamentalmente vertical y perinatal. Mientras los otros genotipos son más frecuentes en áreas con predominio de infección por VHB por transmisión horizontal (contacto personal entre niños pequeños, sangre o relaciones sexuales) (11, 181, 182). Por lo tanto, distintos modos de transmisión del VHB se han asociado con una distribución geográfica específica de los genotipos del VHB (41).

El genotipado del VHB puede servir como marcador epidemiológico para determinar la correlación de la distribución del genotipo del VHB con los modos de transmisión, vinculado a importantes cambios en el comportamiento social (11, 41).

1.6.2 Progresión a infección crónica

La cronicidad de la infección por VHB después de la infección aguda por hepatitis B se correlaciona con el genotipo infectante, así como por razones multifactoriales, como la cantidad de inóculo viral, la ruta de adquisición y las diferentes interacciones entre el huésped y el virus (183).

Tras una hepatitis B aguda adquirida en la edad adulta, la infección por genotipo A conlleva mayor riesgo de evolución a enfermedad crónica (184-188). Sin embargo, en un estudio realizado en la India no encontraron diferencias significativas en la frecuencia

del genotipo A entre pacientes con infección aguda y pacientes con infección crónica, pero si observaron una clara asociación del genotipo C con la infección crónica (189). Otros estudios realizados con un limitado número de pacientes, concluyeron que en pacientes infectados con genotipos A y D, los índices de cronicidad eran más altos que en los pacientes con genotipos B y C (190, 191).

En resumen, la persistencia de la infección por el VHB después de la infección aguda puede atribuirse a la fuerza variable de las interacciones huésped-virus, los modos de transmisión y la distribución variable de los genotipos (41).

1.6.3 Seroconversión del HBeAg

Los pacientes infectados con los genotipos A, B, D y F presentan una seroconversión del antígeno e más temprana y más frecuente que los infectados por el genotipo C, independientemente de la etnicidad (149, 192, 193). Los pacientes infectados por el genotipo E tienen mayores tasas de HBeAg positivo comparado con los infectados por genotipo D (194). Los infectados por el subgenotipo A1 pierden antes el HBeAg que los del subgenotipo A2 (195). Sánchez-Tapias *et al.* concluyeron que la seroconversión del HBeAg entre el genotipo A y el D no es comparable (98). Tras la seroconversión del HBeAg, es más frecuente la remisión sostenida en el genotipo A que en el D (98).

Una consecuencia de la diferente distribución geográfica de los genotipos y de sus distintas particularidades es que en las áreas geográficas donde prevalecen genotipos con una seroconversión del HBeAg temprana, la transmisión perinatal es poco frecuente, al contrario de lo que ocurre en áreas donde el genotipo C predomina (31, 98).

1.6.4 Seroaclaramiento del HBsAg

La seroconversión espontánea del HBsAg es más frecuente en pacientes infectados por el genotipo A del VHB que por el genotipo D (98).

El genotipo C se asocia con una progresión de la enfermedad más duradera, por lo que tiene más tiempo para que ocurra el aclaramiento del HBsAg (196). Las tasas de depuración espontánea del HBsAg son más altas en el genotipo B en comparación con el C (197).

1.6.5 Viremia

Con respecto a los niveles de carga viral, el genotipo C está asociado a niveles más altos que el genotipo B (198), el genotipo D se asocia a mayor carga viral que el genotipo A (199) y el genotipo E se asocia a niveles más altos de carga viral en comparación con el genotipo D, por lo que la infección perinatal de bebés de madres infectadas es un factor importante en la transmisión de personas infectadas africanas infectadas por el genotipo E (194). Lindh *et al.* observaron que los pacientes infectados por el genotipo D del VHB con HBeAg positivo, presentan mayor carga viral que los pacientes infectados por otros genotipos del virus (200). Sin embargo, otros autores apuntan que no hay diferencias en los niveles de viremia en pacientes infectados por distintos genotipos del VHB (201, 202).

1.6.6 Complicaciones: Cirrosis, CHC, Transplante y Mortalidad

Los genotipos/subgenotipos A1, C, B2-B4, F1 y el D predisponen a un mayor riesgo de sufrir complicaciones severas de HBC (203).

Muchos son los estudios que profundizan en el papel de los genotipos de VHB en la progresión de la enfermedad y, aunque se pueden encontrar resultados discordantes en la literatura, la mayoría coinciden en la asociación del genotipo C con la rápida progresión de la enfermedad, el desarrollo de CHC, recurrencia y metástasis, positividad del HBeAg y baja tasa de aclaramiento y seroconversión en relación al genotipo B (196, 198, 202, 204-207).

Los pacientes infectados por el genotipo B tienen menos probabilidad de sufrir descompensación hepática que aquellos infectados por los genotipos A, C y D (202, 204).

También se asocia en mayor medida el genotipo D a la severidad de la enfermedad, cirrosis y desarrollo de CHC que el genotipo A (208). El genotipo D además es el más relacionado con insuficiencia hepática aguda (191, 202, 209). El genotipo D se asocia a la hepatitis B crónica HBeAg negativo y los informes de los países mediterráneos con tasas elevadas de cirrosis asocian ahora este factor al genotipo D (210).

El genotipo A en población africana se asocia a desarrollo de CHC y a una edad más temprana que en otros grupos. El subgenotipo A1, que es el más prevalente en África subsahariana, parece ser el principal factor asociado con este mayor riesgo (211).

Los pacientes infectados por el genotipo F del VHB tienen una afectación hepática más severa que los infectados por genotipos A y D (212). Además el genotipo F es un factor de riesgo para el desarrollo de CHC (192) y conlleva una mayor mortalidad (76).

1.6.7 Tratamiento

Numerosos estudios indican el papel de los genotipos en la respuesta viral al tratamiento con interferón. Se observa que la respuesta es mejor para los genotipos A y B que para los genotipos C y D, siendo la peor respuesta observada la obtenida en infectados por el genotipo D (8, 11, 140, 213). La cinética de desaparición del HBsAg y de la carga viral es característica de cada genotipo. Durante el tratamiento con interferón, la cuantificación del HBsAg disminuye más drásticamente en los genotipos A y B. Los pacientes infectados por el genotipo C tratados con IFN negativizan más rápidamente el ADN viral.

El genotipo E es el más complicado de tratar y el que requiere tratamientos más largos (213). El genotipo F sugiere una respuesta terapéutica similar al genotipo A (214) mientras que el genotipo G refleja una respuesta deficiente al tratamiento con IFN estándar (215).

En pacientes HBeAg-positivos tratados con IFN estándar, los pacientes con genotipos A y B tuvieron una tasa significativamente mayor de seroconversión del HBeAg post-tratamiento, que aquellos con genotipo C y D (216-218). Entre los pacientes HBeAg negativos tratados con PEG-IFN, el aclaramiento de HBsAg fue

significativamente mayor en el genotipo A (20%) que en el genotipo B (6%), el genotipo C (9%) y el genotipo D (6%) (219).

El receptor de interferón tipo I (IFNAR2) se expresa más en los pacientes infectados por el genotipo B por lo que la respuesta al tratamiento con IFN en estos pacientes es mejor (220).

Lampertico *et al.* han visto que el aclaramiento de HBsAg y la respuesta viral al tratamiento con IFN son mejores en aquellos pacientes con HBeAg negativo infectados por el genotipo IL28B CC, lo que sugiere que el polimorfismo IL28B puede ser un predictor en relación a la optimización y discontinuación del tratamiento en pacientes infectados por el genotipo D y con HBeAg negativo (11, 221).

En un meta-análisis del año 2008 se identificó una respuesta superior, es decir, seroconversión del HBeAg y pérdida de ADN del VHB, en el genotipo A en comparación con el D y en el genotipo B en comparación con el genotipo C, ambos casos con diferencias significativas entre los genotipos. El mismo meta-análisis mostró que no había diferencias significativas en la respuesta al tratamiento con análogos de nucleós(t)idos entre los distintos genotipos del VHB (222-227). Los autores de este meta-análisis confirmaron por tanto que conocer el genotipo del VHB daba información con respecto a la respuesta a terapias basadas en IFN pero no a terapias con NUC (228).

Buster *et al.* en el año 2009 recomendó la terapia con Peg IFN en pacientes infectados por el genotipo A, y en pacientes con genotipo B y C con ALT elevada y viremia baja (229).

A pesar de que el genotipo del VHB no influye en la tasa de respuesta a NUC, si hay una asociación entre los patrones de mutaciones de resistencia a estos fármacos y los genotipos del virus (230).

Los niveles de HBsAg cuantitativos (qHBsAg) predicen la respuesta en el tratamiento con Peg IFN. Se ha visto que los diferentes niveles de qHBsAg al final del tratamiento con Peg IFN son característicos de los distintos genotipos (30, 231).

Por todo ello, la identificación del genotipo viral ayuda al clínico a predecir la respuesta al tratamiento (11).

1.6.8 Mutaciones en el gen S y mutaciones de resistencia

El papel de los genotipos de VHB en las manifestaciones clínicas de la enfermedad y en la epidemiología puede estar relacionado con el desarrollo de mutaciones específicas en las regiones BCP/PC así como con deleciones en la región *pre-S* del genoma (232-234).

El genotipo C es más propenso a sufrir mutaciones en la región *precore* que el genotipo B (33, 235). Las mutaciones en la región *precore* se asocian más frecuentemente al genotipo D que al A (96, 236). Un estudio realizado en Estados Unidos muestra una prevalencia de mutaciones en la región *precore* en los genotipos A, B, C y D del VHB de 3%, 46%, 24% y 73%, respectivamente (151).

Las mutaciones en la región BCP ocurren más frecuentemente en infectados por el genotipo C (206). Un estudio estadounidense refleja una prevalencia de mutaciones en la región BCP en los genotipos A, B, C y D de 41%, 27%, 60% y 42%, respectivamente (149). La presencia de mutaciones en la región BCP es un factor independiente de riesgo de desarrollar CHC (206, 237).

La deleción en la región *pre-S* se asocia a una progresión más rápida de la enfermedad y a un mayor riesgo de CHC, y ocurre más frecuentemente en pacientes infectados por el genotipo C del VHB que por el B (233).

Las mutaciones en el gen S del genoma del VHB pueden ocasionar fracaso de la vacunación. En regiones donde los genotipos B y C predominan, se ha observado que pacientes que se infectaban por el VHB tras ser vacunados presentaban mutaciones en el gen S (238).

En conclusión, los genotipos y subgenotipos del VHB y su variabilidad genética son útiles en estudios epidemiológicos y el rastreo de migraciones humanas dado que presentan una prevalencia y distribución características de cada área geográfica. Por otra parte, su asociación con la severidad de la enfermedad y con diversos parámetros clínicos que determinan la evolución de la enfermedad, hace muy importante la identificación genotípica de todas las cepas del virus de la hepatitis B (11, 31). El conocimiento del genotipo del VHB permite a los profesionales sanitarios identificar a los pacientes con mayor riesgo de progresión de la enfermedad al tiempo que ayuda a seleccionar la terapia antiviral adecuada (179).

A pesar de todo lo dicho anteriormente y siendo conscientes del conocimiento cada vez mayor sobre la relevancia clínica de los genotipos del VHB, no está justificado realizar pruebas de rutina para el genotipado del virus en la práctica clínica excepto para paciente HBeAg positivos que están considerando la terapia con interferón debido a una mayor tasa de pérdida de HBeAg y HBsAg en aquellos con genotipo A. Para la recomendación del genotipado de VHB en la práctica clínica son necesarios más estudios que avalen el papel del genotipo en la toma de decisiones médicas (37).

Tabla 7. Comparación entre los genotipos más prevalentes en países asiáticos (B y C) y occidente (A y D) de las principales características virológicas, inmunológicas y clínicas relacionadas con el genotipo del VHB (Adaptada de Lin and Kao 2015) (41).

| | B/C | | A/D | |
|---|------------------------|------------------------|------------|------------|
| | B | C | A | D |
| Características virológicas | | | | |
| Viremia | | | | |
| Mutación <i>precore</i> (A1896) | | | | |
| Mutaciones BCP A1762T/G1764A | | | | |
| Mutaciones pre-S | | | | |
| Expresión intracelular de ADN del VHB | | | | |
| Secreción de HBeAG | | | | |
| Características inmunológicas | | | | |
| Tendencia a infección crónica | | | | |
| Seroconversión HBeAg | Antes | Después | Antes | Después |
| Seroaclaramiento HBsAg | Más | Menos | Más | Menos |
| Actividad histológica | | | | |
| Características clínicas | | | | |
| Vía de trasmisión | Perinatal/ vertical | Perinatal/ vertical | Horizontal | Horizontal |
| Incidencia de la progresión a cirrosis y CHC | | | | |
| Respuesta a IFN | | | | |
| Respuesta a NUC | NS | NS | NS | NS |

Color negro: mayor; Color gris: menor; Color blanco: ausencia de datos; NS: no hay diferencias significativas.

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

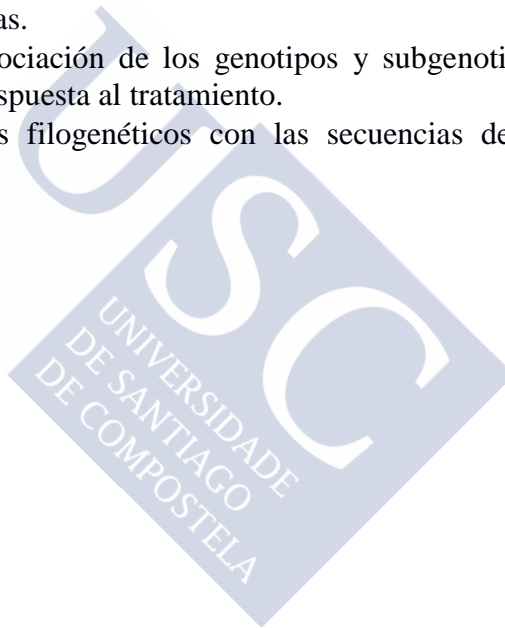
La epidemiología molecular y más concretamente la prevalencia y distribución de los genotipos y subgenotipos del VHB en Galicia adolecen de datos actualizados, que además pueden haberse modificado por diversos motivos, como por ejemplo los cambios experimentados en las vías de transmisión o en menor medida por las migraciones poblacionales, conocer estos datos es nuestro principal objetivo.

En este contexto y dado que los genotipos del VHB presentan una distribución geográfica característica y pueden influir en los parámetros clínicos de la enfermedad y en la respuesta al tratamiento, nos proponemos este trabajo de tesis en base a datos reales de pacientes procedentes de nuestras consultas de Digestivo, Hepatología y Enfermedades Infecciosas del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS). Analizaremos la prevalencia y distribución de los genotipos y subgenotipos del VHB en nuestro área sanitaria (AS) y su asociación con otros factores epidemiológicos, clínicos y virológicos, como: vías de transmisión, respuesta al tratamiento, características demográficas, diferencias geográficas, tendencias en la prevalencia y coinfecciones con otros virus que comparten vías de transmisión.

Teniendo en cuenta el objetivo principal, previamente comentado, los objetivos específicos que se plantean en esta Tesis Doctoral son los siguientes:

- Conocer la asociación de los genotipos y subgenotipos del VHB con las diferentes variables epidemiológicas: género, edad, vía de transmisión y su distribución geográfica en las diferentes localidades y comarcas de nuestro Área Sanitaria. Estudiar el grado de biodiversidad de los genotipos del VHB

- en las distintas áreas geográficas mediante el Índice de Shannon.
- Determinar la distribución de genotipos y subgenotipos del VHB en la población coinfectada con otros virus (VHD, VHC y VIH) que comparten las vías de transmisión.
 - Estudiar la prevalencia de coinfección con VIH, VHC y VHD en las distintas áreas geográficas del AS.
 - Estudiar la progresión a cirrosis, el desarrollo de CHC y la necesidad de trasplante hepático en los infectados crónicos por VHB así como la asociación con variables clínicas y epidemiológicas.
 - Conocer la asociación de los genotipos y subgenotipos del VHB con la respuesta al tratamiento.
 - Hacer estudios filogenéticos con las secuencias del VHB obtenidas.



3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 TIPO DE DISEÑO, POBLACION Y ENTORNO

Se trata de un estudio unicéntrico que incluye pacientes de las consultas externas de Digestivo, Hepatología y Enfermedades Infecciosas del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS).

El ámbito de estudio son los pacientes con hepatitis B y HBsAg positivo diagnosticados y/o seguidos en el CHUS entre el 1 de enero de 2000 y el 31 de diciembre de 2016.

Los criterios de inclusión: pacientes con VHB diagnosticados de hepatitis B crónica, seguidos de su enfermedad en el CHUS y que habían sido genotipados para el VHB.

Los criterios de exclusión: pacientes con VHB diagnosticados de hepatitis B crónica que no habían sido genotipados para el VHB.

Se incluyeron en el estudio un total de 320 pacientes con hepatitis B crónica (HBC) a seguimiento en el área sanitaria de Santiago de Compostela.

En el trabajo se ha utilizado esta población para valorar diferentes parámetros tanto del hospedador como del virus. Para el análisis de los datos se diseñó un estudio epidemiológico, observacional, analítico, longitudinal y retrospectivo. La información de los datos epidemiológicos y clínicos se obtuvieron a partir de la revisión de las historias clínicas de cada uno de los pacientes almacenados en IANUS (plataforma de la integración de sistemas y registro de información clínica, Indra), una vez obtenido el permiso por parte del Comité de Ética de Investigación de Santiago-Lugo (CEI-SL) en la reunión del 22 de Noviembre de 2016 con código de registro 2016/506 (Anexo I). Se recopilaron y codificaron los datos clínicos en el Cuaderno de Recogida de Datos (CRD) específico del estudio, protegiendo la

identidad de los pacientes. Sólo los miembros del equipo investigador y las autoridades sanitarias, que tienen el deber de guardar confidencialidad, tuvieron acceso a los datos recogidos en dicho cuaderno. Sólo se transmitió información a terceros en caso que los datos no pudiesen ser identificados con el paciente.

El desarrollo del proyecto se realizó respetando la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial de 1964 y ratificaciones de las asambleas siguientes (Tokio, Venecia, Hong Kong y Sudáfrica) sobre principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos, la Orden SCO/256/2007, de 5 de febrero, por la que se establecen los principios y las directrices detalladas de Buena Práctica Clínica y el Convenio relativo a los derechos humanos y la biomedicina, hecho en Oviedo el 4 de abril de 1997 y sucesivas actualizaciones.

Todo dato clínico recogido de los pacientes a estudio fue separado de los datos de identificación personal de tal modo que se aseguró en todo momento el anonimato del paciente, respetando la Ley de Protección de Datos de Carácter Personal (Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre), el RD 1720/2007 de 21 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento de desarrollo de la ley Orgánica 15/1999, la Ley 41/2002, de 14 de noviembre (básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica), así como la Ley 3/2001 de 28 de mayo (reguladora del consentimiento informado y de la historia clínica de los pacientes), la Ley 3/2005, de 7 de marzo, de modificación de la Ley 3/2001 y el Decreto 29/2009 de 5 de febrero, por el que se regula el acceso a la historia clínica electrónica. Respecto al cuestionario informativo (CI), se solicitó al CEI-SL la exención de presentar el CI a los pacientes, ya que debido al gran tamaño muestral estudiado (pacientes ilocalizables), así como a la patología (algunos de ellos fallecieron), era necesario un gran esfuerzo y medios técnicos y personales de los que no disponíamos.

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 Variables de estudio

Las variables estudiadas en el conjunto de pacientes se agruparon en: variables epidemiológicas, clínicas y terapéuticas. Estos parámetros se recogieron de la historia clínica electrónica de cada paciente y se fueron actualizando con las sucesivas visitas a las consultas externas del hospital entre el 1 de enero de 2000 y el 31 de diciembre de 2016.

3.2.1.1 Variables epidemiológicas

Para el estudio de las variables epidemiológicas se tuvieron en cuenta todos los pacientes diagnosticados y/o seguidos por infección crónica del VHB en nuestro AS, quedando un tamaño muestral de 320 pacientes.

3.2.1.1.1 *Sexo al nacer*

- Hombre
- Mujer

3.2.1.1.2 *País de nacimiento*

Con una revisión de la historia clínica se indagó sobre el lugar de origen del paciente y se anotó su país de nacimiento.

3.2.1.1.3 *Edad*

Mediante la revisión de las historias clínicas se recogió la fecha de nacimiento de cada paciente y se calculó la edad a 31 de diciembre de 2016.

Con el fin de estudiar la evolución temporal de la distribución de genotipos en el total de la población del AS, dividimos la población de estudio en tres grupos de edad: pacientes menores de 50 años, pacientes con edades comprendidas entre 50 y 70 años y pacientes

mayores de 70. Hacemos esta división basándonos en dos hitos importantes en la historia de la hepatitis B, en primer lugar el descubrimiento del virus de la hepatitis B y la consiguiente adopción de medidas preventivas para evitar su transmisión y en segundo lugar, la implementación de la vacuna.

3.2.1.1.4 Vías de transmisión

Mediante la revisión de las historias clínicas se anotó el factor de riesgo relacionado con la infección por el VHB y la fecha del suceso, en el caso de ser conocida, con el fin de estudiar la asociación de cada genotipo con dicho factor en el total de la población a estudio. Los factores de riesgo se agruparon en:

- Factor de riesgo parenteral. Dentro del cual se diferenciaron tres variantes:
 - Nosocomial: agrupaba las transmisiones por transfusión sanguínea contaminada, derivados hemáticos contaminados, cirugías, trasplante de órgano infectado, transmisión paciente a paciente (por endoscopios o hemodiálisis) y pinchazos accidentales en trabajadores sanitarios.
 - UDVP
 - Tatuajes/piercing.
- Factor de riesgo sexual. En un número importante de los casos no se pudo diferenciar entre heterosexual y homosexual, al no aparecer reflejado el tipo de conducta sexual en la historia clínica del paciente.
- Factor de riesgo vertical.
- Factor de riesgo desconocido.

3.2.1.1.5 Coinfección con otros virus que comparten vías de transmisión

- Coinfección con VHC
- Coinfección con VIH
- Coinfección con VHD

3.2.1.1.6 Área sanitarias y localidades

Para los 320 pacientes diagnosticados y/o seguidos en las consultas externas de Digestivo, Hepatología y Enfermedades Infecciosas se estudió su localidad de residencia dentro del AS, la cual fue dividida en tres subregiones: área metropolitana (AM), área costera (AC) y área rural (AR) (Figura 6); de acuerdo a la estructura organizativa del área sanitaria obtenida a partir del Decreto 168/2010, de 7 de octubre, por el que se regula la estructura organizativa de gestión integrada del Servicio Gallego de Salud (DOG del 15) (239). Los municipios pertenecientes al AM son: Ames, Boqueixón, Brión, Oroso, O Pino, Santiago de Compostela, Teo, Touro, Trazo, Val do Dubra y Vedra; al AC: Boiro, Carnota, A Pobra do Caramiñal, Muros, Noia, Outes, Porto do Son, Rianxo y Ribeira; al AR: A Baña, A Estrada, A Golada, Arzúa, Boimorto, Dodro, Dozón, Frades, Lalín, Lousame, Mazaricos, Melide, Mesía, Negreira, Ordes, Padrón, Pontecesures, Rois, Rodeiro, Santa Comba, Santiso, Silleda, Toques, Tordoia, Valga y Vila de Cruces (Figura 7).

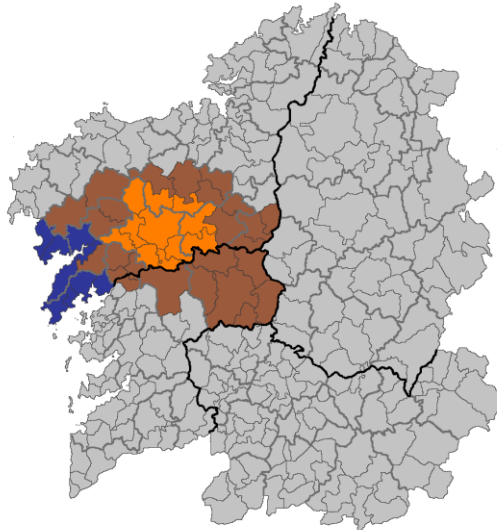


Figura 6. AS de Santiago de Compostela localizada en la Comunidad Autónoma de Galicia (España). Área metropolitana (naranja), área costera (azul) y área rural (marrón).

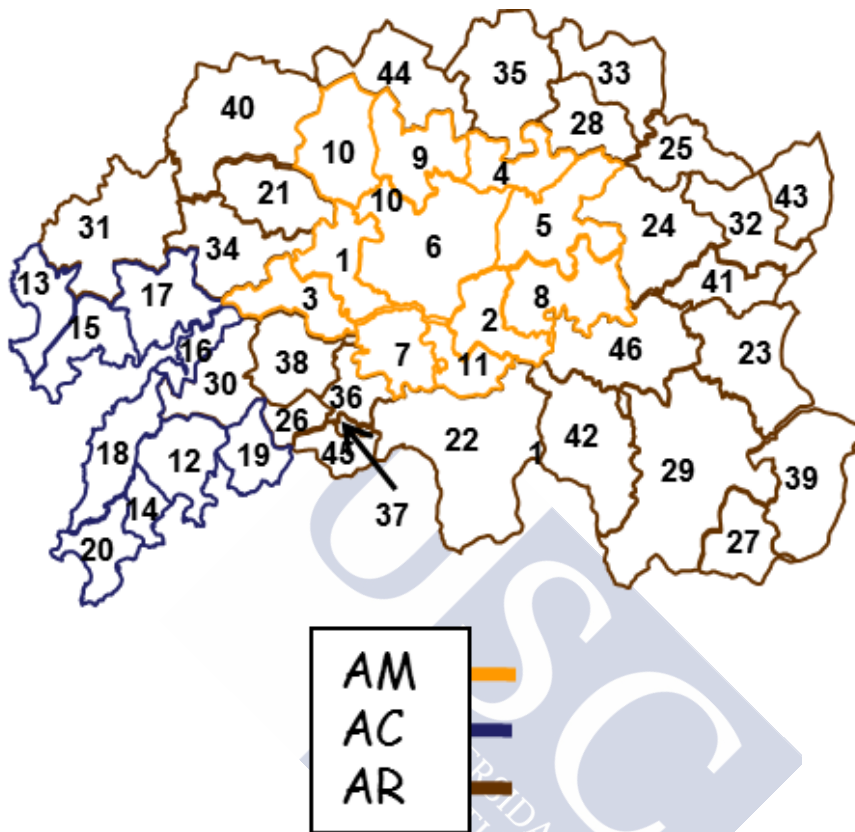


Figura 7. Mapa de localidades del AS de Santiago de Compostela.

AM: 1 Ames, 2 Boqueixón, 3 Brión, 4 Oroso, 5 O Pino, 6 Santiago de Compostela, 7 Teo, 8 Touro, 9 Trazo, 10 Val do Dubra y 11 Vedra; AC: 12 Boiro, 13 Carnota, 14 A Pobra do Caramiñal, 15 Muros, 16 Noia, 17 Outes, 18 Porto do Son, 19 Rianxo y 20 Ribeira; AR: 21 A Baña, 22 A Estrada, 23 A Golada, 24 Arzúa, 25 Boimorto, 26 Dodro, 27 Dozón, 28 Frades, 29 Lalín, 30 Lousame, 31 Mazaricos, 32 Melide, 33 Mesía, 34 Negreira, 35 Ordes, 36 Padrón, 37 Pontecesures, 38 Rois, 39 Rodeiro, 40 Santa Comba, 41 Santiso, 42 Silleda, 43 Toques, 44 Tordoia, 45 Valga y 46 Vila de Cruces.

Los datos de población en cada localidad se obtuvieron a partir del Instituto Galego de Estadística (240):

- Población censada a 01/01/2016 en el AS (240): 437.996 habitantes.

- Población censada a 01/01/2016 en las diferentes áreas (240): AM (184.853), AC (98.978), AR (154.165).

La prevalencia de infectados crónicos (IC) de hepatitis B se calculó por cada 1000 habitantes para el AS, AM, AC, AR y para cada una de las localidades.

$$\text{Prevalencia IC} = \text{número IC} / \text{población} \times 1000$$

3.2.1.2 Variables clínicas

3.2.1.2.1 Asociación de los diferentes genotipos con la progresión de la enfermedad

Los pacientes se clasificaron según su estadio hepático empleando la escala METAVIR a partir de biopsia hepática o por elastografía transitoria (Fibroscan® Echosens, Creteil, France) en: estadio F0 con ausencia de fibrosis, estadio F1 con fibrosis portal, estadio F2 con fibrosis periportal, estadio F3 con fibrosis con puentes y estadio F4 que representa la cirrosis hepática, y que también podía ser identificado mediante diagnóstico ecográfico. Los valores del Fibroscan® se relacionan con los grados de fibrosis de la escala METAVIR de la siguiente manera: F0-F1 <7,6kPa, F2=7,7-9,4kPa, F3=9,5-14kPa, F4>14kPa (241).

Con el fin de estudiar la relación de cada genotipo con la progresión de la enfermedad en los 320 pacientes infectados de VHB que han sido diagnosticados y/o seguidos en las consultas externas de Digestivo, Hepatología y Enfermedades Infecciosas del CHUS, analizamos a aquellos pacientes en los que se conocía su estadio hepático y estudiamos la distribución de genotipos en los pacientes cirróticos, trasplantados y/o con CHC en relación a la distribución de genotipos en la población general.

Además analizamos la asociación de las variables como la edad, sexo y consumo de alcohol con la progresión a cirrosis, la necesidad de trasplante o el desarrollo de CHC.

3.2.1.3 Variables terapéuticas

3.2.1.3.1 Carga viral

Estudio de la carga viral tras recibir tratamiento para ver la respuesta al mismo.

- Detectable
- No detectable

3.2.1.3.2 Tipo de terapia administrada

Se tuvieron en cuenta todos los tratamientos frente al VHB administrados en cada paciente a lo largo de su vida. En la tabla 8 aparecen reflejadas las diferentes terapias.

Tabla 8. Tratamientos administrados

| Tratamiento | | |
|-------------|-------------------------|--|
| No tto | | |
| IFN | | |
| NUC | Análogos de Nucleósidos | Lamivudina Telbivudina Entecavir |
| | Análogos de Nucleótidos | Adenofovir Tenofovir |

3.2.1.3.3 Resistencias antivirales

- Resistencia a Lamivudina
- Resistencia a Telbivudina
- Resistencia a Entecavir
- Resistencia a Adenofovir
- Resistencia a Tenofovir

3.2.2 Determinaciones

3.2.2.1 Determinaciones serológicas.

Para la detección de anticuerpos frente al VHB, VHC, VHD y VIH se emplearon muestras de suero obtenidas a partir de sangre extraída de los pacientes en seguimiento de las consultas de Digestivo, Hepatología y Enfermedades Infecciosas. Se realizó una centrifugación a 800g durante 10 minutos. A continuación las muestras de suero fueron almacenadas a 4°C en alícuotas de 1,5ml hasta su utilización.

Los analizadores automáticos empleados para la detección fueron ABBOTT AxSYM® System con tecnología MEIA (Microparticle Enzyme Immunoassay), ARCHITECT® i2000 Abbott, IL, USA y ADVIA Centaur® CP Immunoassay System, Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn, Germany, ambos con tecnología CLIA (Chemiluminiscent Enzyme Immunoassay). En todos los casos se siguieron las instrucciones de los fabricantes en la realización de las correspondientes determinaciones.

- Se consideró infección crónica por el VHB la presencia durante más de 6 meses en suero de antígeno de superficie del VHB (HBsAg) con detección de ADN del VHB >20 UI/ml.
- Se consideró coinfección con VHC, la detección en ambas técnicas de anticuerpos específicos contra el VHC y su posterior confirmación por INNO-LIA® HCV Score, Fujirebio Europe NV. Belgium y/o detección de ARN del VHC.
- Se consideró coinfección con el VIH la presencia en suero mediante ambas técnicas de anticuerpos frente VIH-1/2 y/o antígeno p24 y su posterior confirmación mediante INNO-LIA® HIV I/II Score, Fujirebio Europe NV. Belgium y/o la detección de ARN de VIH.
- Se consideró coinfección con el VHD como la presencia en suero de anticuerpos IgG, y para ello se usó el inmunoensayo

enzimático comercial ETI-AB-DELTAK-2 (DiaSorin, Saluggia, Italy).

3.2.2.2 Determinaciones moleculares

3.2.2.2.1 *Determinación de la carga viral plasmática del VHB*

Para determinar la carga viral plasmática se emplearon muestras de plasma obtenidas a partir de la sangre extraída de los pacientes en seguimiento de las consultas de Digestivo, Hepatología y Enfermedades Infecciosas. El plasma libre de células se obtuvo y se almacenó en cada caso siguiendo las indicaciones del fabricante.

Se utilizaron distintos equipos para la detección molecular del VHB en nuestro laboratorio. En un primer momento se utilizó Versant HBV DNA 3.0 (bDNA, Bayer Diagnostics), luego se empleó el COBAS® AMPLICOR®VHB test versión 2.0 Roche Molecular Diagnostics Inc. Pleasanton CA, siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente el COBAS® Taqman® VHB test, v2.0 Roche Molecular Diagnostics Inc. Pleasanton CA, siguiendo las instrucciones del fabricante. En la actualidad la técnica empleada es el COBAS AmpliPrep/COBAS® TAQMAN VHB Quantitative test, Roche Molecular Diagnostics Inc. Pleasanton CA, que presenta un límite inferior de detección de 20 UI/ml y un límite superior de 170.000.000 UI/ml.

3.2.2.2.2 *Determinación del genotipo y subgenotipo del VHB*

Para el genotipado del VHB se realiza en primer lugar la extracción de ácidos nucleicos. Dicha extracción se realizó a partir de las muestras de plasma obtenidas y procesadas como se comentó anteriormente, empleando distintos procedimientos a lo largo del tiempo. Se usó el kit de aislamiento de ácidos nucleicos totales (TNAI kit: total nucleic acid isolation kit) para COBAS® AmpliPrep, Roche Molecular Diagnostics Inc. Pleasanton, CA, siguiendo las instrucciones del fabricante y los eluidos fueron conservados a -20°C hasta su utilización. También se usó QIAamp DNA Investigator kit de

QIAGEN® y en otras ocasiones MagNA Pure Compact Instrument de Roche Life Science®.

Una vez extraído el material genético se procedió al genotipado mediante secuenciación directa siguiendo el protocolo realizado por Mallory *et al.* y Schildgen *et al.* y usando los primers publicados por estos autores (242, 243). Se obtuvo un fragmento de 941 nucleótidos del gen de la polimerasa viral/HBsAg en una primera PCR (pPCR) con los primers HBV_1F y HBV_4R usados por Mallory *et al.* (242). Luego se realizó una *nested* PCR (nPCR) usando los primers TGGATGTGTCTGCGGC (“sense primer”) y CKTTGACADACTTTCCAATCAATAG (“antisense primer”) publicados por Schildgen *et al.* (243), obteniéndose un fragmento de 622 nucleótidos.

Todos los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% y luego fueron purificados usando QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN GMBH, Hilden, Germany) de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Con los amplicones purificados se realizó la secuenciación bidireccional de Sanger usando los primers previamente descritos, HBV_1F y el “antisense primer” para los productos de la primera PCR y los primers publicados por Schildgen *et al.* para los productos de la *nested* PCR (243). Obteniéndose así productos de secuenciación de 815 y 622 nucleótidos, respectivamente. Tras el ciclo de secuenciación y la purificación de los correspondientes amplificados, éstos fueron secuenciados en un secuenciador de capilares Beckman CEQ 8000 (Beckman Coulter, Inc. Fullerton, California) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para el posterior estudio de las secuencias y la determinación del genotipo y subgenotipo del VHB se utilizó la herramienta bioinformática de interpretación geno2pheno VHB (Institut Max Plank, Germany), con edición previa en el programa Sequencher 4.0 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI).

3.2.2.2.3 *Determinación del subtipo de VHB*

Para el subtipado del VHB se siguió la metodología de Kramvis *et al.* 2008 y Echevarría *et al.* 2005, donde los autores establecían una

correlación entre los genotipos/subgenotipos de VHB y los subtipos (33, 36).

3.2.2.2.4 *Mutaciones de resistencia*

- V173L
- L180M
- A181V/T
- T184A
- A194T
- S202G
- M204I/V
- Q215T/S
- I233V
- N236T/Y
- M250V

3.2.2.2.5 *Mutaciones de escape*

- P120T/S
- T123A
- P127T/S
- A128V
- Q129H/K
- M133T/I/L/V
- Y134S/N
- T140S
- K141I
- P142S/L
- S143P
- D144A
- G145R

3.2.2.3 Estudio filogenético

3.2.2.3.1 *Pacientes, muestras y secuenciación genómica de un fragmento de VHB*

El estudio filogenético se realizó en el Hospital Ramón y Cajal, donde analizaron 122 de las 320 secuencias amplificadas y secuenciadas para genotipado. Los distintos análisis filogenéticos del VHB se realizaron finalmente con secuencias uniformes en tamaño de 345 bp, que reunían la calidad necesaria para estos análisis. Por otra parte, para evitar resultados artefactados en los árboles, se decidió que además de elegir el mismo tamaño de secuencia este fuera común a todos los genomas.

3.2.2.3.2 *Alineamiento*

Las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron alineadas usando el paquete MEGA disponible en <https://www.megasoftware.net/> con el algoritmo MUSCLE. Este algoritmo genera un primer alineamiento basado en una matriz de distancias con las que construye un árbol de filogenia por el método de Neighbor-Joining. Con posterioridad, este alineamiento se refina, al generar otra matriz de distancias basado en el método de Kimura para corregir las sustituciones múltiples en una misma posición y así obtener un nuevo árbol filogenético que se usará como referencia para hacer el realineamiento definitivo. Finalmente las secuencias se transforman en proteína para identificar errores de secuenciación y se editan manualmente.

3.2.2.3.3 *Genotipado*

Para realizar el genotipado de las secuencias obtenidas en este estudio se construye un árbol filogenético mediante el programa PhyML del paquete MEGA usando la aproximación de máxima verosimilitud. Para generar el árbol filogenético es necesario disponer de secuencias de referencia, previamente definidas y disponibles en la base de datos de GenBank (<http://www.ncbi.nlm.gov/>). Las secuencias de referencia seleccionadas correspondían con números de acceso

AB937796, KT347092 del genotipo A1, EU594395, JX507080, KJ854710 del genotipo A2, AM184126 del genotipo A3, AY934764 del genotipo A4, FJ692603 del genotipo A5, GQ331048 del genotipo A6, AB819614 del genotipo B1, AB555499, B819614, JQ688405 del genotipo B2, AB976562 del genotipo B3, AB368295, FJ904426 del genotipo B4, AB219427 del genotipo B5, DQ463792 del genotipo B6, GQ358143 del genotipo B7, GQ358147 del genotipo B8, GQ358152 del genotipo B9, AB697510 del genotipo C1, AB642095 del genotipo C2, AB048705 genotipo del C4, EU410081 del genotipo C5, GQ358157 del genotipo C6, AJ627215, EU594397, X85254 del genotipo D, FJ904446, GU456684, JF754635, KM606702, KM606753 del genotipo D1, AB555500, EU594433, KM606711, KM606747, KP322601 del genotipo D2, EU594382, F754625, HQ236016, KF679993, KM577667, KP090181, KT347090 del genotipo D3, KM606745 del genotipo D3/D6, AB033559, AB048702, FJ010650, FJ692533, GQ922003, KF192841, KJ470884, KJ470888, KJ470895, KM606740, KM606744, KM606752, KM606754, KM606755 del genotipo D4, AB106564, AP007262, DQ060822, HE974384, JQ000009, KM606743 del genotipo E, AB214516, AF223963, AY311369, HE974366 del genotipo F, AF160501, AP007264, GU565217 del genotipo G, AB516395, AP007261 del genotipo H.

La reconstrucción filogenética por máxima verosimilitud se basa en calcular la probabilidad de observar un alineamiento a partir de un árbol filogenético y un modelo de sustitución nucleotídica. Mediante el programa jModeltest disponible en <https://github.com/ddarriba/jmodeltest2/releases>, se obtiene el modelo de sustitución nucleotídica que mejor se adapta a nuestro alineamiento. El programa PhyML genera un árbol inicial basado en la matriz de distancias entre los pares de secuencias (Neighbor-joining). A partir de este árbol se generan nuevos árboles intercambiando las ramas vecinas y se calcula la probabilidad de todas las posiciones usando el modelo de sustitución nucleotídica GTR (que corresponde con la definición inglesa de “*General Time Reverse*”) que calcula una tasa de sustitución diferente para cada una de las seis mutaciones posibles, con una proporción de posiciones invariantes I y

variación a lo largo de la secuencia según una distribución gamma G. El resultado final es el árbol con la suma de probabilidades más alta. Una vez construido el árbol se explora la robustez de la inferencia filogenética mediante el método de Bootstrap, se generan 1000 réplicas del alineamiento mediante un re-muestreo aleatorio con reemplazamiento del conjunto de datos. Se obtiene el árbol filogenético para cada una de las réplicas y se genera un árbol consenso que incluya todos los grupos que aparecen en más del 50% de los árboles. Se acepta que tienen soporte los grupos que aparecen en más del 70 % de los árboles.

3.2.2.3.4 *Análisis filogeográfico*

Una nueva aproximación surge de combinar la reconstrucción filogenética obtenida previamente con la información geográfica de donde se obtuvieron las secuencias disponibles. De esta combinación se puede inferir su historia biogeográfica. Para el análisis filogeográfico se obtienen de la base de datos de GenBank 3.516 secuencias de VHB de las que se conoce el país de origen (mayo de 2017). Se construye el árbol filogenético por máxima verosimilitud como en el apartado anterior usando el programa FastTree, disponible en <http://www.microbesonline.org/fasttree>, que permite inferir filogenias de alineamientos con miles de secuencias en un tiempo razonable (244). Para una estimación más rápida de la robustez se usa la prueba de Shimodaira-Hasegawa. Las zonas geográficas se dividen de la siguiente manera: a) África y Oriente Medio que incluye Etiopía, Gabón, Kenia, Omán, Sudán, Túnez y Sudáfrica; b) América del sur y Caribe que incluyen Argentina, Brasil, Cuba, Haití, Martinica, Panamá y Uruguay; c) América del norte que incluye USA y Canadá; d) Asia que incluye China, India, Japón, Mongolia y Nepal; e) Europa incluye Alemania, Bélgica, España (excluyendo Galicia), Holanda, Italia, Francia, Lituania, Polonia, Serbia, Turquía, y Uzbequistán; y f) Oceanía que incluye Australia, Fiji, Samoa, Kiribati, Papua Nueva Guinea y Tonga. Se considera que las secuencias tienen el mismo origen geográfico si las ramas tienen un soporte > 80 %.

3.2.2.3.5 *Análisis filodinámico*

La filogenia puede usarse también para inferir la dinámica de una epidemia (filodinámica). En este caso usamos una aproximación Bayesiana con el software BEAST disponible en <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/beast/>. Los métodos Bayesianos se basan en calcular la probabilidad posterior de obtener un árbol filogenético a partir de un modelo de sustitución nucleotídica y un alineamiento. En este caso no se calcula la robustez de un árbol ya que el método se basa en obtener la densidad de probabilidades y calcular el intervalo que incluye el 95% de las probabilidades posteriores. El algoritmo de las Cadenas de Monte Carlo de Markov se usa para muestrear los valores de las variables dentro de la distribución de probabilidades. Se muestrea el número de veces necesario para que los valores alcancen un estado estacionario y el tamaño de muestra efectivo indique que el muestreo es independiente.

3.2.2.3.6 *Filogenia datada*

Para obtener la filogenia datada es necesario introducir un reloj molecular que representa el número de sustituciones a lo largo del tiempo. Ya que es difícil garantizar que un modelo demográfico describa el cambio del tamaño de población efectivo en las secuencias disponibles, se aplica un método no paramétrico (Bayesian skyline plot) que no necesita definir un modelo demográfico previo para generar la distribución posterior del tamaño de población efectivo a lo largo del tiempo.

Obtenemos la filogenia datada usando los años de obtención de la muestra, con un reloj molecular relajado que permite que el número de sustituciones a lo largo del tiempo cambie en las diferentes ramas según una función logarítmica, y el modelo de sustitución de nucleótidos GTR+I+G. Se obtienen dos series de 100 millones cada una que se muestrean cada 10000 generaciones para evitar la autocorrelación. Se combinan con el programa LogCombiner eliminando el 10% del muestreo para obtener un tamaño de muestra efectivo superior a 100. Con el programa Treeannotator se obtiene el árbol con los clados de mayor probabilidad que se visualiza con el programa FigTree disponible en <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/>. El

programa Tracer disponible en <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/>, permite el análisis demográfico usando el árbol datado obtenido, reconstruye la variación del tamaño de la población efectiva a lo largo del tiempo asumiendo una variación de la población constante y el método Bayesian Skyline. Se hace el análisis para los dos tipos juntos y cada uno por separado.

Todos los análisis se generan en un ordenador con una CPU intel core i7-4960 (6 núcleos 12 hilos) y 64 GB de memoria RAM.

3.2.3 Tratamiento estadístico

Para analizar los datos recogidos en este trabajo, en primer lugar se procedió a la realización de un análisis descriptivo de las variables obtenidas de las historias clínicas de los pacientes, en el que se estudiaron las características epidemiológicas, clínicas y terapéuticas desde el diagnóstico de la infección. Las variables continuas (cuantitativas) se expresaron como mediana con su rango intercuartílico (RIC), mientras que las variables categóricas (cualitativas) se resumieron con porcentajes.

Previo a la realización de cualquier test estadístico y al ser el tamaño muestral mayor o igual a 50, se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para así determinar si los parámetros analizados se ajustaban a una distribución normal. Para evaluar la comparabilidad de los grupos se utilizó el test de Levene de homogeneidad de varianzas. En ambos casos los resultados se consideraron positivos si p -valor < 0,05.

En estos grupos generados se evaluó la influencia de los genotipos y subtipos del virus en la progresión de la enfermedad y su distribución en relación a las variables anteriormente citadas. Para ello se realizó un test de comparación bivariante para estudiar el efecto de cada genotipo y subgenotipo del virus en dichas variables mediante test Chi-cuadrado (χ^2).

Todos los análisis se llevaron a cabo mediante el paquete estadístico SPSS v22.0 (IBM Corp. Armonk, NY: IBM Corp) y en todos los casos se consideraron estadísticamente significativos los valores de p por debajo de 0,05 (p -valor < 0,05).



4 RESULTADOS

4.1 DISTRIBUCION DE GENOTIPOS EN EL AREA SANITARIA

4.1.1 Distribución de genotipos en cada sexo y en el total de infectados crónicos por el VHB en el área sanitaria

Se estudió el genotipo de VHB en 320 muestras de pacientes con hepatitis B crónica que acudieron a las consultas externas de Digestivo, Hepatología y Enfermedades Infecciosas del CHUS entre el año 2000 y el 2016.

De los 320 pacientes con infección crónica por VHB, eran de origen español (nativos) 268 de ellos (83.8%), 219 eran hombres (68.4%) y 39 pacientes (12.5%) fallecieron durante el tiempo de estudio.

Para la variable edad de la población aplicamos la prueba de Kolmogorov-Smirnov, obteniendo un p-valor $>0,05$, por lo que dicha variable sigue una distribución normal. La mediana de edad de los infectados crónicamente por VHB es de 52 (RIC 64-41).

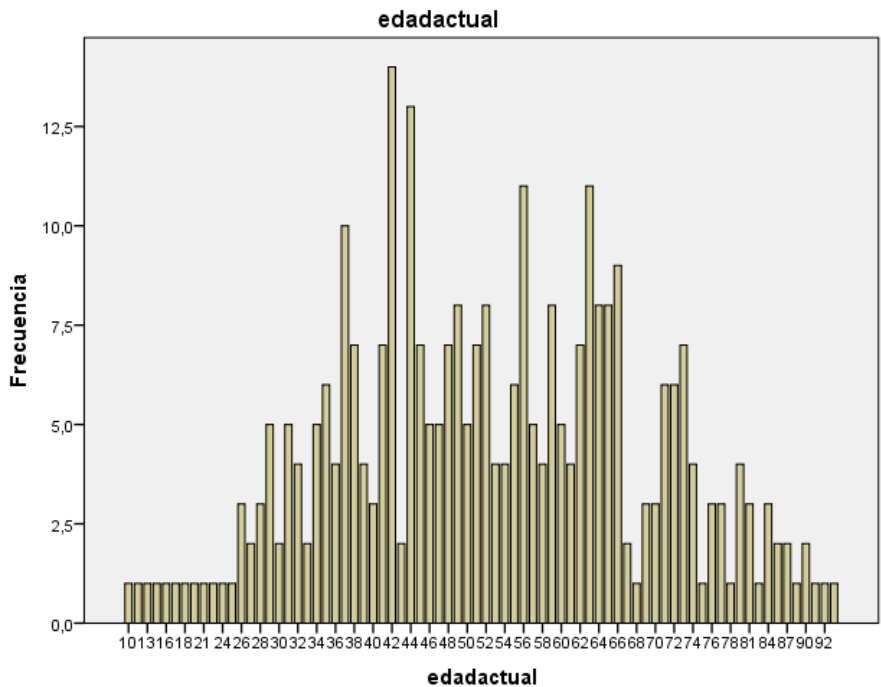


Figura 8. Distribución de edad de la población objeto de estudio.

La distribución de genotipos y subgenotipos viene representada en la tabla 9. Hay que señalar que se han detectado un total de 15 casos de posibles coinfecciones por varios genotipos (4,68%) que no ha sido posible confirmar, por lo que se han representado con el genotipo mayoritario. Además en 57 pacientes infectados por genotipo D no se ha podido determinar el subgenotipo.

Tabla 9. Distribución de genotipos en el total de pacientes infectados crónicos por el VHB y en cada sexo en el AS.

| Gen | Total (%) | Edad: mediana (RIC) | Hombres (%) | Edad: mediana (RIC) | Mujeres (%) | Edad: mediana (RIC) | p-valor |
|--------------|-----------|-----------------------|-------------|-----------------------|-------------|-----------------------|---------|
| A | 15,3 | 52 (63,5-43,5) | 19,6 | 52 (62-45) | 5,9 | 58 (83,25-40,75) | 0,002 |
| A1 | 2,7 | 53 (62-48) | 3,4 | 52 (59,75-46,5) | 1,2 | 63 | |
| A2 | 15,6 | 52 (65-43,5) | 20,7 | 52 (64,5-43,5) | 4,8 | 66,5 (89,75-44,75) | 0,001 |
| B | 1,6 | 35 (42,5-20) | 0,5 | 48 | 4,0 | 32,5 (36,5-15) | 0,019 |
| C | 2,5 | 35 (45,5-32) | 2,3 | 36 (51,5-35) | 3,0 | 31 (31-28) | |
| D | 71,6 | 56 (66-42) | 66,2 | 57 (66,5-44) | 83,2 | 48 (63,75-37) | 0,002 |
| D1 | 1,9 | 26 (38-18) | 0,6 | 34 | 4,8 | 22,5 (38-17,5) | 0,020 |
| D2 | 18,3 | 57,5 (72,75-38,25) | 19,0 | 61,5 (72,25-38,75) | 16,7 | 54 (76,5-36,75) | |
| D3 | 5,3 | 53 (61,5-43,75) | 5,6 | 53 (61,5-47,75) | 4,8 | 50 (68,25-37) | |
| D4 | 40,7 | 52 (64-41) | 34,1 | 56 (65,5-44) | 54,8 | 44 (57,25-37) | 0,001 |
| E | 3,1 | 38,5 (42,25-34) | 2,7 | 40,5 (47-38) | 4,0 | 34 (37,75-24,25) | |
| F | 2,2 | 45 (71-42) | 3,2 | 45 (71-42) | 0,0 | | |
| G | 3,1 | 48,5 (54,25-41,75) | 4,6 | 48,5 (54,25-41,75) | 0,0 | | 0,029 |
| H | 0,6 | 60,5 (60,5-51) | 0,9 | 60,5 (60,5-51) | 0,0 | | |
| Total | 320 | 52 (64-41) | 219 | 55 (65-43) | 101 | 45 (63-35) | |

p-valor calculado entre hombres y mujeres

Los subtipos de VHB de nuestra AS están representados en la tabla 10, siendo el más frecuente el subtipo ayw2 (35%).

Tabla 10. Distribución de subtipos en el AS de Santiago de Compostela.

| Subtipo | Frecuencia (%) |
|----------------|----------------|
| adr | 2,2 |
| adw2 | 15,9 |
| adw4 | 2,8 |
| ayw2 | 35,0 |
| ayw3 | 15,0 |
| ayw4 | 3,1 |
| No determinado | 25,9 |
| Total | 320 |

Con respecto a las características epidemiológicas, un 68,4% eran hombres con una mediana de edad de 55 años (RIC, 65-43) y de 45 años (RIC, 63-35) en mujeres.

Se observaron diferencias significativas en la distribución de genotipos entre sexos. El genotipo A fue significativamente más prevalente en hombres con un $p=0,002$ mientras el genotipo D fue significativamente más prevalente en mujeres con un $p=0,002$. Del mismo modo el subgenotipo D4, el más predominante en nuestra área, y el D1 son más prevalentes en mujeres. Sin embargo, en los subgenotipos D2 y D3 no se encuentran diferencias significativas en la distribución entre sexos al igual que en A1, mientras que el subgenotipo A2 se ha visto que es más prevalente en hombres ($p=0,001$).

Se ha visto que hay diferencias en la mediana de edad de los pacientes infectados por distintos genotipos y subgenotipos, pudiendo concluirse que los pacientes infectados por genotipos menos prevalentes en nuestra área (B, C, E, F y G) son más jóvenes.

4.1.2 Distribución de genotipos por edades en el área sanitaria.

Estudiamos la distribución de genotipos por edades y para ello dividimos la población en tres grupos de edad: pacientes mayores de 70 años, pacientes con edades comprendidas entre 50 y 70 años y pacientes menores de 50 años. Establecemos esta clasificación de los pacientes atendiendo al año de su nacimiento en relación a dos acontecimientos clave en el conocimiento de la hepatitis B, por un lado el descubrimiento del virus de la hepatitis B y por otro el desarrollo e implantación de una vacuna efectiva para combatir la enfermedad.

En el total de la población crónicamente infectada con el VHB y cuyo seguimiento se lleva a cabo en las consultas externas de Digestivo, Hepatología y Enfermedades Infecciosas entre el año 2000 y el 2016 (320 pacientes), la distribución de pacientes por edades fue la siguiente: el 16,3% tenía más de 70 años, el 38,4% se encontraba entre 50 y 70 años y el 45,3% eran menores de 50 años.

La distribución de genotipos en cada grupo de edad viene representada en la tabla 11. Comparando el grupo de edad de <50 años con los otros grupos de edad, se observó que el genotipo D era significativamente menos prevalente en los pacientes menores de 50 años. Sin embargo, el subgenotipo D1 se ha visto que es significativamente más prevalente en pacientes menores de 50 años en relación a los pacientes con edades comprendidas entre los 50 y los 70 años. Los genotipos B, C y E, genotipos no autóctonos, son más prevalentes en los pacientes con menos de 50 años, encontrándose diferencias significativas con respecto al grupo de edad 50-70 años en los pacientes infectados por genotipos B y E.

Tabla 11. Distribución de genotipos por edades en el total de la población.

| Genotipos | <50 años (%) | 50-70 años(%) | >70 años (%) | p-valor |
|--------------|--------------|---------------|--------------|------------------|
| A | 14,5 | 17,9 | 11,5 | NS |
| A1 | 1,4 | 4,1 | 0,0 | |
| A2 | 12,4 | 13,8 | 11,5 | |
| B | 3,4 | 0,0 | 0,0 | 0,038** |
| C | 4,8 | 0,8 | 0,0 | |
| D | 63,4 | 75,6 | 84,6 | 0,005*/0,032** |
| D1 | 3,4 | 0,0 | 0,0 | 0,038** |
| D2 | 14,5 | 9,8 | 28,8 | 0,021**/0,001*** |
| D3 | 3,4 | 5,7 | 3,8 | |
| D4 | 33,8 | 37,4 | 23,1 | NS |
| E | 6,2 | 0,8 | 0,0 | 0,020** |
| F | 2,8 | 0,8 | 3,8 | |
| G | 4,8 | 2,4 | 0,0 | |
| H | 0,0 | 1,6 | 0,0 | |
| Total | 145 | 123 | 52 | |

*p-valor calculado entre los grupos de >70 y <50 años.

**p-valor calculado entre los grupos de <50 y 50-70 años.

***p-valor calculado entre los grupos de 50-70 años y >70 años.

4.1.3 Distribución de genotipos y subgenotipos según el país de origen del paciente

En nuestro estudio el 83,3% de los pacientes con enfermedad crónica por VHB del genotipo A eran españoles. Los pacientes infectados con genotipo B y C procedían mayoritariamente de China. Los pacientes infectados por los subgenotipos D2, D3 y D4 eran nativos en su mayoría mientras que los pacientes con subgenotipo D1 procedían de Marruecos y Rumanía. Los pacientes infectados con genotipo E eran todos africanos (Guinea Bissau, Senegal, Madagascar, Nigeria, Guinea Conakry y Gambia) excepto un español.

De los 10 pacientes infectados por genotipo G, 9 eran nativos.

Tabla 12. Distribución de genotipos en pacientes nativos versus pacientes inmigrantes.

| Gen. | Nativos (%) | Edad: mediana (RIC) | Inmigrantes (%) | Edad: mediana (RIC) | p-valor |
|--------------|-------------|---------------------|-----------------|---------------------|---------|
| A | 15,3 | 53 (65-47,5) | 15,4 | 42 (47,25-36,75) | |
| B | 0,0 | - | 9,6 | 35 (42,5-20) | <0,001 |
| C | 0,0 | - | 15,4 | 35,5 (45,5-32) | <0,001 |
| D | 78,4 | 56,5 (66-44) | 36,5 | 27 (39-23) | <0,001 |
| E | 0,4 | - | 17,3 | 39 (43,5-36) | <0,001 |
| F | 1,9 | 57 (75,5-44,5) | 3,8 | 39,5 (39,5-37) | |
| G | 3,4 | 49 (54,5-42) | 1,9 | 41 (41-41) | |
| H | 0,7 | 60,5 (60,5-51) | 0,0 | - | |
| Total | 268 | | 52 | | |

En la tabla 12 y la figura 9, se muestra la distribución de genotipos en la población nativa infectada crónicamente por VHB y en la población inmigrante.

Las características epidemiológicas de la población gallega autóctona no inmigrante (83,8%) eran las siguientes: mediana de edad de 56 años (RIC, 66-44), 70,1 % hombres, 11,1% coinfectados con VIH, 8,2% con VHC, 3,2% VHD y vía predominante de transmisión desconocida (79,1%). Mientras, la población gallega inmigrante (16,3%): mediana de edad de 37 años (RIC, 42-28,5), 59,6 % hombres, 8,7% coinfectados con VIH, 2,1% con VHC, 4,1% VHD y vía predominante de transmisión desconocida (75%).

De forma general, los genotipos B, C y E son significativamente más prevalentes en la población inmigrante mientras el genotipo D es significativamente más prevalente en población nativa.

También se observó que los pacientes inmigrantes infectados son más jóvenes que los nativos.

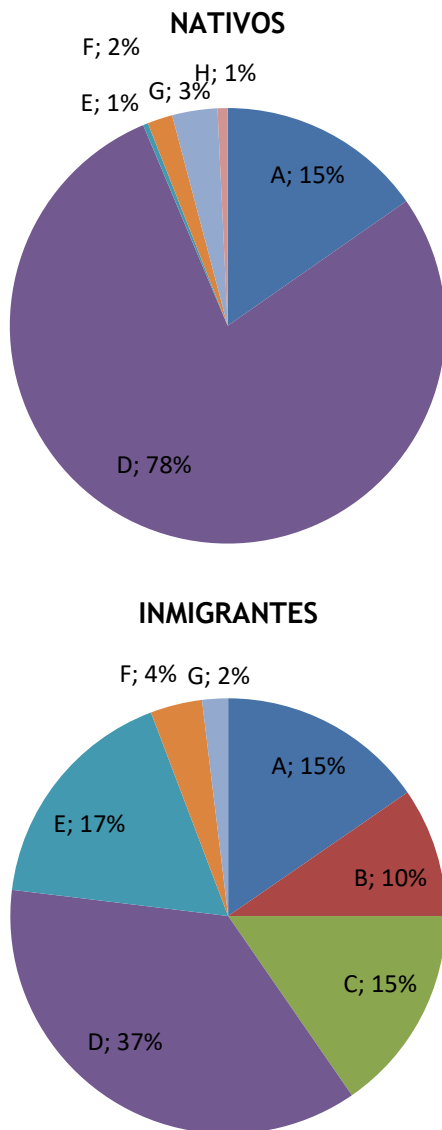


Figura 9. Distribución de genotipos en pacientes nativos e inmigrantes.

4.2 DISTRIBUCION DE FACTORES DE RIESGO EN EL AREA SANITARIA

4.2.1 Distribución de factores de riesgo asociados a la infección por VHB según el grupo de edad

En la tabla 13 se representa la distribución de factores de riesgo asociados a la infección por VHB en los distintos rangos de edad. Con respecto a la evolución de los factores de riesgo asociados a la infección con el VHB, la transmisión vertical se asoció de forma significativa al grupo de edad de <50 años con respecto al grupo de edad de 50-70 años y a los mayores de 70 años, con un p -valor de 0,010 y 0,034, respectivamente. Además, el factor de riesgo desconocido es significativamente más prevalente en el grupo de pacientes de mayor edad. No encontrándose diferencias significativas en función de la edad en los pacientes infectados por vía parenteral o sexual.

Tabla 13. Distribución de factores de riesgo por edades en el total de la población.

| Genotipos | Total | <50 años (%) | 50-70 años (%) | >70 años (%) | p -valor |
|--------------|------------|--------------|----------------|--------------|-----------------------|
| Parenteral | 5,9 | 5,5 | 7,3 | 3,8 | |
| Sexual | 3,8 | 6,2 | 2,4 | 0,0 | |
| Vertical | 11,9 | 17,9 | 7,3 | 5,8 | 0,010*/0,034** |
| Desconocido | 78,4 | 70,3 | 82,9 | 90,4 | 0,016*/0,004**/+0,045 |
| Total | 320 | 145 | 123 | 52 | |

*<50 años y 50-70 años

**<50 años y >70 años

+<50 años y población total

4.2.2 Asociación de los distintos genotipos de VHB con los factores de riesgo para adquirir la infección.

Con el fin de establecer la asociación de cada genotipo con los diferentes factores de riesgo, estudiamos la distribución de estos en cada uno de los factores (Tabla 14).

Del total de pacientes estudiados infectados crónicamente por VHB no se ha documentado un factor de riesgo asociado a la adquisición del VHB en el 78,4% de los pacientes. En el resto de los pacientes en los que si se conoce el factor de riesgo, predomina la vía de transmisión vertical (11,9%), seguida por la transmisión parenteral (5,9%) y la sexual (3,8%).

El 4,1% de los infectados por genotipo A se documentó transmisión sexual mientras que sólo un 1,8% de los infectados por genotipo D presentaron transmisión por esta vía, lo que indica una mayor asociación del genotipo A con la vía sexual.

En los pacientes con genotipo A es más prevalente el factor de riesgo parenteral que el vertical ($p=0,022$), mientras que en los pacientes infectados por el genotipo D se observó una asociación significativa con la transmisión vertical ($p<0,001$).

El subgenotipo D3 está asociado a transmisión parenteral ($p=0,010$), concretamente EXUDVP (3 pacientes de los 4 con subgenotipo D3 con factor de riesgo conocido son EXUDVP). Además también cabe destacar que todos los pacientes con historia conocida de contacto con drogas administradas por vía parenteral son hombres. El subgenotipo D4 está asociado de forma significativa con la transmisión vía vertical ($p=0,011$).

En los pacientes infectados por genotipos distintos al A y al D, se observó una asociación significativa con el factor de riesgo sexual.

Tabla 14. Distribución de genotipos por vía de transmisión en el AS

| Genotipo | Parenteral (%) | Sexual (%) | Vertical (%) | Desconocido (%) | p-valor |
|--------------|----------------|------------|--------------|-----------------|-----------------------------------|
| A | 26,3 | 16,7 | 5,3 | 15,9 | 0,022* |
| A1 | 0,0 | 8,3 | 2,9 | 2,5 | |
| A2 | 27,8 | 8,3 | 2,9 | 17,1 | |
| D | 68,4 | 33,3 | 86,8 | 71,3 | <0,001** |
| D1 | 5,6 | 8,3 | 2,9 | 1,0 | |
| D2 | 22,2 | 8,3 | 29,4 | 16,6 | |
| D3 | 22,2 | 0,0 | 0,0 | 5,0 | 0,010* |
| D4 | 16,7 | 16,7 | 52,9 | 42,2 | 0,011* |
| no A no D | 5,3 | 50,0 | 7,9 | 12,7 | <0,001*** 0,004**** 0,001** |
| Total | 19 | 12 | 38 | 251 | |

*Vertical/Parenteral

**Sexual/Vertical

***Desconocido/Sexual

****Sexual/Parenteral

4.3 DISTRIBUCION DE GENOTIPOS DE VHB ASOCIADOS A LA INFECCION EN LAS DISTINTAS AREAS DEL AS

Con respecto a las características epidemiológicas:

- A. Área metropolitana: el 29,1% de la población infectada crónicamente por VHB reside en el área metropolitana, lo que supone una prevalencia 0,50%. La mediana de edad es de 47 años (RIC 56-39). El 68,8% eran hombres con una mediana de edad de 48 años (RIC, 55,75-39,25). En mujeres la mediana de edad es de 44 años (RIC, 54-35).
- B. Área costera: el 35% de la población infectada crónicamente por VHB residía en el área costera, lo que supone una prevalencia de infectados crónicos diagnosticados del 1,13%. La mediana de

edad es de 56 años (RIC, 66,75-42,25). El 67% eran hombres con una mediana de edad de 58 años (RIC, 69-44). Las mujeres tienen una mediana de edad de 49 años (RIC, 63,5-37).

- C. Área rural: el 19,4% de los infectados crónicos por VHB residía en el área rural, lo que supone una prevalencia del 0,40%. La mediana de edad es de 62 años (RIC, 67,25-44). El 71% de los infectados crónicos por VHB eran hombres con una mediana de edad de 62 años (RIC, 66-44,75). En las mujeres infectadas la mediana de edad era de 55,5 años (RIC, 74-42).

Tabla 15. Distribución de genotipos en las diferentes áreas.

| Genotipo | Total (%) | AM (%) | Edad: mediana (RIC) | AC (%) | Edad: mediana (RIC) | AR (%) | Edad: mediana (RIC) | p-valor |
|-------------------|------------|-----------|---------------------|------------|-------------------------|-----------|----------------------|---------|
| A | 15,3 | 18,3 | 52 (55-45) | 8,0 | 50 (63,5-41,5) | 27,4 | 63 (72-40) | 0,001* |
| D | 71,6 | 61,3 | 47 (59-38,5) | 83,9 | 58 (69,25-42,75) | 61,3 | 62 (67,25-45,75) | 0,001* |
| no A no D | 13,1 | 20,4 | 42 (48-35) | 8,0 | 39 (49-34,5) | 11,3 | 49 (63-38) | 0,010** |
| Índice de Shannon | 1,46 | 1,88 | | 0,93 | | 1,50 | | |
| Total | 320 | 93 | 47 (56-39) | 112 | 56 (66,75-41,25) | 62 | 62 (67,25-44) | |

*p-valor calculado entre AC y AR. **AM y AC

Fijándonos en la distribución de genotipos en las distintas áreas geográficas (tabla 15) y centrándonos en los dos genotipos predominantes (A y D), vemos como el genotipo A se asocia significativamente al área rural ($p=0,001$). Mientras que en la zona costera el genotipo D es significativamente más prevalente ($p=0,001$). Además se observa una mayor prevalencia de los genotipos no A no D procedentes de población inmigrante en el área metropolitana (Tabla 15), que se refleja en un mayor índice de Shannon que en otras áreas geográficas.

En relación a los factores de riesgo predominantes en cada área geográfica se ha visto que la transmisión por vía sexual es significativamente más prevalente en el área metropolitana ($p=0,029$).

4.4 DISTRIBUCION DE GENOTIPOS Y FACTORES DE RIESGO EN GRUPOS DE COINFECTADOS CON EL VHC, VHD Y/O VIH

Estudiamos la distribución de genotipos y factores de riesgo en los diferentes grupos de coinfectados: no coinfectados, coinfectados con el VHC, coinfectados con el VHD y coinfectados con el VIH (Tabla 16).

- A.** Población no coinfectada total: el 81,1% de los infectados crónicos por VHB del AS eran pacientes no coinfectados. La mediana de edad de los pacientes no coinfectados fue de 53 años (RIC, 66-41).
- B.** Población coinfectada con el VHC total: un 7,2% de infectados crónicos por el VHB del AS eran pacientes coinfectados con el VHC. La prevalencia de infección por VHC en nuestra área en pacientes con HBC es de 0,04%. La mediana de edad de esta población fue de 50,5 años (RIC, 59-44,75).
- C.** Población coinfectada con el VIH total: un 10,6% de infectados crónicos por el VHB del AS eran pacientes coinfectados con el VIH. La prevalencia de infección por VIH en el AS en pacientes infectados crónicamente por VHB es de 0,057%. La mediana de edad de los pacientes infectados con el VIH, 47 años (RIC, 54-40,5), es más baja que la de otros grupos.
- D.** Población coinfectada con el VHD total: un 3,3% de infectados crónicos por el VHB del AS eran pacientes coinfectados con el VHD. La prevalencia de infección por VHD en pacientes infectados crónicamente por VHB en nuestra área es de 0,023%. La mediana de edad de los pacientes infectados por VHD es de 50 años (RIC, 60,5-38,5).

E. Población coinfectada por más de dos virus: 3 pacientes coinfectados con VHC, VIH y VHD; 3 pacientes coinfectados con VHC y VIH; 2 pacientes coinfectados con VHD y VHC.

El genotipo D es más prevalente en pacientes no coinfectados que en los coinfectados con VIH. Los genotipos G y F fueron significativamente más prevalentes en pacientes coinfectados con VIH.

La coinfección con VIH fue significativamente más prevalente en infectados con el genotipo A que en los infectados con el genotipo D ($p=0,001$).

El subgenotipo D3 está más asociado a coinfección que el subgenotipo D2 o D4 ($p<0,001$).

El factor de riesgo sexual se asoció de forma significativa con el grupo de infectados con el VIH ($p=0,001$). Mientras que la transmisión parenteral presentó una asociación significativa con la coinfección con VHC ($p<0,001$). Sin embargo, en el grupo de pacientes con factor de riesgo vertical predominan claramente los no coinfectados.

De los 8 pacientes con historia de EXUDVP documentada, 7 de ellos estaban coinfectados con VHC, de éstos 3 lo estaban también con VHD y 2 con VIH.

Tabla 16. Distribución de genotipos en los distintos grupos de coinfectados.

| Genotipos | Nocoinf. (%) | VHC (%) | VHD (%) | VIH (%) | p-valor |
|--------------|--------------|-----------|----------|-----------|----------|
| A | 14,9 | 25,0 | 20,0 | 26,3 | |
| B | 1,6 | 0,0 | 20,0 | 0,0 | |
| C | 2,7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | |
| D | 72,9 | 75,0 | 40,0 | 15,8 | <0,001** |
| E | 4,3 | 0,0 | 20,0 | 0,0 | |
| F | 1,1 | 0,0 | 0,0 | 21,1 | <0,001** |
| G | 1,6 | 0,0 | 0,0 | 36,8 | <0,001** |
| H | 1,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | |
| Total | 188 | 12 | 5 | 19 | |

*8 pacientes con múltiples coinfecciones (todo son genotipo D).

**Calculado entre NO y Coinfectados con VHC, VIH y/o VHD.

4.5 PREVALENCIA DE INFECTADOS CRONICOS POR VHB

La prevalencia de infectados crónicos por cada mil habitantes (carga de enfermedad por VHB) en el AS, en sus distintas zonas y en cada localidad aparece representada en las tablas 17, 18, 19 y 20; y en la figura 10.

4.5.1 Prevalencia de infectados crónicos en cada área

La prevalencia de infectados crónicos en el AS fue del 0,61%. Con respecto a las diferentes zonas que la componen, fue el AC donde se observó una significativa ($p < 0,001$) mayor prevalencia de infectados crónicos (1,13%), seguida del AM (0,50%) y AR (0,40%). En el AC se observó una mayor prevalencia de infectados crónicos de hepatitis B coinfectados con VHC ($p = 0,050$). En todas las áreas residían pacientes infectados crónicos por el VHB.

Tabla 17. Prevalencia de infectados crónicos por cada mil habitantes en el AM, AC, AR y AS total

| Área | Censo | Tot. (n) | P | No coinf (n) | P | VHC (n) | P | VIH (n) | P | VHD (n) | P |
|------|---------|----------|------|--------------|------|---------|------|---------|------|---------|------|
| AM | 184.853 | 93 | 0,50 | 54 | 0,29 | 5 | 0,03 | 9 | 0,05 | 4 | 0,02 |
| AC | 98.978 | 112 | 1,13 | 78 | 0,78 | 8 | 0,08 | 4 | 0,04 | 4 | 0,04 |
| AR | 154.165 | 62 | 0,40 | 37 | 0,24 | 4 | 0,02 | 5 | 0,03 | 2 | 0,01 |
| AS | 437.996 | 267 | 0,61 | 169 | 0,38 | 17 | 0,04 | 18 | 0,04 | 10 | 0,02 |

NOTA: Hay pacientes que aunque son seguidos en nuestra área sanitaria residen en localidades de otra área. n: número de pacientes; Tot.: número total de pacientes con HBC; P: prevalencia; VHC: número de pacientes con HBC del estudio coinfectados por VHC; VIH: número de pacientes con HBC del estudio coinfectados por VIH y VHD: número de pacientes con HBC del estudio coinfectados por VHD.

4.5.2 Prevalencia de infectados crónicos en cada localidad del AM

Santiago de Compostela fue la localidad del AM con una mayor prevalencia de infectados crónicos (0,70%) seguida por Ames

(0,62‰), Touro (0,54‰) y Brión (0,53‰). Las localidades más alejadas o peor comunicadas con Santiago de Compostela presentaron una menor prevalencia de infectados crónicos, siendo ésta similar a las localidades del AR.

Tabla 18. Prevalencia infectados crónicos por cada mil habitantes en cada una de las localidades del AM.

| Localidades | Población censada | Cró. tot (n) | Prev tot | Cró. no coinf (n) | Prev no coinf | Cró. coinf VHC (n) | Prev coinf VHC | Cró. coinf VIH (n) | Prev coinf VIH |
|--------------|-------------------|--------------|----------|-------------------|---------------|--------------------|----------------|--------------------|----------------|
| Ames | 30.544 | 19 | 0,62 | 12 | 0,39 | 1 | 0,03 | 2 | 0,07 |
| Boqueixón | 4.291 | 1 | 0,23 | 1 | 0,23 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Brión | 7.590 | 4 | 0,53 | 3 | 0,40 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Oroso | 7.420 | 3 | 0,40 | 2 | 0,27 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| O Pino | 4.653 | 2 | 0,43 | 1 | 0,21 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Santiago | 95.966 | 67 | 0,70 | 37 | 0,39 | 2 | 0,02 | 6 | 0,06 |
| Teo | 18.510 | 7 | 0,38 | 5 | 0,27 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Touro | 3.703 | 2 | 0,54 | 2 | 0,54 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Trazo | 3.190 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Val do Druba | 3.974 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Vedra | 5.012 | 1 | 0,20 | 0 | 0,00 | 0 | 0,0 | 1 | 0,20 |

4.5.3 Prevalencia de infectados crónicos en cada localidad del AC

En el área costera se encuentra las localidades con una mayor prevalencia de infectados crónicos por VHB de todo el AS: Rianxo (1,61‰), Ribeira (1,43‰), Noia (1,12‰), Porto do Son (1,07‰), A Pobra do Caramiñal (0,94‰) y Muros (0,91‰).

Tabla 19. Prevalencia de infectados crónicos por cada mil habitantes en cada una de las localidades del AC.

| Localidades | Población censada | Cró. total (n) | Prev. total | Cró. no coinf. (n) | Prev. no coinf. | Cró. coinf. VHC (n) | Prev. coinf. VHC | Cró. coinf. VIH (n) | Prev. coinf. VIH |
|----------------------|-------------------|----------------|-------------|--------------------|-----------------|---------------------|------------------|---------------------|------------------|
| Boiro | 18.871 | 8 | 0,42 | 5 | 0,26 | 1 | 0,05 | 0 | 0,0 |
| Carnota | 4.170 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| A Pobra do Caramiñal | 9.525 | 9 | 0,94 | 6 | 0,63 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Muros | 8.834 | 8 | 0,91 | 7 | 0,79 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Noia | 14.337 | 16 | 1,12 | 12 | 0,84 | 1 | 0,07 | 0 | 0,0 |
| Outes | 6.606 | 2 | 0,30 | 1 | 0,15 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Porto do Son | 9.386 | 10 | 1,07 | 7 | 0,75 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Rianxo | 11.188 | 18 | 1,61 | 11 | 0,98 | 2 | 0,18 | 0 | 0,0 |
| Ribeira | 27.249 | 39 | 1,43 | 30 | 1,10 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |

4.5.4 Prevalencia de infectados crónicos en cada localidad del AR

En el área rural se encontraron la mayoría de las localidades con baja prevalencia de VHB crónica. Aquellas localidades situadas entre el área costera y Santiago de Compostela, como Rois (1,07‰) y Pontecesures (0,99‰), registraron una mayor prevalencia de infectados crónicos en relación a otras localidades del AR. Un dato interesante es que otras localidades como Santa Comba (1,05‰), Santiso (1,20‰) y Toques (0,84‰), también registraron altas tasas de prevalencia a pesar de no estar próximas a núcleos de población importantes ni a la zona de costa.

Tabla 20. Prevalencia de infectados crónicos por cada mil habitantes en cada una de las localidades del AR.

| Localidades | Población censada | Cró total (n) | Prev total | Cró no coinf (n) | Prev no coinf | Cró coinf VHC (n) | Prev coinf VHC | Cró coinf VIH (n) | Prev coinf VIH |
|----------------|-------------------|---------------|------------|------------------|---------------|-------------------|----------------|-------------------|----------------|
| A Baña | 3.645 | 2 | 0,55 | 1 | 0,27 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| A Estrada | 20.891 | 5 | 0,24 | 1 | 0,05 | 0 | 0,0 | 2 | 0,10 |
| A Golada | 2.507 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Arzúa | 6.211 | 1 | 0,16 | 0 | 0,00 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Boimorto | 2.111 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Dodro | 2.853 | 1 | 0,35 | 0 | 0,00 | 1 | 0,35 | 0 | 0,0 |
| Dozón | 1.107 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Frades | 2.428 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Lalín | 20.044 | 2 | 0,10 | 0 | 0,00 | 1 | 0,05 | 0 | 0,0 |
| Lousame | 3.429 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Mazaricos | 4.087 | 1 | 0,24 | 1 | 0,24 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Melide | 7.488 | 2 | 0,27 | 2 | 0,27 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Mesía | 2.700 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Negreira | 6.911 | 1 | 0,14 | 1 | 0,14 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Ordes | 12.669 | 3 | 0,24 | 3 | 0,24 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Padrón | 8.581 | 2 | 0,23 | 1 | 0,12 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Pontecesures | 3.040 | 3 | 0,99 | 3 | 0,99 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Roís | 4.657 | 5 | 1,07 | 1 | 0,21 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Rodeiro | 2.644 | 1 | 0,38 | 1 | 0,38 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Santa Comba | 9.556 | 10 | 1,05 | 8 | 0,84 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Santiso | 1.672 | 2 | 1,20 | 1 | 0,60 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Silleda | 8.734 | 6 | 0,69 | 2 | 0,23 | 1 | 0,11 | 2 | 0,23 |
| Toques | 1.196 | 1 | 0,84 | 0 | 0,00 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Tordoia | 3.522 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Valga | 6.047 | 4 | 0,66 | 2 | 0,33 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Vila de Cruces | 5.435 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |

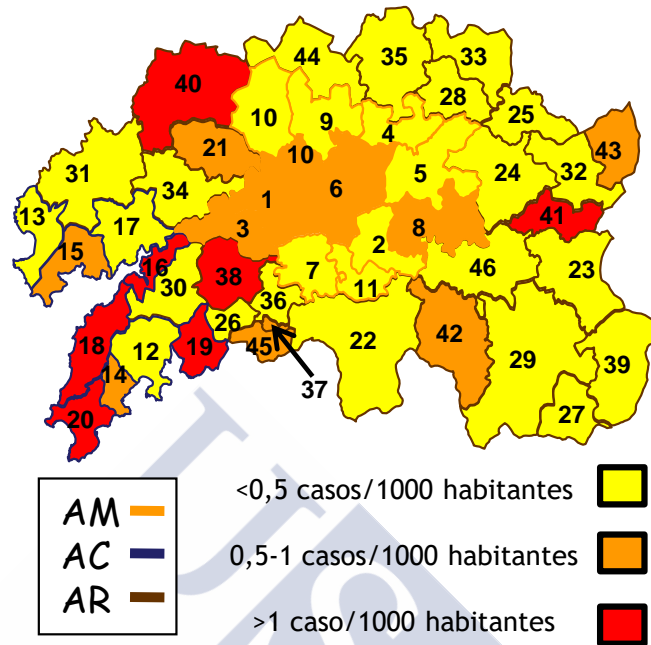


Figura 10. Prevalencia de infectados crónicos totales por VHB en el AS.

4.6 DISTRIBUCION DE GENOTIPOS EN LAS DISTINTAS FASES DE LA ENFERMEDAD

Los pacientes infectados crónicamente por VHB de nuestro área se distribuían en las distintas fases de la enfermedad del siguiente modo: Infección crónica con HBeAg positivo 6,9%, hepatitis crónica con HBeAg positivo 15,1%, infección crónica con HBeAg negativo 24% y hepatitis crónica con HBeAg negativo 53,3%.

La relación de las distintas fases de la enfermedad con la distribución de genotipos del VHB se representa en la tabla 21. En el grupo de pacientes infectados con el genotipo A es significativamente más prevalente la Hepatitis crónica HBeAg positivo con respecto a la población general ($p=0,001$). Mientras, el genotipo D se asocia de forma significativa a la infección crónica HBeAg negativo ($p=0,030$) y la hepatitis crónica HBeAg positivo es significativamente menos prevalente en los infectados con genotipo D ($p=0,003$).

Tabla 21. Distribución de genotipos en las distintas fases de la enfermedad

| Genotipos | HBeAg positivo | | HBeAg negativo | | p-valor |
|--------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------|
| | Infección crónica (%) | Hepatitis crónica (%) | Infección crónica (%) | Hepatitis crónica (%) | |
| A | 0,0 | 35,4* | 7,6 | 14,8 | 0,001* |
| B | 4,8 | 2,1 | 2,5 | 0,6 | |
| C | 9,5 | 2,1 | 1,3 | 2,4 | 0,003* 0,030** |
| D | 76,2 | 50,0* | 83,5** | 72,2 | |
| E | 9,5 | 0,0 | 5,1 | 1,8 | |
| F | 0,0 | 4,2 | 0,0 | 3,0 | |
| G | 0,0 | 4,2 | 0,0 | 4,7 | |
| H | 0,0 | 2,1 | 1,3 | 0,6 | |
| Total | 21 | 48 | 79 | 169 | |

p-valor calculado con respecto a la población total crónicamente infectada.

El genotipo A se asoció de forma significativa al HBeAg positivo ($p=0,004$). Mientras que el genotipo D se asoció de forma significativa al HBeAg negativo ($p=0,002$) (Tabla 22).

Tabla 22. Distribución de genotipos según la positividad o no de HBeAg.

| Genotipo | HBeAg positivo (%) | HBeAg negativo (%) | p-valor |
|----------|--------------------|--------------------|---------|
| A | 25,7 | 11,8 | 0,004 |
| B | 2,9 | 1,2 | |
| C | 4,3 | 2,0 | |
| D | 57,1 | 76,0 | 0,002 |
| E | 2,0 | 2,8 | |
| F | 2,9 | 2,0 | |
| G | 2,9 | 3,3 | |
| H | 1,4 | 0,8 | |
| Total | 70 | 246 | |

4.7 ASOCIACION DE LOS DIFERENTES GENOTIPOS CON LA PROGRESION DE LA ENFERMEDAD

4.7.1 Asociación de los diferentes genotipos con la progresión a cirrosis

De los 147 pacientes donde se pudo conocer su estadio hepático, un 20,4% se encontraba en estado cirrótico (F4), observándose una mayor asociación con el sexo masculino, la edad avanzada y el consumo de alcohol (Tabla 23).

Los pacientes cirróticos estaban infectados por los genotipos: D, el más prevalente con un 63,3%, A (33,3%) y G (3,3%). Analizando por subgenotipos se encontró que los subgenotipos A2 (28%), D2 (24%) y D4 (20%) eran los más prevalentes. Los pacientes infectados por los genotipos B y C de nuestro estudio son pacientes jóvenes que todavía no han progresado a cirrosis.

Tabla 23. Progresión a cirrosis por edad, sexo y consumo de alcohol en el total de pacientes donde se conocía su estadio hepático.

| | Edad (años) | | | Sexo | | | Consumo de alcohol | | |
|--------------|-------------|-----|-----------------|------|-----|-----------------|--------------------|--------|-----------------|
| | >50 | <50 | <i>p</i> -valor | H | M | <i>p</i> -valor | No exceso | Exceso | <i>p</i> -valor |
| F4 | 14,2 | 4,3 | 0,003 | 12,8 | 2,0 | 0,002 | 3,9 | 21,3 | <0,001 |
| Total | 169 | 149 | | 219 | 101 | | 103 | 80 | |

H: hombres; M: mujeres

4.7.2 Asociación de los diferentes genotipos con el desarrollo de carcinoma hepatocelular

De los 277 pacientes donde se pudo conocer la progresión o no a carcinoma hepatocelular, observamos una mayor asociación con el sexo masculino aunque no es estadísticamente significativa, la edad avanzada y la diabetes mellitus, en ambos casos obteniéndose una $p < 0,001$. No se ha encontrado asociación entre el desarrollo de CHC con el consumo excesivo de alcohol, la obesidad, con el origen no autóctono del paciente ni con la presencia de cirrosis (Tabla 24). Un total de 21 pacientes (7,6%) fueron diagnosticados de CHC y en los 9 pacientes que se conocía su estadio de fibrosis, todos ellos estaban en F4.

Los genotipo más prevalentes fueron el D (81%) y el A (9,5%), estando también representados el genotipo C y G cada uno de ellos por un paciente. Todos los pacientes con CHC infectados por el genotipo A, lo estaban por el subgenotipo A2. En cuanto a los infectados por genotipo D, estaban igual de representados el subgenotipo D2 y D4 (36,4% cada uno) mientras el genotipo D3 representa un 27,3% de las infecciones del genotipo D en pacientes con CHC.

Tabla 24. Desarrollo de CHC por edad, sexo y Diabetes mellitus en el total de pacientes donde se conocía su estadio hepático.

| | Edad (años) | | | Sexo | | | Diabetes mellitus | | |
|--------------|-------------|-----|-----------------|------|-----|-----------------|-------------------|-----|-----------------|
| | >50 | <50 | <i>p</i> -valor | H | M | <i>p</i> -valor | SI | NO | <i>p</i> -valor |
| CHC | 13,5 | 0,8 | <0,001 | 9,6 | 3,3 | | 33,3 | 3,7 | <0,001 |
| Total | 148 | 129 | | 187 | 90 | | 30 | 218 | |

H: hombres; M: mujeres

4.7.3 Asociación de los distintos genotipos de VHB con la necesidad de trasplante hepático

Un total de 28 pacientes (9,3%) de los infectados crónicos por VHB fueron trasplantados, de ellos un 82,1% eran del sexo masculino, un 70,6% consumían alcohol de forma abusiva y el 75% tenían más de 55 años. Se observaron diferencias significativas en la proporción de trasplantados en los diferentes grupos de edad, siendo más prevalente el trasplante en pacientes de >50 años, y también se observó una asociación significativa entre el consumo excesivo de alcohol y la necesidad de trasplante hepático (Tabla 25).

La distribución de genotipos en los pacientes trasplantados: sólo los genotipos A y D aparecen representados. El genotipo D fue el más prevalente (78,6%) y el genotipo A representó el 21,4%.

Los pacientes infectados con el genotipo A que fueron trasplantados tenían una mediana de edad en el momento de dicho trasplante de 41 años (RIC, 53,5-26), mientras en que los del genotipo D la mediana de edad fue de 56 años (RIC, 59,5-44).

Tabla 25. Necesidad de trasplante hepático por edad, sexo y consumo de alcohol en el total de la población donde se conocía su estadio hepático.

| | Edad (años) | | | Sexo | | | Consumo de alcohol | | |
|--------------|-------------|-----|-----------------|------|-----|-----------------|--------------------|--------|-----------------|
| | >50 | <50 | <i>p</i> -valor | H | M | <i>p</i> -valor | No exceso | Exceso | <i>p</i> -valor |
| Trasp | 14,9 | 3,1 | 0,001 | 11,3 | 5,2 | | 5,0 | 15,6 | 0,017 |
| Total | 161 | 140 | | 204 | 97 | | 101 | 77 | |

H: hombres; M: mujeres

4.7.4 Distribución de genotipos en la población total de estudio versus pacientes cirróticos, pacientes con CHC y pacientes trasplantados

En la tabla 26 se compara la distribución de genotipos en la población total con la misma en pacientes cirróticos, con CHC o trasplantados para relacionar cada uno de los genotipos con las posibles complicaciones de la hepatitis B crónica.

En pacientes cirróticos el genotipo A y concretamente el subgenotipo A1 son significativamente más prevalentes que en la población total, con un *p*-valor de 0,012 y 0,014, respectivamente. Sin embargo, en la población cirrótica del mismo modo que ocurre con los pacientes con CHC y los trasplantados, el subgenotipo D4 (predominante en nuestra área sanitaria) es significativamente menos prevalente que en la población total ($p < 0,001$ en los tres grupos).

Tabla 26. Distribución de genotipos en la población total de infectados crónicos y en los pacientes con cirrosis, CHC y/o trasplantados.

| Geno | Población total (%) | Cirróticos (%) | p-valor | CHC (%) | p-valor | Trasplantados (%) | p-valor |
|---------------|---------------------|----------------|---------|---------|---------|-------------------|---------|
| A | 15,3 | 33,3 | 0,012 | 9,5 | | 21,4 | |
| A1 | 2,2 | 10,0 | 0,014 | 0,0 | | 7,1 | |
| A2 | 12,8 | 23,3 | | 9,5 | | 14,3 | |
| D | 71,6 | 63,3 | | 81,0 | | 78,6 | |
| D1 | 1,6 | 0,0 | | 0,0 | | 0,0 | |
| D2 | 15,0 | 20,0 | | 19,0 | | 17,9 | |
| D3 | 4,4 | 10,0 | | 14,3 | | 10,7 | |
| D4 | 33,1 | 16,7 | <0,001 | 19,0 | <0,001 | 21,4 | <0,001 |
| noAnoD | 13,1 | 3,3 | | 9,5 | | 0,0 | 0,041 |
| Total | 320 | 30 | | 21 | | 28 | |

p-valor calculado en relación a la distribución de genotipos en la población total.

4.8 ASOCIACION DE LOS GENOTIPOS CON LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO

A 31 de diciembre del 2016, recibieron tratamiento el 67,4% (211 pacientes) del total de pacientes crónicamente infectados que habían sido diagnosticados y/o seguidos en las consultas externas de Digestivo, Hepatología y Enfermedades Infecciosas. En el AM sólo el 62,2% fueron tratados mientras que en el AC el 66,1%, llegando a un llamativo 75,4% en el AR, aunque no se observaron diferencias significativas entre las distintas áreas geográficas.

El 69% de la población nativa del estudio había sido tratada frente a sólo un 44,2% de los inmigrantes, encontrándose diferencias significativas entre ambos grupos ($p=0,001$).

De los 320 pacientes para los que se obtuvieron datos en relación al tratamiento recibido el 35% no recibieron tratamiento alguno y los

restantes siguieron las siguientes pautas de tratamiento antivírico: la mayoría fueron tratados con NUC (56,3%); el 0,3% (1 paciente) fue tratado solamente con IFN mientras el 8,4% de los pacientes recibieron IFN y NUC. En la tabla 27 se representa la proporción de pacientes tratados con los distintos antivirales.

Tabla 27. Tratamiento recibido por los pacientes infectados crónicamente por VHB.

| Tratamiento | % pacientes |
|--------------|-------------|
| No tto | 35,0 |
| IFN | 8,8 |
| LMV | 25,0 |
| LdT | 2,2 |
| ETV | 28,1 |
| ADV | 18,1 |
| TDF | 36,3 |
| Total | 320 |

Según el *EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection* (131) el objetivo óptimo del tratamiento de la hepatitis B es la pérdida del HBsAg. Con nuestros datos observamos que de un total de 211 pacientes crónicos tratados, sólo el 14,1% perdió el HBsAg. Se vio que el genotipo A presentaba mejor respuesta al tratamiento, en cuanto a pérdida de HBsAg se refiere, que el genotipo D ($p=0,009$).

Otro objetivo del tratamiento es la supresión de la carga viral que se consiguió en un 69,6% de los pacientes tratados. Se observó que el genotipo A presentaba mejor respuesta virológica que el genotipo D ($p=0,048$).

También es un objetivo del tratamiento la pérdida del HBeAg en aquellos pacientes con detección positiva de dicho antígeno en el momento del diagnóstico. En este estudio, de los 120 pacientes con HBeAg positivo en el momento del diagnóstico fueron tratados 99

(83,9%) mientras 19 no recibieron tratamiento alguno y en dos casos no nos consta si fueron o no tratados. Así, de los 99 pacientes que recibieron tratamiento y que presentaban HBeAg positivo en el momento del diagnóstico, el 60,2% perdieron el antígeno e. No se observaron diferencias significativas en la pérdida de HBeAg entre los genotipos A y D.

4.9 MUTACIONES DE ESCAPE Y MUTACIONES DE RESISTENCIA

De los 320 pacientes del estudio presentaron mutaciones de escape 64 de ellos (20%). Mientras en un 5,3% se encontraron mutaciones de resistencia.

El genotipo D tiene mayor frecuencia de mutaciones de escape que el genotipo A (24% genotipo D y 4,1% genotipo A).

La resistencia a Lamivudina es más frecuente en pacientes infectados por el genotipo A (22,4%) que por el D (10,9%), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

En la tabla 28 se puede observar el porcentaje de pacientes tratados con NUC que presentaban mutaciones de resistencia para los distintos antivirales.

Tabla 28. Proporción de pacientes con mutaciones de resistencia.

| Mutación RT | % pacientes |
|--------------|-------------|
| R_LMV | 18,0 |
| R_LdT | 15,2 |
| R_ETV | 1,9 |
| R_ADV | 5,2 |
| R_TDF | 0,5 |
| Total | 211 |

4.10 TENDENCIAS EN LA DISTRIBUCION DE LOS GENOTIPOS DEL VHB Y DISTRIBUCION EN LA POBLACION VIRAL CIRCULANTE

La distribución de genotipos en el total de la población crónicamente infectada comentada en apartados anteriores incluye pacientes fallecidos y pacientes con hepatitis B en fase de portador inactivo (infección crónica con HBeAg negativo), por lo que epidemiológicamente puede ser más interesante conocer la distribución de genotipos en la población viva con carga viral detectable y cuyos individuos son el reservorio para los nuevos casos de infección (Tabla 29 y 30). Por ello consideramos su cálculo importante ya que tendrá consecuencias en la futura distribución de genotipos.

El 52,2% (167 pacientes) de la población de infectados crónicos de hepatitis B del AS seguía presentando CV detectable a 31 de diciembre de 2016.

No se observaron diferencias significativas en la distribución de genotipos en la población crónicamente infectada con VHB analizada (320 pacientes) y los pacientes con carga viral circulante (167 pacientes), ni en su totalidad ni en las distintas áreas geográficas del AS.

Tabla 29. Comparación entre la distribución de genotipos en el total de pacientes diagnosticados de infección crónica por el VHB en el AS y la distribución de genotipos en la población virémica circulante.

| Geno | Total (%) | Con CV detectable (%) |
|--------------|------------|-----------------------|
| A | 15,3 | 10,8 |
| B | 1,6 | 1,8 |
| C | 2,5 | 2,4 |
| D | 71,6 | 74,3 |
| E | 3,1 | 5,4 |
| F | 2,2 | 1,8 |
| G | 3,1 | 3,0 |
| H | 0,6 | 0,6 |
| Total | 320 | 167 |

Tabla 30. Comparación entre la distribución de genotipos en el total de pacientes diagnosticados de infección crónica por el VHB en cada área geográfica y la distribución de genotipos en la población virémica circulante.

| Geno. | AM total (%) | AM con CV det (%) | p-valor | AC total (%) | AC con CV det (%) | p-valor | AR total (%) | AR con CV det (%) | p-valor |
|--------------|--------------|-------------------|---------|--------------|-------------------|---------|--------------|-------------------|---------|
| A | 18,3 | 7,8 | NS | 8,0 | 5,1 | NS | 27,4 | 23,1 | NS |
| B | 3,2 | 5,9 | NS | 1,8 | 0,0 | NS | 0,0 | 0,0 | NS |
| C | 4,3 | 2,0 | NS | 0,9 | 1,7 | NS | 1,6 | 3,8 | NS |
| D | 60,2 | 66,7 | NS | 83,9 | 84,7 | NS | 61,3 | 61,5 | NS |
| E | 2,2 | 3,9 | NS | 4,5 | 6,8 | NS | 3,2 | 7,7 | NS |
| F | 4,3 | 3,9 | NS | 0,0 | 0,0 | NS | 1,6 | 0,0 | NS |
| G | 6,5 | 7,8 | NS | 0,0 | 0,0 | NS | 4,8 | 3,8 | NS |
| H | 1,1 | 2,0 | NS | 0,9 | 1,7 | NS | 0,0 | 0,0 | NS |
| Total | 93 | 51 | | 112 | 59 | | 62 | 26 | |

Dado que los pacientes infectados por el genotipo A son proporcionalmente más tratados que los infectados por genotipo D (87,5% y 65,9%, respectivamente), es de esperar que la proporción de pacientes con genotipo A con carga viral circulante haya disminuido en relación a los pacientes no tratados. Para ello, comparamos nuestros resultados con los trabajos de Echevarría *et al.* 2005 y Rodríguez-Nóvoa *et al.* 2004 (tabla 31) y vemos que la proporción de genotipo A en nuestra población con carga viral circulante es menor con un 10,8% frente al 25% que obtienen Echevarría *et al.* y el 14% de Rodríguez-Nóvoa *et al.* en pacientes en su mayoría no tratados, habiendo en el primero de los casos diferencias estadísticamente significativas. En el caso del genotipo D no se observan diferencias significativas en la distribución de este genotipo en los distintos grupos de pacientes, estando igualmente representado en todos ellos. Sin embargo, si se agrupan los genotipo no A no D se observa una mayor proporción de éstos genotipos en los pacientes de nuestro estudio que han sido tratados pero que mantienen la carga viral detectable en relación a los grupos de pacientes no tratados de

Rodríguez-Nóvoa *et al.* y Echevarría *et al.* ($p < 0,05$), lo que refleja entre otras circunstancias una peor respuesta al tratamiento de los genotipos no A no D.

El genotipo G muestra una tendencia creciente en nuestro área si comparamos la proporción que representa en nuestra población de estudio (3%) en relación a los estudios previos de los años 2004 y 2005, tal y como se ve en la tabla 31.

Tabla 31. Tendencia en la distribución de genotipos del VHB en Galicia y España.

| Geno | Con CV detectable (%) | Rodríguez-Nóvoa <i>et al.</i> 2004 (%) | Echevarría <i>et al.</i> 2005 (%) | p-valor |
|--------------|-----------------------|--|-----------------------------------|-------------|
| A | 10,8 | 14,0 | 25,3 | <0,001** |
| B | 1,8 | 0,0 | 0,7 | |
| C | 2,4 | 0,0 | 2,2 | |
| D | 74,3 | 82,0 | 66,2 | >0,05* / ** |
| E | 5,4 | 0,0 | 3,7 | |
| F | 1,8 | 3,0 | 1,9 | |
| G | 3,0 | 1,0 | 0,0 | |
| H | 0,6 | 0,0 | 0,0 | |
| Total | 167 | 101 | 269 | |

*Rodríguez-Nóvoa *et al.* 2004

**Echevarría *et al.* 2005

4.11 COMPARACION ENTRE LOS GENOTIPOS MAYORITARIOS EN NUESTRO AS: GENOTIPOS A Y D

Tabla 32. Comparación de las características principales de los genotipos A y D, predominantes en nuestra AS

| | Genotipo A | Genotipo D | p-valor |
|--|-------------|-------------|------------------|
| Sexo | Hombre* | Mujer** | 0,002* / 0,003** |
| Edad | * | >50 años** | NS* / 0,001** |
| Historia natural | HC HBeAg+* | IC HBeAg-** | 0,001* / 0,030** |
| Presencia de Ag e (DIAGNÓSTICO) | 73,3% | 31,5% | <0,001 |
| CV diagnóstico | 37 millones | 23 millones | |
| Pérdida HBsAg | 22,7% | 6,1% | <0,001 |
| Tratamiento | 87,5% | 62,3% | 0,001 |
| Respuesta virológica (última CV INDET) | 62,5% | 45,1% | 0,029 |
| Respuesta serológica (pérdida HBeAg) | 40% | 24,8% | NS |
| Transmisión vertical | 4,1% | 14,4% | 0,048 |
| Coinfección VHC | 6,8% | 8,6% | NS |
| Coinfección VIH | 13,5% | 5,6% | NS |
| Coinfección VHD | 2,3% | 3,2% | NS |

Los pacientes infectados crónicamente con VHB del genotipo D se pertenecen principalmente al grupo de edad de mayores de 50 años.

Los pacientes infectados crónicamente con VHB se asocian de forma significativa a distintas fases de la enfermedad. El genotipo A se asocia a la hepatitis B crónica con HBeAg positivo mientras el genotipo D lo hace con la infección crónica con HBeAg negativo. Además, de forma general el genotipo A se relaciona con la presencia de antígeno e de forma significativa mientras que con el genotipo D ocurre lo contrario.

La carga viral en el momento del diagnóstico es mayor en los pacientes infectados por el genotipo A que por el D.

Los pacientes infectados con el genotipo A son significativamente más tratados que los infectados por el genotipo D y además la respuesta virológica es mayor. Sin embargo, la respuesta serológica (pérdida de HBeAg) no presenta diferencias significativas entre ambos genotipos.

La infección por genotipo D se asocia de forma significativa a la transmisión vertical a diferencia de la infección por genotipo A.

En la relación a la coinfección con otros virus, no se han encontrado diferencias significativas entre los genotipos A y D.

4.12 ESTUDIO FILOGENETICO

4.12.1 Clasificación de los genotipos de VHB encontrados en nuestra serie.

Los análisis filogenéticos implementados en este estudio consistieron en una serie de etapas de diferente nivel de complejidad que aportaban diferentes inferencias epidemiológicas, evolutivas o filodinámicas. La primera fase consistía en clasificar las secuencias que teníamos por genotipos. Según el árbol de máxima verosimilitud mostrado en la figura 11, de las 122 secuencias incluidas en el estudio, 43 fueron genotipo A (distribuidos en 3 secuencias como genotipo A1 y 40 secuencias como genotipo A2) y el resto genotipo D, siendo todas ellas clasificadas como D4. Si bien estos son los genotipos más prevalentes en Europa y España, lo sorprendente es que todas las secuencias del genotipo D, pertenecían al subgenotipo D4, el cual está muy poco representado en los bancos de secuencias, probablemente debido a una baja prevalencia de este subgenotipo.

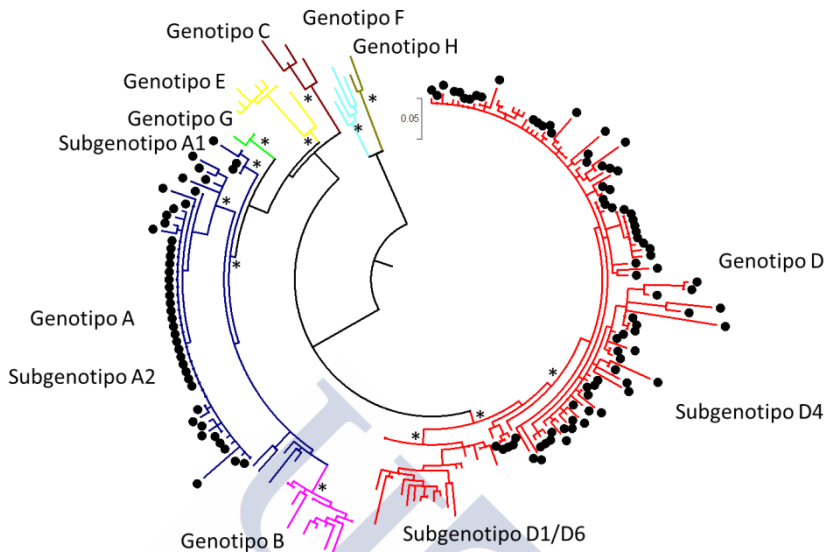


Figura 11. Genotipado del virus de la hepatitis. Alineamiento de 345 nucleótidos con secuencias de referencia. Árbol de máxima verosimilitud GTR+I+G obtenido con PhyML. Se indican valores de bootstrap >70% y las muestras pertenecientes a Santiago de Compostela

El inesperado hallazgo de la alta proporción de subgenotipo D4 en nuestra serie, sugería que había ocurrido una única entrada de esta variante en el entorno de Santiago de Compostela, desde los sitios descritos con una mayor prevalencia de esta variante. Para ello se realizó un análisis filogeográfico, diferenciando el origen de las secuencias obtenidas que estaban disponibles en las bases de datos mundiales. Como se observa en la figura 12, la mayoría de las secuencias estas estrechamente relacionadas con cepas de Sudamérica, sin embargo, 3 cepas están más relacionadas con los subgenotipos descritos en África (posible origen de este subgenotipo) y 5 secuencias más relacionadas con variantes encontradas en Asia. Estos resultados, excluyen la posibilidad de un único punto de entrada de las secuencias de subgenotipo D4 encontrados en nuestra serie. Es destacable como 8 secuencias se localizan en el árbol en una posición filogenética entre las secuencias de origen africano y las secuencias descritas en Sudamérica, sugiriendo la posibilidad de una transmisión de España a

Sudamérica o al menos una transmisión bidireccional de los casos de infecciones por subgenotipo D4.

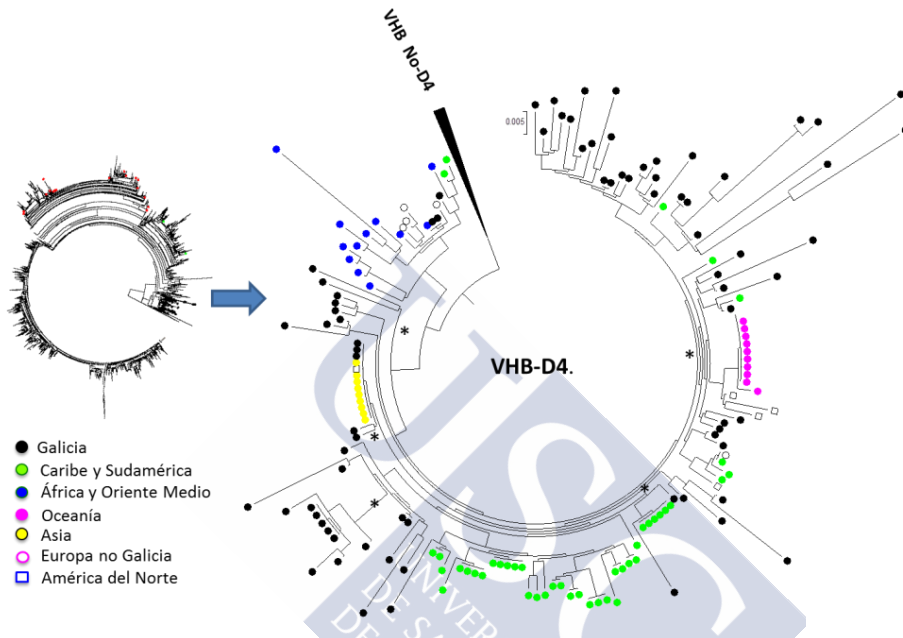


Figura 12. Filogeografía VHB para subgenotipo D4. Árbol de máxima verosimilitud GTR+I+G obtenido con FastTree, basado en el análisis de 345 nucleótidos incluyendo 85 secuencias de referencia. Se indican soportes >80%.

Por su parte, el análisis filogeográfico de las secuencias clasificadas como genotipo A. Los resultados para el subgenotipo A1 (solo 3 secuencias) permiten inferir un patrón de vías de entrada similar al comentado en subgenotipo D4 (figura 13a). Sin embargo, no se pueden inferir ninguna conclusión para el subgenotipo A2, debido a ser una secuencia muy corta para un subgenotipo muy ampliamente distribuido a nivel mundial. Puede observarse en figura 13b, como el árbol no tiene resolución para diferenciar entre secuencias de múltiples orígenes.

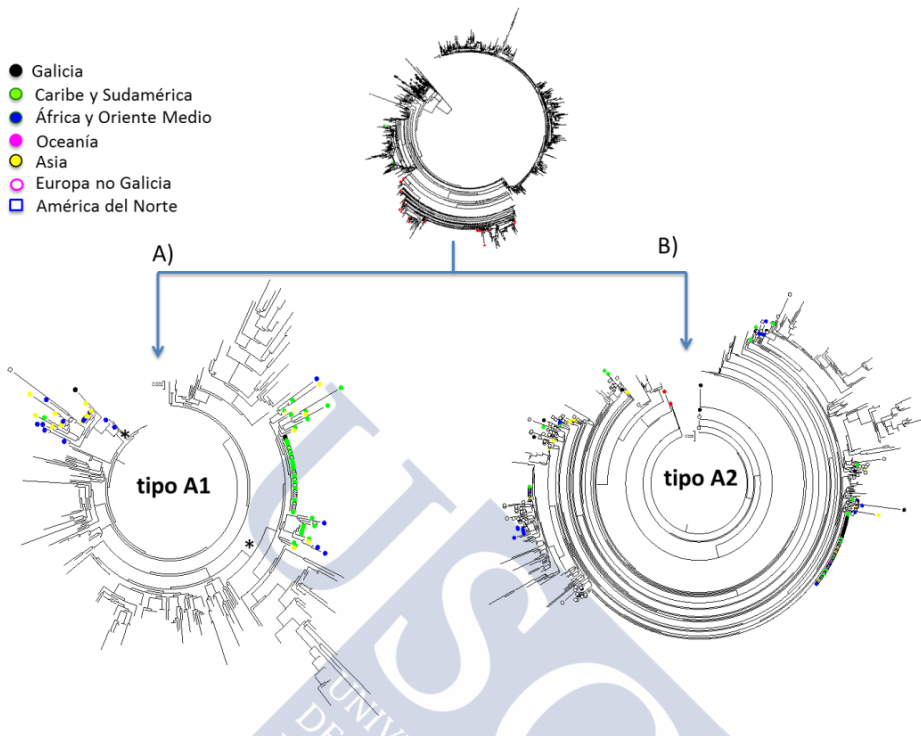


Figura 13. Filogeografía VHB tipos A. Árbol de máxima verosimilitud GTR+I+G obtenido con FastTree. Se indican soportes >75%. A) Análisis para subgenotipo A1 y B) Análisis para subgenotipo A2.

El hallazgo de un alto porcentaje de secuencias pertenecientes al subgenotipo D4, que no parecen estar relacionado con una entrada única en Galicia, excluye la posibilidad de un brote epidémico de subgenotipo D4 en nuestro entorno, pero no excluye la posibilidad de ser el subgenotipo D4 el responsable del incremento en el número de casos observados en Galicia en el periodo de estudio (1 de enero de 2000 y el 31 de diciembre de 2016). Para comprobar esta hipótesis, realizamos un estudio sobre la variación del tamaño poblacional efectivo a lo largo del tiempo comprendido en un intervalo de 20 años (desde 1995-2015). En la figura 14a, se observa como en el periodo comprendido entre finales de 2004-2007 se observa un claro incremento del tamaño poblacional de VHB, en Santiago de Compostela. Sin embargo, el nuevo reanálisis separando por

subgenotipos, vuelve a presentarnos una nueva sorpresa. El cambio de tendencia en el tamaño poblacional no está asociado al subgenotipo D4 (tamaño poblacional estable), según figura 14b; sin embargo el incremento estuvo asociado al subgenotipo A2 (figura 14c), coincidiendo en el tiempo el incremento de este subgenotipo con el incremento global observado para VHB.

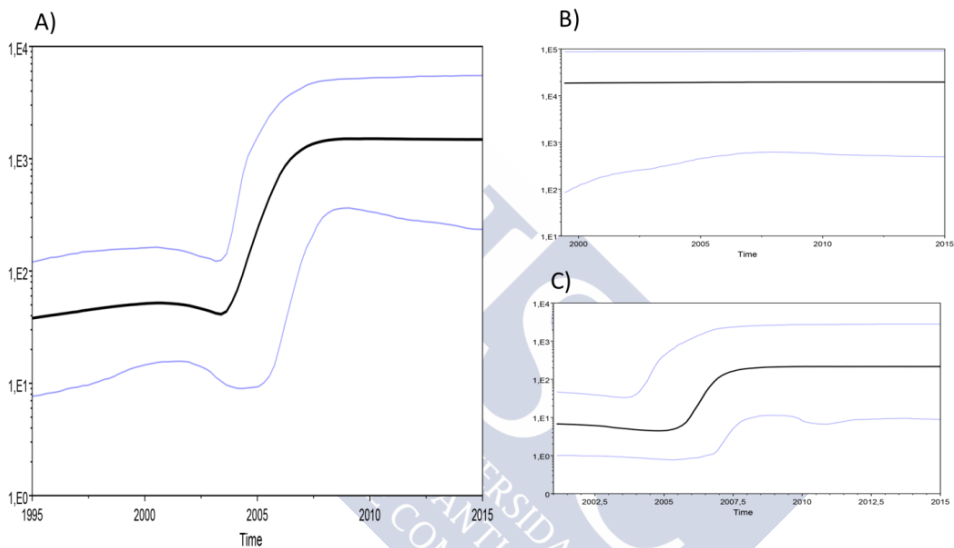


Figura 14. Análisis demográfico de la epidemia de VHB en Santiago de Compostela. Variación del tamaño de la población efectiva (eje Y) a lo largo del tiempo asumiendo una variación de la población constante y el método Bayesian Skyline. La línea indica el valor de la mediana y los valores inferior y superior del intervalo al 95%. A) variación del VHB en Santiago de Compostela. El cambio de tendencia se observa entre el último trimestre de 2004 y último de 2007 B) Variación del VHB tipo D4. C) Variación del VHB tipo A2. El cambio de tendencia se observa entre el último trimestre de 2005 y el último de 2007

Según se deduce de los diferentes análisis realizados hasta el momento, el hallazgo del subgenotipo D4, escasamente referenciado en la bibliografía, con una alta presencia en Galicia, podría haber estado circulando desde hace tiempo en nuestro entorno. Para comprobar esta hipótesis, realizamos un árbol bayesiano con datación (figura 15). Según este nuevo árbol (y con el sesgo de la temporalidad de las secuencias disponibles) se puede inferir que el subgenotipo D4

pudo aparecer en nuestro entorno sobre 1981 (con un intervalo de confianza entre 1970-1998), si bien su expansión en la población no ocurrió antes de 1996 (en un intervalo entre 1985-2000). Por el contrario, como era esperable la presencia de subgenotipos de A es anterior a la fecha propuesta para el subgenotipo D4. Sin embargo, la expansión del subgenotipo A2 se observa desde 2004, coincidente con los resultados obtenidos en el análisis anterior (figura 14).

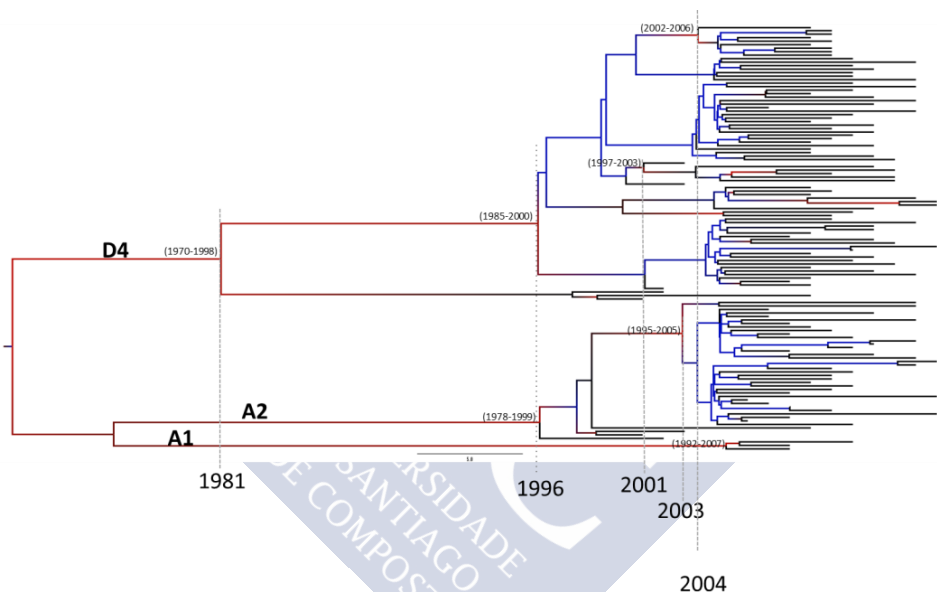


Figura 15. Filogenia datada de VHB tipos A y D4. Arbol Bayesiano usando el modelo GTR+I+G y una tasa de mutación relajada según un modelo logarítmico obtenido con BEAST. La probabilidad posterior de cada nodo se indica con un gradiente de color entre azul (0) y rojo (1). Se indica la datación con su intervalo de confianza al 95 % de todos los nodos de transmisión con una probabilidad posterior >80%



5 LIMITACIONES DEL ESTUDIO

- Se han encontrado 15 casos de posibles coinfecciones con varios genotipos que no se han podido confirmar mediante hibridación o NGS.
- De los 320 pacientes genotipados, sólo en 263 se consiguió conocer el subgenotipo.
- El factor de riesgo asociado a la infección por VHB se desconoce en la mayoría de los casos (78,4%).
- Los fragmentos secuenciados son demasiado pequeños para el subtipado del VHB, siendo el “gold estándar” para dicho subtipado del virus la secuenciación completa del genoma. En consecuencia los resultados y sus conclusiones deben de ser consideradas cautelarmente.
- El análisis filogenético basado en la secuenciación parcial del genoma puede conllevar la clasificación errónea de diversos subgenotipos. Algunos autores remarcan la necesidad de realizar los análisis filogenéticos en el genoma completo para evitar dichos errores (245).
- Dificultad para encontrar datos de los pacientes por estar las historias incompletas, especialmente en los pacientes no monitorizados en las consultas de hepatología.



6 DISCUSIÓN

Esta tesis doctoral se centra en el estudio de la epidemiología molecular relacionada con la distribución de genotipos del VHB procedentes de 320 pacientes infectados crónicamente con dicho virus y que han sido diagnosticados entre el año 2000 y 2016 en el área sanitaria de Santiago de Compostela. Se han recogido múltiples variables clínicas, virológicas y terapéuticas de forma retrospectiva en un grupo heterogéneo de pacientes todos ellos con hepatitis B crónica. El número de pacientes incluidos en el estudio permite extraer conclusiones muy interesantes y novedosas, pues son pocos los trabajos publicados de hepatitis B crónica en nuestro entorno y ninguno de ellos reciente.

La influencia de los genotipos del virus de la hepatitis B (VHB) en la historia natural de la enfermedad y su respuesta al tratamiento antiviral se ha abordado en muchos estudios. Este estudio a nivel regional proporciona la descripción más completa de la distribución de genotipos del VHB en nuestra área sanitaria, Galicia y España, realizada hasta la fecha y refleja el origen y la pluralidad de la población residente en el AS de Santiago de Compostela, al igual que ocurre en otras regiones de España como muestra el estudio GEHEP 010 (116).

Además del genotipado de VHB en los 320 pacientes se ha llevado a cabo un estudio filogenético en 122 de éstos pacientes que permite reconstruir parte de la historia de la infección por VHB en nuestra área sanitaria.

El conocimiento de la circulación de genotipos a nivel local proporciona información relevante para futuras políticas de vigilancia epidemiológica molecular para identificar y controlar la dispersión

viral, especialmente la importación y diseminación de nuevos genotipos en un área geográfica (180).

Distribución de genotipos

La distribución global de genotipos del VHB en el total de la población estudiada es la siguiente: genotipo D representa el 71,6% siendo el más prevalente en nuestra área y el genotipo A con un 15,3% es el segundo más prevalente, quedando los demás genotipos representados minoritariamente. Estos datos arrojan resultados similares a otros trabajos anteriores realizados en España (12, 36, 108, 114). Si bien, Rodríguez-Frías *et al* en el año 2006 observaron que el genotipo A y el D eran los más prevalentes, ambas proporciones estaban más igualadas (39,5% y 48,1%, respectivamente). Y en el trabajo de Sánchez-Tapias *et al* en el año 2002 se obtuvo la siguiente distribución de genotipos: 52% para el genotipo A, 35% de genotipo D y 7% genotipo F.

De forma general en toda España y particularmente en nuestra AS, los genotipos A y D son los mayoritarios en la población autóctona aunque su proporción varía entre las distintas áreas geográficas consideradas y también con respecto a otros países.

Por otra parte, España es una puerta de entrada de inmigrantes en Europa por lo que la emergencia de genotipos del VHB propios de otras áreas geográficas puede ocurrir en nuestro país de forma cuanto menos similar al resto del continente europeo (36). Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan esta hipótesis, por un lado la distribución de genotipos en la población nativa es diferente a la distribución observada en inmigrantes. De forma general, los genotipos B, C y E son significativamente más prevalentes en la población inmigrante mientras el genotipo D es significativamente más prevalente en población nativa. En segundo lugar, se observó que los pacientes inmigrantes infectados eran más jóvenes que los nativos, lo que indica la reciente entrada de genotipos no autóctonos en nuestro país. Y finalmente, la proporción de genotipos no A no D (genotipo B (1,6%), C (2,5%) y E (3,1%)) es mayor en nuestro estudio que en

otros estudios españoles realizados hace más de diez años (12, 36, 98, 108, 114), lo que refleja un cambio en la distribución de genotipos del VHB en España relacionado con la inmigración.

Un 3,4% de los 268 pacientes nativos de nuestro estudio estaban infectados por genotipo G. Hasta el momento, el genotipo G sólo se había reportado en dos países europeos, Francia y Alemania (179, 246). Echevarría *et al.* en el estudio realizado en 2005 concluían que no identificaran ningún paciente infectado por dicho genotipo (36). Por tanto, es la primera vez que se describe la presencia del genotipo G del VHB en España. Además, nuestros datos reflejan una asociación significativa del genotipo G del VHB con la coinfección por VIH como ya ha sido descrito con anterioridad (247).

En lo referente a la distribución de genotipos de VHB en Europa pocos son los estudios que reflejan la prevalencia de genotipos y subgenotipos de VHB (102, 105, 106).

Globalmente los genotipos del VHB predominantes en el continente europeo son el genotipo A y el D. Sin embargo, los patrones de distribución de los genotipos varían entre las distintas zonas geográficas como demuestra un estudio de prevalencia de genotipos en el centro y este de Europa. Además este estudio concluyó que la proporción de genotipos E y F eran menor a la observada en el sur de Europa (98, 248) debido a la menor afluencia de inmigrantes procedentes del continente africano hacia las regiones del Centro y Este de Europa (249).

De forma general en el continente europeo, los datos epidemiológicos disponibles en la literatura sugieren un cambio en el genotipo del VHB predominante en el centro del continente donde hasta el momento predominaba el genotipo A del VHB que está dejando paso al avance del genotipo D (105), reflejándose en una menor representación del genotipo A en los pacientes más jóvenes. Esto se explica por el flujo migratorio creciente hacia países centroeuropeos en los últimos años (105).

Comparando la proporción que representa el genotipo D en otros países europeos como Alemania, Francia y Suíza (58%, 53% y 58%,

respectivamente) (250-252) con los resultados obtenidos en nuestro estudio (71,6%), se puede concluir tal y como figura en la literatura que el genotipo D es el más prevalente en el área mediterránea, en países como Grecia con un 98% de genotipo D en población nativa (102) y España.

En relación a la distribución de subgenotipos del VHB en Europa, al contrario de lo encontrado en nuestra área el subgenotipo D4 no está representado en la población objeto de estudio de Vratnica *et al* en Montenegro en el año 2015 (106). En este estudio se observó una mayor proporción de subgenotipo D2 (36,8%), D3 (32,3%) y A2 (19,8%) (106). Tanto los resultados obtenidos en el presente trabajo como los obtenidos por Costa *et al.* (109) en nuestro AS muestran que el subgenotipo D4 es el predominante; 40,7% y 59%, respectivamente.

Sexo

Con respecto a las características epidemiológicas, un 68,4% eran hombres. Tanto en el estudio de Echevarría *et al* (36) como en el de Basaras *et al* (114) la proporción de sexos es equivalente a la encontrada en nuestro grupo de pacientes al igual que en otros estudios en Europa (102, 105, 106). Sin embargo, Sánchez-Tapias *et al* encontraron una mayor proporción de pacientes del sexo masculino (81%).

Se observaron diferencias significativas en la distribución de genotipos entre sexos, el genotipo A fue significativamente más prevalente en hombres mientras el genotipo D fue significativamente más prevalente en mujeres. Del mismo modo el subgenotipo D4 y el D1 son más prevalentes en mujeres mientras que el subgenotipo A2 se ha visto que es más prevalente en hombres. La distinta distribución de genotipos en función del sexo puede relacionarse con los factores de riesgo implicados en la transmisión del virus.

Edad

La media de edad de los 320 pacientes es de 52 años mientras que en todos los estudios españoles previos la media de edad de los

pacientes era menor; 43,5 años en el estudio de Echevarría *et al* (36); 46,57 años en el trabajo de Basaras *et al* (114); 36 años en los pacientes estudiados por Sánchez-Tapias *et al* (98). Esto puede reflejar una disminución en el número de nuevos casos de hepatitis B en nuestro país, pues los estudios referenciados datan del año 2005, 2007 y 2002, respectivamente. Por tanto, la probable disminución del número de casos unida al curso de la historia natural de la enfermedad y al efecto del tratamiento que disminuye la progresión de la enfermedad aumentando la supervivencia de los pacientes, puede explicar que los pacientes de nuestro estudio sean de mayor edad en relación a estudios previos realizados en España.

Las medianas de edad de los pacientes infectados crónicamente por VHB en Europa son menores (41 años en Montenegro (106); 45,5 años en Grecia (102) y 37 años en Alemania(105)) que la obtenida en nuestro estudio (52 años). Esto se puede explicar al menos en parte por la mayor proporción de pacientes inmigrantes incluidos en esos estudios (105).

Al contrario de lo que ocurre en otros estudios realizados en hepatitis C, en nuestro estudio los hombres con hepatitis B crónica tenían una mediana de edad de 55 años (RIC, 65-43) mientras las mujeres tenían una mediana de edad de 45 años (RIC, 63-35), es decir, éstas eran más jóvenes.

Por otra parte, nuestros datos también reflejan que los pacientes con hepatitis B crónica infectados por genotipos no A no D son más jóvenes que los infectados por los genotipos autóctonos, lo que parece indicar una reciente entrada de nuevos genotipos en nuestro país que está estrechamente relacionado a su vez con que la población inmigrante sea más joven.

Analizando la proporción de genotipos en los distintos grupos de edad, que se establecen en base al descubrimiento del VHB y posteriormente de la vacuna para combatirlo, se observó que los genotipos autóctonos disminuyen proporcionalmente en favor de los genotipos B, C y E, que infectan fundamentalmente población inmigrante, en los grupos de menor edad. Además, los inmigrantes con HBC son más jóvenes que los pacientes nativos. Esto parece

indicar, tal y como apuntaron otros autores previamente (36), que el aumento de la inmigración está cambiando la epidemiología del VHB en España.

Se ha visto, al igual que ocurría en otros trabajos (108), que el genotipo D es significativamente más prevalente en el grupo de pacientes de mayor edad. En general, el genotipo D presenta una tendencia directamente proporcional a la edad. Más específicamente, el subgenotipo D4 (el más prevalente en nuestra área) se mantiene en una proporción constante en todos los grupos de edad mientras que el genotipo D1 no está representado en los pacientes más jóvenes, lo que indica que es un subgenotipo que está dejando de circular en nuestra área geográfica.

Sin embargo, el genotipo A representa una proporción equivalente en todos los grupos de edad.

Nativos/Inmigrantes

La inmigración en curso de países con una alta endemicidad del VHB a aquellos con una baja endemicidad del VHB merece especial atención para evitar la propagación de la infección a la población nativa (253).

Los genotipos A y D del VHB predominan en los inmigrantes de Europa del Este, B y C en los de Asia y el genotipo E en los africanos. El manejo de la infección por VHB en población inmigrante es difícil y requiere de personal experto y estructuras organizadas para su asistencia (253).

La posibilidad de propagación a la población nativa del VHB por parte de esta población inmigrante se ve potenciada por el hecho de que estas personas no están siendo tratadas en su mayoría (55,8%), tal y como reflejan nuestros resultados, y por ello tienen una viremia más elevada que hace más probable la transmisión a otras personas.

Del total de 320 pacientes con hepatitis B crónica en los que se ha estudiado el genotipo, un 16,25% eran inmigrantes. Este dato

contrasta con lo obtenido en el año 2015 en un estudio alemán que referían un 81% de pacientes nacidos fuera del país (105).

Los pacientes inmigrantes de nuestro estudio eran más jóvenes que la población autóctona, lo que refiere una infección y/o una llegada a nuestro país más reciente. Esto se ve reflejado en la distribución de genotipos en los distintos grupos de edad, tal y como ya se comentó, de modo que los genotipos no autóctonos eran más prevalentes en los pacientes de menor edad.

Las características moleculares de la infección por el VHB en los inmigrantes reflejan las de sus áreas geográficas de origen (253). La distribución de genotipos en la población inmigrante de nuestro estudio fue la siguiente: un 15,4% estaba infectada con genotipo A, 9,6% con genotipo B, 15,4% con genotipo C, 36,5% con genotipo D, 17,3% con genotipo E, 3,8% con genotipo F y 1,9% con genotipo G. El predominio de genotipo D y E se corresponde con los resultados obtenidos por Rivas *et al.* en el 2013 en población africana residente en España (115). Sin embargo, Toro *et al.* en el 2006 reportó un predominio de genotipo D seguido de genotipo A y E (113). Resultados similares obtuvieron Bottecchia *et al* analizando el genotipo de VHB en 29 pacientes inmigrantes residentes en España y obteniendo un 20,7% de subgenotipo A1, un 48,3% de A3, un 6,9% de D2 y un 24,1% de genotipo E (254).

En los 52 pacientes inmigrantes incluidos en el estudio se observó una mayor prevalencia de los genotipos B, C y E que en población autóctona, no pudiendo compararse estos datos con algunos estudios españoles que no diferencian según el origen de los pacientes (36, 98, 114) o bien incluyen solamente población autóctona (108).

Un estudio en población inmigrante del sur de Italia reportó la siguiente distribución de genotipos: 68,9% genotipo E, 16,5% genotipo A, 11,9% genotipo D y 2,7% genotipo C (255). A diferencia de lo que ocurre en nuestro AS el genotipo E es mayoritario entre la población inmigrante, lo que está justificado por una mayor afluencia de personas originarias de África sub-sahariana al sur de Italia.

La distribución de genotipos en población inmigrante del sur de Italia ha demostrado al igual que ocurre en nuestro estudio que los genotipos B, C y E son más prevalentes que en la población autóctona lo que indica la llegada de estos genotipos, hasta ahora no presentes, en Europa (256). Además comparando la distribución de genotipos en ambos países, se observó que los pacientes infectados por genotipos no D, especialmente B, C y E han aumentado a lo largo de los años (12, 253, 257). Esto se observa de forma clara al comparar nuestros datos con el estudio hecho por Rodríguez-Nóvoa *et al* en el año 2004 (12) en nuestro AS y viendo como los genotipos B, C y E pasaron de no estar representados a constituir una proporción nada desdeñable.

La presencia de genotipo E y F en población autóctona demuestra la introducción de estos genotipos en nuestro país, tal y como sugerían algunos autores (36, 104). Este dato también se reflejó en nuestro estudio, existiendo un 1,9% de población autóctona infectada con genotipo F y un 0,4% con genotipo E, a diferencia de lo ocurrido con los genotipos B y C que estaban representados únicamente en población inmigrante.

La introducción de genotipos exóticos en países con hasta ahora baja prevalencia de hepatitis B crónica se prevé que modifique la distribución de genotipos local y las vías de transmisión, lo que podría tener un importante impacto en las medidas profilácticas, la capacidad de diagnóstico y las medidas terapéuticas instauradas hasta el momento (245).

Factores de riesgo

En relación a los factores de riesgo asociados a la infección por el VHB, se ha documentado que en el 78,4% de los pacientes la vía de transmisión era desconocida. Sánchez-Tapias *et al.* en el año 2002 también afirmaban la imposibilidad de identificar la vía de transmisión de la infección en la mayoría de los casos estudiados (98). Teniendo esto en cuenta, se ha visto que la principal vía de transmisión identificada es la vertical (11,9%), seguida de la parenteral (5,9%) y finalmente la vía sexual (3,8%). Sin embargo, el

factor de riesgo sexual es el predominante en el trabajo de Basaras *et al* dato no muy concluyente por el escaso número de pacientes incluidos en este trabajo (114).

Los resultados obtenidos difieren de los encontrados por otros autores que observan una frecuencia mayor de factor de riesgo parenteral (46,7%), seguido del sexual (16%) y sólo un 4,7% vertical (106).

En relación a la distribución de los factores de riesgo asociados a la infección por VHB según los grupos de edad en nuestro estudio se observa una mayor participación de la transmisión vertical en el grupo de edad de menores de 50 años, en detrimento del factor de riesgo parenteral y sexual. Esto se puede deber por una parte a la mejora en las medidas preventivas para evitar la transmisión sexual y de igual modo las mejoras en el control de las transfusiones sanguíneas y la transmisión nosocomial y por otra, al aumento de población, fundamentalmente inmigrante, que no hace un seguimiento médico durante el embarazo lo que conlleva un mayor riesgo de transmisión vertical del VHB.

El 4,1% de los infectados por genotipo A se documentó transmisión sexual mientras que sólo un 1,8% de los infectados por genotipo D presentaron transmisión por esta vía. Esto se corresponde con lo observado por otros autores que concluyen que el genotipo A se transmite fundamentalmente por vía sexual (52) y de forma más eficiente que el genotipo D (106, 258). Algunos autores afirman que la prevalencia del genotipo A es significativamente más alta en la población de HSH que en el resto de la población (259). Sin embargo, en nuestro estudio no se ha podido estudiar este dato debido a la falta de información en relación a este factor de riesgo.

En los pacientes con genotipo A de nuestro estudio es más prevalente el factor de riesgo parenteral que el vertical, mientras que en los pacientes infectados por el genotipo D se observó una asociación significativa con la transmisión vertical.

Nuestros datos reflejan una clara asociación del subgenotipo D3 con el hecho de ser EXUDVP al igual que la literatura previa (106,

260), aunque no se observan diferencias significativas debido al bajo número de casos documentados con este factor de riesgo.

Los genotipos no autóctonos (no A no D) se asocian de forma significativa con la transmisión sexual del VHB.

Las vías de transmisión dependen en gran medida de la prevalencia de infección crónica que haya en cada área (261). Se ha visto que la transmisión vertical predomina en áreas de alta endemicidad (181), pero en nuestro estudio es el principal factor de riesgo documentado a pesar de existir una baja prevalencia de hepatitis B crónica. Esto se puede deber a una mayor facilidad para documentar la transmisión vertical que otros tipos de transmisión como la sexual.

Coinfecciones con otros virus que comparten vía de transmisión

En nuestro estudio un 7,2% estaban coinfectados con VHC, un 10,6% con VIH y un 3,3% con VHD, resultados similares a los obtenidos por Rodríguez-Frías *et al* (8,66% VHC, 5,54% VHD y 3,46% con ambos virus)(108). Comparando estos resultados con los obtenidos por Rodríguez-Nóvoa *et al* (12) en el año 2004 se observa un mayor porcentaje de coinfección con VHC y un descenso en el número de coinfecciones con VIH.

Sin embargo, en otros estudios las coinfecciones con otros virus son motivo de exclusión (102), por lo que no se puede comparar la proporción de población coinfectada.

Deterding *et al.* en Europa del Este obtuvo una coinfección con VHC menor al 10%, lo que coincide con nuestros resultados (249).

El genotipo D es más prevalente en pacientes no coinfectados que en los coinfectados con VIH mientras que los genotipos G y F fueron significativamente más prevalentes en pacientes coinfectados con VIH.

Comparando los genotipos más prevalentes en el AS, se observó que la coinfección con VIH fue significativamente más prevalente en infectados con el genotipo A que en los infectados con el genotipo D.

El subgenotipo D3 está más asociado a coinfección que el subgenotipo D2 o D4. Esto se debe a la clara asociación que presenta este subgenotipo con EXUDVP.

En los pacientes coinfectados con VHC y/o VHD no se ha podido establecer relación alguna con la distribución de genotipos dado el bajo número de pacientes coinfectados con estos virus en el estudio.

El factor de riesgo sexual se asoció de forma significativa con el grupo de infectados con el VIH, probablemente por el hecho de que los HSH con VIH tienen mayor riesgo de coinfección con VHB por vía sexual (262), y la transmisión parenteral presentó una asociación significativa con la coinfección con VHC. Sin embargo, en el grupo de pacientes con factor de riesgo vertical predominan claramente los no coinfectados.

De los 8 pacientes con historia de EXUDVP documentada, 7 de ellos estaban coinfectados con VHC, de éstos 3 lo estaban también con VHD y 2 con VIH.

VHD: Especial mención merece la coinfección/sobreinfección por el VHD. En nuestro estudio se ha visto que la tasa de infección crónica por VHD en pacientes con hepatitis B crónica es del 3,3% lo que refleja la baja prevalencia de esta infección en nuestra área, tal y como demuestran los datos publicados recientemente por nuestro grupo (166). La infección por VHD en España y el resto de Europa había disminuido en los últimos años gracias a la introducción de la vacuna frente al VHB y también al descenso de la transmisión en usuarios de drogas por vía parenteral (166, 167, 263, 264). Recientemente parece apreciarse un repunte en el número de nuevos casos de infección por VHD que se asocia al incremento de inmigrantes en nuestro país, al igual que ocurre en otros países Europeos (166, 252, 265, 266).

Áreas geográficas

La prevalencia de infectados crónicos en nuestra AS puede estar infraestimada debido a que sólo se han incluido aquellos pacientes con

carga viral detectable en el momento del diagnóstico y que por tanto, ha sido posible el genotipado.

Teniendo en cuenta esta limitación, se obtiene una prevalencia de hepatitis B crónica (infección crónica por VHB) en el AS del 0,61%. Con respecto a las diferentes zonas que la componen, fue el AC donde se observó una significativa mayor prevalencia de infectados crónicos (1,13%), seguida del AM (0,50%) y AR (0,40%). En el AC donde tradicionalmente la presencia de UDVP es más acusada y la carga de la enfermedad es mayor, también se observa una mayor prevalencia de coinfecciones con VHC y VHD. Los pacientes coinfectados con VIH residían casi en su totalidad en el AC y el AM, no apreciándose diferencia entre ambas. Estos hallazgos pueden explicarse teniendo en cuenta las características poblacionales de las distintas áreas geográficas como pueden ser la mayor densidad de población, la mayor tasa de inmigración y una población más joven en el AM y el AC en comparación con el AR.

En cuanto a la prevalencia de genotipos en las distintas zonas del AS, vemos como el genotipo A se asocia significativamente al área rural en contraposición al genotipo D que es significativamente más prevalente en las otras áreas geográficas. Además se observa una mayor prevalencia de los genotipos no A no D procedentes de población inmigrante en el área metropolitana, que se refleja en un mayor índice de Shannon y que está en relación con la mayor prevalencia de población inmigrante en esta área respecto a las demás.

La transmisión sexual se ha visto que es significativamente más prevalente en el área metropolitana, la cual también presenta asociación con la coinfección por VIH.

Historia natural de la enfermedad

Al igual que concluían Sanchez-Tapias *et al.* en año 2002 (98), en nuestro estudio tampoco fue posible analizar diversos factores relevantes en la historia natural de la enfermedad, como por ejemplo la duración de la infección antes de la inclusión del paciente en el estudio.

En nuestro estudio al igual que ocurre en la mayoría de estudios previos, se ha visto una asociación significativa del genotipo A con la hepatitis crónica con HBeAg + mientras el genotipo D se asocia a infección crónica con HBeAg- o fase de portador inactivo (96, 103, 108).

Presencia de HBeAg

El 73,3% de los pacientes infectados por el genotipo A son HBeAg positivo frente a un 31,5% de los infectados por el genotipo D, esto concuerda con lo encontrado previamente por otros autores que sugieren que las cepas del genotipo D muestran tendencia a establecer infecciones crónicas HBeAg negativas debido a la selección de mutantes *precore*-defectivas (36, 96, 98, 249).

Complicaciones: Cirrosis, CHC, Trasplante y Mortalidad

En cuanto a la tendencia a desarrollar hepatitis crónica en función de los genotipos infectantes, se ha descrito en la literatura que por ejemplo el genotipo A está más asociado a la persistencia de la infección que los demás genotipos (41). Sin embargo, en nuestro estudio no es posible analizar este dato debido a que sólo se han incluido en el mismo los pacientes con hepatitis crónica.

El carcinoma hepatocelular puede estar asociado a varios factores pero la hepatitis B crónica es la causa en el 50% de los casos en todo el mundo y en el 70-80% de los casos en países endémicos (267).

Scotto *et al* han observado un 6,3% de progresión a cirrosis y un 1,6% de CHC en población inmigrante infectada por VHB que vive en Italia (256). Nuestros datos reflejan una mayor proporción de pacientes con HBC que progresaron a cirrosis (20,4%) y también con CHC% (7,6%).

El genotipo D es más prevalente en pacientes con CHC mientras que el genotipo A predomina en los pacientes cirróticos, resultado ya descrito previamente en la literatura (8, 192, 208, 268). Sin embargo, en un estudio realizado en Taiwan con 272 pacientes crónicos se ha

visto tanto la incidencia de cirrosis como de CHC es mayor en los infectados por el genotipo D que en los infectados por genotipo A (41, 192, 208).

Recientemente, se han publicado varios sistemas de puntuación clínica que usan el genotipo del VHB junto a otros factores como la edad, el sexo o los niveles séricos de ADN del virus, para predecir la progresión a CHC (179, 269). Por este motivo, conocer el genotipo del VHB permite mejorar el manejo clínico de los pacientes con hepatitis B crónica a través de un sistema de vigilancia más estricto en aquellos casos en los que se prevé una mayor probabilidad de desarrollar malignidad. Sin embargo, hasta el momento estos modelos de predicción sólo se han estudiado en población asiática por lo que solo hay datos de genotipo C y B, siendo el primero el que tiene puntuación más alta para el desarrollo de CHC.

Respuesta al tratamiento antiviral

En nuestro estudio, el genotipo A presenta una mayor tasa de curación que el genotipo D, esto se refleja en un mayor porcentaje de aclaramiento de HBsAg (22,7% para el genotipo A y 6,1% para el genotipo D) y en una mejor respuesta virológica, con una carga viral indetectable en un 62,5% de los pacientes infectados por genotipo A frente a un 45,1% de los infectados por genotipo D, resultados también obtenidos en otros estudios españoles (98).

El genotipo A presenta una mejor tasa de curación y una mayor respuesta serológica que el genotipo D en nuestro AS. Sin embargo, en relación a la pérdida de HBeAg debido al tratamiento no se han podido establecer diferencias significativas entre los dos genotipos más prevalentes, esto puede ser debido al hecho de que el genotipo D se asocia la negativización del HBeAg por mutaciones en la región BCP/PC.

Mutaciones del gen S

Las mutaciones de escape inmune favorecen la transmisión viral incluso en individuos vacunados, además de promover la reactivación viral en condiciones de inmunodepresión y de aumentar el fitness de cepas resistentes a antivirales (49). Por todo ello, es muy importante conocer la prevalencia de estas mutaciones en nuestra área para poder diseñar correctamente las estrategias de diagnóstico, prevención y control de la hepatitis B crónica.

En nuestro estudio hemos observado una prevalencia de mutaciones de escape del 20%, similar a la encontrada por Colagrossi *et al* (49) al analizar 935 secuencias de VHB de pacientes tratados con NUC procedentes de 15 países europeos, entre ellos España, donde se observaron una tasa de mutaciones del 22,1% y donde como en nuestro caso se observó mayor frecuencia en el genotipo D que en el genotipo A (24% para el genotipo D y 4,1% para el genotipo A). Sin embargo, nuestros datos difieren con otros estudios (270, 271) donde se refieren porcentajes de mutaciones de escape inferiores, lo cual puede estar en relación con la diferente distribución de genotipos y con las características de la población estudiada.

Mutaciones de resistencia

La selección de variantes portadoras de mutaciones que confieren resistencia a NUC era el principal problema del tratamiento prolongado con estos antivirales de primera generación. Sin embargo, la terapia antiviral oral con agentes de mayor potencia y barrera genética como el ETV y el TDF ha reducido drásticamente la aparición de resistencias y se ha convertido en un pilar fundamental del tratamiento de la hepatitis B crónica. Esto se debe a la potente y duradera supresión viral que ejercen, la sencillez de dosificación y la ausencia de efectos adversos y de generación de resistencias.

En nuestra AS se ha observado una proporción de mutaciones de resistencia del 5,3% frente al 2,2% obtenido en un estudio en Etiopía o el 3,1% obtenido por otros autores en Italia. Sin embargo, Colagrossi *et al.* obtuvieron una tasa mucho mayor de mutaciones de resistencia

estudiando un total de 935 secuencias provenientes de pacientes tratados con NUC en 15 países europeos. Este último dato puede explicarse por el hecho de que estos autores incluyeron en el estudio solamente pacientes tratados con NUC (49), mientras que en nuestra población sólo el 64,7% había sido tratados con análogos de nucleós(t)idos.

Nuestros datos reflejan que la resistencia a Lamivudina es más frecuente en pacientes infectados por el genotipo A (22,4%) que por el D (10,9%), como ya vieron otros autores (272, 273).

Bottechia *et al* observaron resistencia a Lamivudina en 6,9% de los inmigrantes naïve, lo que significa que el aumento de la inmigración en nuestro país también puede venir acompañado de un aumento de la resistencia a Lamivudina (254).

En resumen, numerosos estudios han demostrado, y el nuestro lo ha confirmado, que los diferentes genotipos y subgenotipos presentan diferentes características clínicas, virológicas y epidemiológicas y constituyen por tanto un elemento clave en la epidemiología molecular de la infección por el VHB.

En cuanto al significado clínico del genotipo viral en la infección por el VHB, hay que señalar que el genotipo es una variable que potencialmente puede influir en el resultado de la HBC por lo que se refiere a su progresión y pronóstico y también en el éxito de la terapia antiviral, debido a sus diferentes propiedades biológicas. En este sentido, existen algunas evidencias en términos de progresión de la enfermedad y respuesta al tratamiento antiviral que se han ido reconociendo progresivamente.

No obstante, a pesar de estas evidencias y de las tímidas recomendaciones aparecidas en las últimas guías, se necesitan más datos adicionales, antes de poder recomendar definitivamente su determinación en la práctica clínica, ya que a diferencia de como ocurrió con la hepatitis C, el genotipo viral en la hepatitis B posee todavía un pobre valor predictivo individual y sólo con él no se deben tomar decisiones vinculadas al tratamiento. Sin embargo, en la base de

poder acumular líneas de evidencia, como hemos intentado en este trabajo, recomendamos que todos los portadores del VHB sean rutinariamente genotipados para ayudar a identificar a aquellos que tienen un mayor riesgo de progresión de la enfermedad hepática y aquellos que puedan beneficiarse de la terapia antiviral óptima.

Por otra parte, el genotipado del virus de la hepatitis B, que comenzó como una herramienta de investigación, principalmente para estudiar su patrón evolutivo, ahora está disponible en cada vez más laboratorios clínicos. En este sentido, la necesaria disponibilidad del genotipado del VHB en los laboratorios de microbiología clínica junto a su potencial utilidad, posibilitarán su incorporación a la práctica médica habitual en un futuro cercano.





7 CONCLUSIONES

A continuación se presentan las conclusiones más interesantes de los resultados de esta Tesis Doctoral:

1. Distribución y prevalencia global de los genotipos del VHB: En el Área Sanitaria de Santiago de Compostela en infectados crónicos por VHB se observa un claro predominio del genotipo D con un 71,6% seguido del genotipo A con un 15,3%. Los genotipos no A no D representan el 13,1% observándose en estos una tendencia creciente en relación a estudios previos en nuestro área debido principalmente al incremento de la inmigración. Por otra parte, en nuestro estudio reportamos por primera vez en España la presencia de la infección por el genotipo G del VHB.
2. Características poblacionales globales: El 68,4% de los 320 pacientes con hepatitis B crónica del estudio eran hombres y el 31,6% mujeres con diferencias significativas en las medianas de sus edades (55 años vs 45 años). Se ha encontrado que el genotipo A es más prevalente en hombres mientras el D lo es en mujeres. En cuanto a la edad, la prevalencia en los genotipos D, B, C y E del VHB fue dependiente de ésta de manera directamente proporcional para el D e inversamente para el resto.
3. Procedencia: La distribución y prevalencia de genotipos, así como las características poblacionales son diferentes entre la población gallega autóctona e inmigrante. Población gallega autóctona que representa el 83,8%: edad 56 años (RIC, 66-44), 70,1 % hombres, 11,1% coinfectados con VIH, 8,2% con VHC, 3,2% VHD y vía predominante de transmisión desconocida (79,1%). Distribución de genotipos: 78,4% genotipo D, 15,3% genotipo A, 3,4% genotipo G, 1,9% genotipo F, 0,7% genotipo H y un 0,4%

genotipo E. Población gallega inmigrante (16,3%): edad 37 años (RIC, 42-28,5), 59,6 % hombres, 8,7% coinfectados con VIH, 2,1% con VHC, 4,1% VHD y vía predominante de transmisión desconocida (75%). Distribución de genotipos: 36,5% genotipo D, 17,3% genotipo E, 15,4% genotipo A, 15,4% genotipo C, 9,6% genotipo B, 3,8% genotipo F y un 1,9% genotipo G.

4. Vías de transmisión: En conjunto la vía de transmisión más frecuente fue la categorizada como de origen de desconocido, seguida de la vertical, parenteral y sexual. En este apartado el genotipo D en su conjunto se asocia a la transmisión por vía vertical, mientras que el subgenotipo D3 lo hace con la transmisión parenteral. Por otra parte los genotipos no A no D se asocian al factor de riesgo sexual.
5. Distribución geográfica: La distribución de genotipos y su prevalencia varía entre las distintas áreas geográficas del AS de Santiago de Compostela, encontrándose un índice de Shannon mayor en el área metropolitana, lo que refleja una mayor diversidad de genotipos. Mientras el genotipo A se asocia al área rural, el genotipo D es más prevalente el área costera y metropolitana. Por su parte, la carga de la enfermedad es mayor en el AC (1,13%), seguida del AM (0,50%) y del AR (0,40%).
6. Coinfección con VIH: En los pacientes coinfectados con el VIH la prevalencia de los genotipos A, G y F fue mayor que en los pacientes no coinfectados, mientras que en el caso del genotipo D fue significativamente menor.
7. Diferencias entre los genotipos mayoritarios: Al comparar las diferentes características epidemiológicas, clínicas y virológicas entre los genotipos más prevalentes, el A y el D, entre la población gallega autóctona hemos encontrado numerosas diferencias significativas. Así, el genotipo A es más prevalente en hombres, en el área rural, en pacientes con HC HBeAg positivo, es proporcionalmente más tratado y se asocia a presencia de antígeno e y carga viral más alta en el momento del diagnóstico. Como

contraste, el genotipo D es más prevalente en mujeres, en mayores de 50 años, en el área costera, en la fase de IC HBeAg negativo y se asocia a transmisión vertical.

8. Filogenia: El estudio filogenético confirma dentro del genotipo D un inesperado predominio del subgenotipo D4 en nuestro área que no se debe a un brote epidémico y por otra parte confirma respecto al genotipo A un aumento en el número de casos en los últimos años debido al incremento del subgenotipo A2.
9. Resumen: Este estudio confirma que en nuestra área sanitaria, la distribución de genotipos del VHB varía con la edad, el sexo, la procedencia, en las diferentes fases de la historia natural de la HBC, en la respuesta al tratamiento y en la coinfección con el VIH y el VHC y también dentro de las diferentes áreas geográficas y grupos epidemiológicos.





8 BIBLIOGRAFÍA

1. Mac CF. Homologous serum hepatitis. *Proc R Soc Med.* 1946;39:655-7.
2. Blumberg BS, Gerstley BJ, Hungerford DA, London WT, Sutnick AI. A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis. *Ann Intern Med.* 1967;66(5):924-31.
3. Prince AM. An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1968;60(3):814-21.
4. Okochi K, Murakami S. Observations on Australia antigen in Japanese. *Vox Sang.* 1968;15(5):374-85.
5. Prince AM. Nature of non-A, non-B hepatitis viruses. *Lancet.* 1. England 1982. p. 1181-2.
6. Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet.* 1970;1(7649):695-8.
7. Magnius LO, Espmark A. A new antigen complex co-occurring with Australia antigen. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol.* 1972;80(2):335-7.
8. Shi YH. Correlation between hepatitis B virus genotypes and clinical outcomes. *Jpn J Infect Dis.* 2012;65(6):476-82.
9. Burns GS, Thompson AJ. Viral hepatitis B: clinical and epidemiological characteristics. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014;4(12):a024935.
10. Ott JJ, Stevens GA, Groeger J, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis B virus infection: new estimates of

- age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity. *Vaccine*. 2012;30(12):2212-9.
11. Sunbul M. Hepatitis B virus genotypes: global distribution and clinical importance. *World J Gastroenterol*. 2014;20(18):5427-34.
 12. Rodriguez-Novoa S, Gomez-Tato A, Aguilera-Guirao A, Castroagudin J, Gonzalez-Quintela A, Garcia-Riestra C, et al. Hepatitis B virus genotyping based on cluster analysis of the region involved in lamivudine resistance. *J Virol Methods*. 2004;115(1):9-17.
 13. Ganem D. Assembly of hepadnaviral virions and subviral particles. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1991;168:61-83.
 14. Robinson WS, Lutwick LI. The virus of hepatitis, type B (first of two parts). *N Engl J Med*. 1976;295(21):1168-75.
 15. Robinson WS, Lutwick LI. The virus of hepatitis, type B. (Second of two parts). *N Engl J Med*. 1976;295(22):1232-6.
 16. Robinson WS, Clayton DA, Greenman RL. DNA of a human hepatitis B virus candidate. *J Virol*. 1974;14(2):384-91.
 17. Gish RG, Given BD, Lai CL, Locarnini SA, Lau JY, Lewis DL, et al. Chronic hepatitis B: Virology, natural history, current management and a glimpse at future opportunities. *Antiviral Res*. 2015;121:47-58.
 18. Walsh R, Locarnini S. Hepatitis B precore protein: pathogenic potential and therapeutic promise. *Yonsei Med J*. 2012;53(5):875-85.
 19. Summers J, 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 U S A*. 1975;72(11):4597-601.
 20. Jones SA, Hu J. Hepatitis B virus reverse transcriptase: diverse functions as classical and emerging targets for antiviral intervention. *Emerg Microbes Infect*. 2013;2(9):e56.

21. Tang H, Oishi N, Kaneko S, Murakami S. Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus x protein. *Cancer Sci.* 2006;97(10):977-83.
22. Tong S, Revill P. Overview of hepatitis B viral replication and genetic variability. *J Hepatol.* 2016;64(1 Suppl):S4-16.
23. Yan H, Li W. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide acts as a receptor for hepatitis B and D virus. *Dig Dis.* 2015;33(3):388-96.
24. Yeh CT, Wong SW, Fung YK, Ou JH. Cell cycle regulation of nuclear localization of hepatitis B virus core protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(14):6459-63.
25. Aiba N, McGarvey MJ, Waters J, Hadziyannis SJ, Thomas HC, Karayiannis P. The precore sequence of hepatitis B virus is required for nuclear localization of the core protein. *Hepatology.* 1997;26(5):1311-7.
26. Summers J, Mason WS. Replication of the genome of a hepatitis B--like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell.* 1982;29(2):403-15.
27. Courouce-Pauty AM, Lemaire JM, Roux JF. New hepatitis B surface antigen subtypes inside the ad category. *Vox Sang.* 1978;35(5):304-8.
28. Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, et al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol.* 1988;69 (Pt 10):2575-83.
29. Norder H, Hammas B, Lofdahl S, Courouce AM, Magnus LO. Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. *J Gen Virol.* 1992;73 (Pt 5):1201-8.
30. Croagh CM, Desmond PV, Bell SJ. Genotypes and viral variants in chronic hepatitis B: A review of epidemiology and clinical relevance. *World J Hepatol.* 2015;7(3):289-303.

31. Kramvis A. Genotypes and genetic variability of hepatitis B virus. *Intervirology*. 2014;57(3-4):141-50.
32. Yuen MF, Lai CL. Hepatitis B virus genotypes: natural history and implications for treatment. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2007;1(2):321-8.
33. Kramvis A, Arakawa K, Yu MC, Nogueira R, Stram DO, Kew MC. Relationship of serological subtype, basic core promoter and precore mutations to genotypes/subgenotypes of hepatitis B virus. *J Med Virol*. 2008;80(1):27-46.
34. Norder H, Courouce AM, Magnius LO. Molecular basis of hepatitis B virus serotype variations within the four major subtypes. *J Gen Virol*. 1992;73 (Pt 12):3141-5.
35. Norder H, Courouce AM, Coursaget P, Echevarria JM, Lee SD, Mushahwar IK, et al. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology*. 2004;47(6):289-309.
36. Echevarria JM, Avellon A, Magnius LO. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Spain: identification of viral genotypes and prediction of antigenic subtypes by limited sequencing. *J Med Virol*. 2005;76(2):176-84.
37. Lok AS. Clinical significance of hepatitis B virus genotypes. www.uptodate.com/2018 [
38. Mizokami M, Orito E, Ohba K, Ikeo K, Lau JY, Gojobori T. Constrained evolution with respect to gene overlap of hepatitis B virus. *J Mol Evol*. 1997;44 Suppl 1:S83-90.
39. Torres C, Fernandez MD, Flichman DM, Campos RH, Mbayed VA. Influence of overlapping genes on the evolution of human hepatitis B virus. *Virology*. 2013;441(1):40-8.
40. Simmonds P, Midgley S. Recombination in the genesis and evolution of hepatitis B virus genotypes. *J Virol*. 2005;79(24):15467-76.

41. Lin CL, Kao JH. Hepatitis B virus genotypes and variants. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015;5(5):a021436.
42. Locarnini S, Littlejohn M, Aziz MN, Yuen L. Possible origins and evolution of the hepatitis B virus (HBV). *Semin Cancer Biol.* 2013;23(6 Pt B):561-75.
43. Yang J, Xing K, Deng R, Wang J, Wang X. Identification of Hepatitis B virus putative intergenotype recombinants by using fragment typing. *J Gen Virol.* 2006;87(Pt 8):2203-15.
44. Shi W, Zhu C, Zheng W, Carr MJ, Higgins DG, Zhang Z. Subgenotype reclassification of genotype B hepatitis B virus. *BMC Gastroenterol.* 2012;12:116.
45. Rodriguez-Frias F, Buti M, Tabernero D, Homs M. Quasispecies structure, cornerstone of hepatitis B virus infection: mass sequencing approach. *World J Gastroenterol.* 2013;19(41):6995-7023.
46. Locarnini S. Molecular virology and the development of resistant mutants: implications for therapy. *Semin Liver Dis.* 2005;25 Suppl 1:9-19.
47. Zhang ZH, Wu CC, Chen XW, Li X, Li J, Lu MJ. Genetic variation of hepatitis B virus and its significance for pathogenesis. *World J Gastroenterol.* 2016;22(1):126-44.
48. Yeh CT. Development of HBV S gene mutants in chronic hepatitis B patients receiving nucleotide/nucleoside analogue therapy. *Antivir Ther.* 2010;15(3 Pt B):471-5.
49. Colagrossi L, Hermans LE, Salpini R, Di Carlo D, Pas SD, Alvarez M, et al. Immune-escape mutations and stop-codons in HBsAg develop in a large proportion of patients with chronic HBV infection exposed to anti-HBV drugs in Europe. *BMC Infect Dis.* 2018;18(1):251.
50. 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(2):434-43.

51. Trepo C, Chan HL, Lok A. Hepatitis B virus infection. *Lancet*. 2014;384(9959):2053-63.
52. Zehender G, Ebranati E, Gabanelli E, Sorrentino C, Lo Presti A, Tanzi E, et al. Enigmatic origin of hepatitis B virus: an ancient travelling companion or a recent encounter? *World J Gastroenterol*. 2014;20(24):7622-34.
53. Hannoun C, Soderstrom A, Norkrans G, Lindh M. Phylogeny of African complete genomes reveals a West African genotype A subtype of hepatitis B virus and relatedness between Somali and Asian A1 sequences. *J Gen Virol*. 2005;86(Pt 8):2163-7.
54. Sugauchi F, Orito E, Ichida T, Kato H, Sakugawa H, Kakumu S, et al. Hepatitis B virus of genotype B with or without recombination with genotype C over the precore region plus the core gene. *J Virol*. 2002;76(12):5985-92.
55. Sakamoto T, Tanaka Y, Simonetti J, Osiowy C, Borresen ML, Koch A, et al. Classification of hepatitis B virus genotype B into 2 major types based on characterization of a novel subgenotype in Arctic indigenous populations. *J Infect Dis*. 2007;196(10):1487-92.
56. Osiowy C, Larke B, Giles E. Distinct geographical and demographic distribution of hepatitis B virus genotypes in the Canadian Arctic as revealed through an extensive molecular epidemiological survey. *J Viral Hepat*. 2011;18(4):e11-9.
57. 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(3):908-16.
58. Mulyanto, Pancawardani P, Depamede SN, Wahyono A, Jirintai S, Nagashima S, et al. Identification of four novel subgenotypes (C13-C16) and two inter-genotypic recombinants (C12/G and C13/B3) of hepatitis B virus in Papua province, Indonesia. *Virus Res*. 2012;163(1):129-40.

59. Davies J, Littlejohn M, Locarnini SA, Whiting S, Hajkovicz K, Cowie BC, et al. Molecular epidemiology of hepatitis B in the Indigenous people of northern Australia. *J Gastroenterol Hepatol.* 2013;28(7):1234-41.
60. Hudjashov G, Kivisild T, Underhill PA, Endicott P, Sanchez JJ, Lin AA, et al. Revealing the prehistoric settlement of Australia by Y chromosome and mtDNA analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(21):8726-30.
61. Abd El Kader Mahmoud O, Abd El Rahim Ghazal A, El Sayed Metwally D, Elnour AM, Yousif GE. Detection of occult hepatitis B virus infection among blood donors in Sudan. *J Egypt Public Health Assoc.* 2013;88(1):14-8.
62. Ghosh S, Banerjee P, RoyChoudhury A, Sarkar S, Ghosh A, Santra A, et al. Unique hepatitis B virus subgenotype in a primitive tribal community in eastern India. *J Clin Microbiol.* 2010;48(11):4063-71.
63. Zehender G, Shkjezi R, Ebranati E, Gabanelli E, Abazaj Z, Tanzi E, et al. Reconstruction of the epidemic history of hepatitis B virus genotype D in Albania. *Infect Genet Evol.* 2012;12(2):291-8.
64. Andernach IE, Hunewald OE, Muller CP. Bayesian inference of the evolution of HBV/E. *PLoS One.* 2013;8(11):e81690.
65. Kramvis A, Paraskevis D. Subgenotype A1 of HBV--tracing human migrations in and out of Africa. *Antivir Ther.* 2013;18(3 Pt B):513-21.
66. Smuts H, Sonderup M, Gogela N, Spearman C. Hepatitis B Virus Genotype G: First Report of Complete Genomic Analysis from the African Continent. *J Emerg Dis Virol*2017.
67. Lindh M. HBV genotype G-an odd genotype of unknown origin. *J Clin Virol.* 34. Netherlands2005. p. 315-6.
68. Sakamoto T, Tanaka Y, Watanabe T, Iijima S, Kani S, Sugiyama M, et al. Mechanism of the dependence of hepatitis B

- virus genotype G on co-infection with other genotypes for viral replication. *J Viral Hepat.* 2013;20(4):e27-36.
69. Panduro A, Maldonado-Gonzalez M, Fierro NA, Roman S. Distribution of HBV genotypes F and H in Mexico and Central America. *Antivir Ther.* 2013;18(3 Pt B):475-84.
 70. Huy TT, Sall AA, Reynes JM, Abe K. Complete genomic sequence and phylogenetic relatedness of hepatitis B virus isolates in Cambodia. *Virus Genes.* 2008;36(2):299-305.
 71. Olinger CM, Jutavijittum P, Hubschen JM, Yousukh A, Samounry B, Thammavong T, et al. Possible new hepatitis B virus genotype, southeast Asia. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(11):1777-80.
 72. Yu H, Yuan Q, Ge SX, Wang HY, Zhang YL, Chen QR, et al. Molecular and phylogenetic analyses suggest an additional hepatitis B virus genotype "I". *PLoS One.* 2010;5(2):e9297.
 73. Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, Sugauchi F, Mano S, Maeshiro T, et al. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. *J Virol.* 2009;83(20):10538-47.
 74. Valsamakis A. Molecular testing in the diagnosis and management of chronic hepatitis B. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(3):426-39, table of contents.
 75. Bartholomeusz A, Schaefer S. Hepatitis B virus genotypes: comparison of genotyping methods. *Rev Med Virol.* 2004;14(1):3-16.
 76. Guirgis BS, Abbas RO, Azzazy HM. Hepatitis B virus genotyping: current methods and clinical implications. *Int J Infect Dis.* 2010;14(11):e941-53.
 77. Abbott. www.abbott.com
 78. Usuda S, Okamoto H, Iwanari H, Baba K, Tsuda F, Miyakawa Y, et al. Serological detection of hepatitis B virus genotypes by

- ELISA with monoclonal antibodies to type-specific epitopes in the preS2-region product. *J Virol Methods*. 1999;80(1):97-112.
79. Mizokami M, Nakano T, Orito E, Tanaka Y, Sakugawa H, Mukaide M, et al. Hepatitis B virus genotype assignment using restriction fragment length polymorphism patterns. *FEBS Lett*. 1999;450(1-2):66-71.
 80. 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;39(1):362-4.
 81. Kirschberg O, Schuttler C, Repp R, Schaefer S. A multiplex-PCR to identify hepatitis B virus--enotypes A-F. *J Clin Virol*. 2004;29(1):39-43.
 82. Chen J, Yin J, Tan X, Zhang H, Chen B, Chang W, et al. Improved multiplex-PCR to identify hepatitis B virus genotypes A-F and subgenotypes B1, B2, C1 and C2. *J Clin Virol*. 2007;38(3):238-43.
 83. Liu WC, Lindh M, Buti M, Phiet PH, Mizokami M, Li HH, et al. Genotyping of hepatitis B virus--genotypes a to g by multiplex polymerase chain reaction. *Intervirology*. 2008;51(4):247-52.
 84. Ganova-Raeva L, Ramachandran S, Honisch C, Forbi JC, Zhai X, Khudyakov Y. Robust hepatitis B virus genotyping by mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2010;48(11):4161-8.
 85. Laperche S, Girault A, Beaulieu MJ, Bouchardeau F, Courouce AM. Determination of hepatitis B virus subtypes by an enzyme immunoassay method using monoclonal antibodies to type-specific epitopes of HBsAg. *J Viral Hepat*. 2001;8(6):447-53.
 86. Hatzakis A, Van Damme P, Alcorn K, Gore C, Benazzouz M, Berkane S, et al. The state of hepatitis B and C in the Mediterranean and Balkan countries: report from a summit conference. *J Viral Hepat*. 2013;20 Suppl 2:1-20.
 87. WHO. www.who.int

88. Maynard JE. Hepatitis B: global importance and need for control. *Vaccine*. 1990;8 Suppl:S18-20; discussion S1-3.
89. Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat*. 2004;11(2):97-107.
90. Mast EE, Alter MJ, Margolis HS. Strategies to prevent and control hepatitis B and C virus infections: a global perspective. *Vaccine*. 1999;17(13-14):1730-3.
91. Amini-Bavil-Olyae S, Sarrami-Forooshani R, Mahboudi F, Sabahi F, Adeli A, Noorinayer B, et al. Genotype characterization and phylogenetic analysis of hepatitis B virus isolates from Iranian patients. *J Med Virol*. 2005;75(2):227-34.
92. 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(2):489-503.
93. Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF, et al. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol*. 2000;81(Pt 1):67-74.
94. Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnius LO. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol*. 2002;83(Pt 8):2059-73.
95. Kramvis A, Kew M, Francois G. Hepatitis B virus genotypes. *Vaccine*. 2005;23(19):2409-23.
96. Rodriguez-Frias F, Buti M, Jardi R, Cotrina M, Viladomiu L, Esteban R, et al. Hepatitis B virus infection: precore mutants and its relation to viral genotypes and core mutations. *Hepatology*. 1995;22(6):1641-7.
97. Grandjacques C, Pradat P, Stuyver L, Chevallier M, Chevallier P, Pichoud C, et al. Rapid detection of genotypes and mutations in the pre-core promoter and the pre-core region of hepatitis B

- virus genome: correlation with viral persistence and disease severity. *J Hepatol.* 2000;33(3):430-9.
98. Sanchez-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(6):1848-56.
 99. Abe K, Hayakawa E, Sminov AV, Rossina AL, Ding X, Huy TT, et al. Molecular epidemiology of hepatitis B, C, D and E viruses among children in Moscow, Russia. *J Clin Virol.* 2004;30(1):57-61.
 100. Krekulova L, Rehak V, Killoran P, Zavoral M, Riley LW. [Distribution of HBV genotypes in the Czech population--pilot study]. *Vnitr Lek.* 2004;50(2):106-11.
 101. Tallo T, Norder H, Tefanova V, Krispin T, Priimagi L, Mukomolov S, et al. Hepatitis B virus genotype D strains from Estonia share sequence similarity with strains from Siberia and may specify ayw4. *J Med Virol.* 2004;74(2):221-7.
 102. Fylaktou A, Papaventsis D, Daoudaki M, Moskophidis M, Reiberger T, Malisiovas N. Molecular epidemiology of chronic hepatitis B virus infection in Greece. *J Med Virol.* 2011;83(2):245-52.
 103. Lindh M, Andersson AS, Gusdal A. Genotypes, nt 1858 variants, and geographic origin of hepatitis B virus--large-scale analysis using a new genotyping method. *J Infect Dis.* 1997;175(6):1285-93.
 104. van Steenberg JE, Niesters HG, Op de Coul EL, van Doornum GJ, Osterhaus AD, Leentvaar-Kuijpers A, et al. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Amsterdam 1992-1997. *J Med Virol.* 2002;66(2):159-65.
 105. Bissinger AL, Fehrle C, Werner CR, Lauer UM, Malek NP, Berg CP. Epidemiology and Genotyping of Patients with Chronic Hepatitis B: Genotype Shifting Observed in Patients from Central Europe. *Pol J Microbiol.* 2015;64(1):15-21.

106. Vratnica Z, Zehender G, Ebranati E, Sorrentino C, Lai A, Vujosevic D, et al. Hepatitis B virus genotype and subgenotype prevalence and distribution in Montenegro. *J Med Virol.* 2015;87(5):807-13.
107. CDC. www.cdc.gov: Centers for Disease Control and Prevention
108. Rodriguez-Frias F, Jardi R, Buti M, Schaper M, Hermsilla E, Valdes A, et al. Hepatitis B virus genotypes and G1896A precore mutation in 486 Spanish patients with acute and chronic HBV infection. *J Viral Hepat.* 2006;13(5):343-50.
109. Costa JJ, Rodriguez J, Alba J, Rivadulla I, Perez-Del-Molino ML, Aguilera A. [Prevalence and distribution of hepatitis B virus genotype D in Galicia (northwest of Spain): influence of age, sex and origin]. *Rev Esp Quimioter.* 2016;29(5):269-72.
110. Di Lello FA, Macias J, Cifuentes CC, Vargas J, Palomares JC, Pineda JA. Low prevalence of occult HBV infection among HIV-infected patients in Southern Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30(6):312-4.
111. Echevarria JM, Leon P. Hepatitis B virus genotypes identified by a Line Probe Assay (LiPA) among chronic carriers from Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004;22(8):452-4.
112. Pena-Lopez MJ, Suarez-Bordon P, Garcia-Bardeci D, Rodriguez-San Roman JL, Perez-Gonzalez MC, Lafarga-Capuz B. [Hepatitis B virus genotypes in chronic carriers on the island of Gran Canaria. Clinical and epidemiological characteristics]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2005;23(7):415-8.
113. Toro C, Jimenez V, Rodriguez C, Del Romero J, Rodes B, Holguin A, et al. Molecular and epidemiological characteristics of blood-borne virus infections among recent immigrants in Spain. *J Med Virol.* 2006;78(12):1599-608.
114. Basaras M, Arrese E, Blanco S, Sota M, de las Heras B, Cisterna R. Characterization of hepatitis B virus genotypes in chronically infected patients. *Rev Esp Quimioter.* 2007;20(4):442-5.

115. Rivas P, Herrero MD, Poveda E, Madejon A, Trevino A, Gutierrez M, et al. Hepatitis B, C, and D and HIV infections among immigrants from Equatorial Guinea living in Spain. *Am J Trop Med Hyg.* 2013;88(4):789-94.
116. Trastoy R, et al. Distribution of hepatitis B virus genotypes in Spain during the period 1999-2016 (Preliminary data of GEHEP 010 Study) *HEPATOLOGY*2017. p. 1013A.
117. Alba J, Rodríguez J, Costa JJ, Rivadulla I, García X, Trastoy R, et al. Evolución del genotipo de la hepatitis B en el Área Sanitaria del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela. XIX Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)2015. p. 359-60.
118. Stevens CE, Beasley RP, Tsui J, Lee WC. Vertical transmission of hepatitis B antigen in Taiwan. *N Engl J Med.* 1975;292(15):771-4.
119. Stevens CE, Toy PT, Tong MJ, Taylor PE, Vyas GN, Nair PV, et al. Perinatal hepatitis B virus transmission in the United States. Prevention by passive-active immunization. *Jama.* 1985;253(12):1740-5.
120. Malamitsi-Puchner A, Papacharitonos S, Sotos D, Tzala L, Psychogiou M, Hatzakis A, et al. Prevalence study of different hepatitis markers among pregnant Albanian refugees in Greece. *Eur J Epidemiol.* 1996;12(3):297-301.
121. Kramvis A, Kew MC. Epidemiology of hepatitis B virus in Africa, its genotypes and clinical associations of genotypes. *Hepato Res.* 2007;37(s1):S9-s19.
122. Dunk AA, Spiliadis H, Sherlock S, Fowler MJ, Monjardino JP, Scheuer PJ, et al. Hepatocellular carcinoma and the hepatitis B virus: a study of British patients. *Q J Med.* 1987;62(238):109-16.
123. Sherlock S. The natural history of hepatitis B. *Postgrad Med J.* 1987;63 Suppl 2:7-11.

124. Bodsworth N, Donovan B, Nightingale BN. The effect of concurrent human immunodeficiency virus infection on chronic hepatitis B: a study of 150 homosexual men. *J Infect Dis.* 1989;160(4):577-82.
125. Mahoney FJ, Stewart K, Hu H, Coleman P, Alter MJ. Progress toward the elimination of hepatitis B virus transmission among health care workers in the United States. *Arch Intern Med.* 1997;157(22):2601-5.
126. Wachs ME, Amend WJ, Ascher NL, Bretan PN, Emond J, Lake JR, et al. The risk of transmission of hepatitis B from HBsAg(-), HBcAb(+), HBIGM(-) organ donors. *Transplantation.* 1995;59(2):230-4.
127. Hadziyannis SJ. Natural history of chronic hepatitis B in Euro-Mediterranean and African countries. *J Hepatol.* 2011;55(1):183-91.
128. Liaw YF. Natural history of chronic hepatitis B virus infection and long-term outcome under treatment. *Liver Int.* 2009;29 Suppl 1:100-7.
129. Cote PJ, Korba BE, Miller RH, Jacob JR, Baldwin BH, Hornbuckle WE, et al. Effects of age and viral determinants on chronicity as an outcome of experimental woodchuck hepatitis virus infection. *Hepatology.* 2000;31(1):190-200.
130. Hadziyannis SJ, Vassilopoulos D. Immunopathogenesis of hepatitis B e antigen negative chronic hepatitis B infection. *Antiviral Res.* 2001;52(2):91-8.
131. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 2017.
132. Webster GJ, Reignat S, Brown D, Ogg GS, Jones L, Seneviratne SL, et al. Longitudinal analysis of CD8+ T cells specific for structural and nonstructural hepatitis B virus proteins in patients with chronic hepatitis B: implications for immunotherapy. *J Virol.* 2004;78(11):5707-19.

133. Lok AS, Lai CL, Wu PC, Leung EK, Lam TS. Spontaneous hepatitis B e antigen to antibody seroconversion and reversion in Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology*. 1987;92(6):1839-43.
134. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology*. 2007;45(2):507-39.
135. Maini MK, Boni C, Lee CK, Larrubia JR, Reignat S, Ogg GS, et al. The role of virus-specific CD8(+) cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection. *J Exp Med*. 2000;191(8):1269-80.
136. Lim SG, Cheng Y, Guindon S, Seet BL, Lee LY, Hu P, et al. Viral quasi-species evolution during hepatitis Be antigen seroconversion. *Gastroenterology*. 2007;133(3):951-8.
137. Volz T, Lutgehetmann M, Wachtler P, Jacob A, Quaas A, Murray JM, et al. Impaired intrahepatic hepatitis B virus productivity contributes to low viremia in most HBeAg-negative patients. *Gastroenterology*. 2007;133(3):843-52.
138. EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol*. 2012;57(1):167-85.
139. Thio CL, Seaberg EC, Skolasky R, Jr., Phair J, Visscher B, Munoz A, et al. HIV-1, hepatitis B virus, and risk of liver-related mortality in the Multicenter Cohort Study (MACS). *Lancet*. 2002;360(9349):1921-6.
140. Moura IF, Lopes EP, Alvarado-Mora MV, Pinho JR, Carrilho FJ. Phylogenetic analysis and subgenotypic distribution of the hepatitis B virus in Recife, Brazil. *Infect Genet Evol*. 2013;14:195-9.
141. Kao JH. Molecular epidemiology of hepatitis B virus. *Korean J Intern Med*. 2011;26(3):255-61.
142. Biswas A, Panigrahi R, Pal M, Chakraborty S, Bhattacharya P, Chakrabarti S, et al. Shift in the hepatitis B virus genotype distribution in the last decade among the HBV carriers from

- eastern India: possible effects on the disease status and HBV epidemiology. *J Med Virol.* 2013;85(8):1340-7.
143. Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Leu ML, Stevens CE, Szmuness W, et al. Incidence of hepatitis B virus infections in preschool children in Taiwan. *J Infect Dis.* 1982;146(2):198-204.
 144. Beasley RP. Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer.* 1988;61(10):1942-56.
 145. Chen G, Lin W, Shen F, Iloeje UH, London WT, Evans AA. Past HBV viral load as predictor of mortality and morbidity from HCC and chronic liver disease in a prospective study. *Am J Gastroenterol.* 2006;101(8):1797-803.
 146. Iloeje UH, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Chen CJ. Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load. *Gastroenterology.* 2006;130(3):678-86.
 147. Yim HJ, Lok AS. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: what we knew in 1981 and what we know in 2005. *Hepatology.* 2006;43(2 Suppl 1):S173-81.
 148. Sumi H, Yokosuka O, Seki N, Arai M, Imazeki F, Kurihara T, et al. Influence of hepatitis B virus genotypes on the progression of chronic type B liver disease. *Hepatology.* 2003;37(1):19-26.
 149. Chu CJ, Hussain M, Lok AS. Hepatitis B virus genotype B is associated with earlier HBeAg seroconversion compared with hepatitis B virus genotype C. *Gastroenterology.* 2002;122(7):1756-62.
 150. Lin CL, Liao LY, Wang CS, Chen PJ, Lai MY, Chen DS, et al. Basal core-promoter mutant of hepatitis B virus and progression of liver disease in hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *Liver Int.* 2005;25(3):564-70.
 151. Chu CJ, Keeffe EB, Han SH, Perrillo RP, Min AD, Soldevilla-Pico C, et al. Prevalence of HBV precore/core promoter variants in the United States. *Hepatology.* 2003;38(3):619-28.

152. Fattovich G, McIntyre G, Thursz M, Colman K, Giuliano G, Alberti A, et al. Hepatitis B virus precore/core variation and interferon therapy. *Hepatology*. 1995;22(5):1355-62.
153. Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet*. 1981;2(8256):1129-33.
154. Chan HL, Hui AY, Wong ML, Tse AM, Hung LC, Wong VW, et al. Genotype C hepatitis B virus infection is associated with an increased risk of hepatocellular carcinoma. *Gut*. 2004;53(10):1494-8.
155. Fattovich G, Bortolotti F, Donato F. Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors. *J Hepatol*. 2008;48(2):335-52.
156. Han SH. Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis B. *Clin Liver Dis*. 2004;8(2):403-18.
157. Lempp FA, Ni Y, Urban S. Hepatitis delta virus: insights into a peculiar pathogen and novel treatment options. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016;13(10):580-9.
158. Rizzetto M, Canese MG, Gerin JL, London WT, Sly DL, Purcell RH. Transmission of the hepatitis B virus-associated delta antigen to chimpanzees. *J Infect Dis*. 1980;141(5):590-602.
159. Rizzetto M, Hoyer B, Canese MG, Shih JW, Purcell RH, Gerin JL. delta Agent: association of delta antigen with hepatitis B surface antigen and RNA in serum of delta-infected chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980;77(10):6124-8.
160. Cunha C, Tavanez JP, Gudima S. Hepatitis delta virus: A fascinating and neglected pathogen. *World J Virol*. 2015;4(4):313-22.
161. Botelho-Souza LF, Vasconcelos MPA, Dos Santos AO, Salcedo JMV, Vieira DS. Hepatitis delta: virological and clinical aspects. *Virol J*. 2017;14(1):177.

162. Rizzetto M. The adventure of delta. *Liver Int.* 2016;36 Suppl 1:135-40.
163. Alvarado-Mora MV, Locarnini S, Rizzetto M, Pinho JR. An update on HDV: virology, pathogenesis and treatment. *Antivir Ther.* 2013;18(3 Pt B):541-8.
164. Rizzetto M, Ciancio A. Epidemiology of hepatitis D. *Semin Liver Dis.* 2012;32(3):211-9.
165. Jelen MM, Hosnjak L, Stunf S, Zagozen A, Fujs Komlos K, Markocic P, et al. Hepatitis D virus infection in Slovenian patients with chronic hepatitis B virus infection: a national prevalence study and literature review. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat.* 2016;25(3):49-53.
166. Aguilera A, Trastoy R, Rodriguez-Calvino J, Manso T, de Mendoza C, Soriano V. Prevalence and incidence of hepatitis delta in patients with chronic hepatitis B in Spain. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2018.
167. Aguilera A, Trastoy R, Barreiro P, Costa JJ, de Mendoza C, Pena JM, et al. Decline and changing profile of hepatitis delta among injection drug users in Spain. *Antivir Ther.* 2018;23(1):87-90.
168. Candotti D, Lin CK, Belkhiri D, Sakuldamrongpanich T, Biswas S, Lin S, et al. Occult hepatitis B infection in blood donors from South East Asia: molecular characterisation and potential mechanisms of occurrence. *Gut.* 2012;61(12):1744-53.
169. Raimondo G, Pollicino T, Cacciola I, Squadrito G. Occult hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 2007;46(1):160-70.
170. Yeo W, Chan HL. Hepatitis B virus reactivation associated with anti-neoplastic therapy. *J Gastroenterol Hepatol.* 2013;28(1):31-7.
171. Chan HL, Thompson A, Martinot-Peignoux M, Piratvisuth T, Cornberg M, Brunetto MR, et al. Hepatitis B surface antigen quantification: why and how to use it in 2011 - a core group report. *J Hepatol.* 2011;55(5):1121-31.

172. Martinot-Peignoux M, Lapalus M, Asselah T, Marcellin P. The role of HBsAg quantification for monitoring natural history and treatment outcome. *Liver Int.* 2013;33 Suppl 1:125-32.
173. Hoofnagle JH. Reactivation of hepatitis B. *Hepatology.* 2009;49(5 Suppl):S156-65.
174. Perrillo R. Invited Commentary: Screening for hepatitis B in the immigrant population and individuals who are in need of immunosuppressive drug therapy. *Proc (Bayl Univ Med Cent).* 2015;28(4):443-4.
175. Reddy KR, Beavers KL, Hammond SP, Lim JK, Falck-Ytter YT. American Gastroenterological Association Institute guideline on the prevention and treatment of hepatitis B virus reactivation during immunosuppressive drug therapy. *Gastroenterology.* 2015;148(1):215-9; quiz e16-7.
176. Seetharam A, Perrillo R, Gish R. Immunosuppression in Patients with Chronic Hepatitis B. *Curr Hepatol Rep.* 13. United States 2014. p. 235-44.
177. Tenney DJ, Rose RE, Baldick CJ, Pokornowski KA, Eggers BJ, Fang J, et al. Long-term monitoring shows hepatitis B virus resistance to entecavir in nucleoside-naïve patients is rare through 5 years of therapy. *Hepatology.* 2009;49(5):1503-14.
178. Buti M, Garcia-Samaniego J, Prieto M, Rodriguez M, Sanchez-Tapias JM, Suarez E, et al. [Consensus document of the Spanish Association for the Study of the Liver on the treatment of hepatitis B infection (2012)]. *Gastroenterol Hepatol.* 2012;35(7):512-28.
179. Tanwar S, Dusheiko G. Is there any value to hepatitis B virus genotype analysis? *Curr Gastroenterol Rep.* 2012;14(1):37-46.
180. Lampe E, Mello FCA, do Espirito-Santo MP, Oliveira CMC, Bertolini DA, Goncalves NSL, et al. Nationwide overview of the distribution of hepatitis B virus genotypes in Brazil: a 1000-sample multicentre study. *J Gen Virol.* 2017;98(6):1389-98.

181. Liu CJ, Kao JH. Global perspective on the natural history of chronic hepatitis B: role of hepatitis B virus genotypes A to J. *Semin Liver Dis.* 2013;33(2):97-102.
182. Schaefer S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J Gastroenterol.* 2007;13(1):14-21.
183. Lin CL, Kao JH. The clinical implications of hepatitis B virus genotype: Recent advances. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011;26 Suppl 1:123-30.
184. Ito K, Yotsuyanagi H, Yatsuhashi H, Karino Y, Takikawa Y, Saito T, et al. Risk factors for long-term persistence of serum hepatitis B surface antigen following acute hepatitis B virus infection in Japanese adults. *Hepatology.* 2014;59(1):89-97.
185. Suzuki Y, Kobayashi M, Ikeda K, Suzuki F, Arase Y, Akuta N, et al. Persistence of acute infection with hepatitis B virus genotype A and treatment in Japan. *J Med Virol.* 2005;76(1):33-9.
186. Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Tsubota A, Suzuki Y, Saitoh S, et al. Clinical characteristics of patients infected with hepatitis B virus genotypes A, B, and C. *J Gastroenterol.* 2002;37(1):35-9.
187. Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Tsubota A, Suzuki Y, Hosaka T, et al. Clinical features of hepatitis B virus genotype A in Japanese patients. *J Gastroenterol.* 2003;38(7):656-62.
188. Mayerat C, Mantegani A, Frei PC. Does hepatitis B virus (HBV) genotype influence the clinical outcome of HBV infection? *J Viral Hepat.* 1999;6(4):299-304.
189. Sarkar N, Pal A, Das D, Saha D, Biswas A, Bandopadhyay B, et al. Virological Characteristics of Acute Hepatitis B in Eastern India: Critical Differences with Chronic Infection. *PLoS One.* 2015;10(11):e0141741.
190. Kobayashi M, Suzuki F, Arase Y, Akuta N, Suzuki Y, Hosaka T, et al. Infection with hepatitis B virus genotype A in Tokyo, Japan during 1976 through 2001. *J Gastroenterol.* 2004;39(9):844-50.

191. Wai CT, Fontana RJ, Polson J, Hussain M, Shakil AO, Han SH, et al. Clinical outcome and virological characteristics of hepatitis B-related acute liver failure in the United States. *J Viral Hepat.* 2005;12(2):192-8.
192. 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(1):5-11.
193. Liaw YF, Lau GK, Kao JH, Gane E. Hepatitis B e antigen seroconversion: a critical event in chronic hepatitis B virus infection. *Dig Dis Sci.* 2010;55(10):2727-34.
194. Yousif M, Mudawi H, Bakhiet S, Glebe D, Kramvis A. Molecular characterization of hepatitis B virus in liver disease patients and asymptomatic carriers of the virus in Sudan. *BMC Infect Dis.* 2013;13:328.
195. Tanaka Y, Hasegawa I, Kato T, Orito E, Hirashima N, Acharya SK, et al. A case-control study for differences among hepatitis B virus infections of genotypes A (subtypes Aa and Ae) and D. *Hepatology.* 2004;40(3):747-55.
196. Tseng TC, Liu CJ, Chen CL, Yang WT, Yang HC, Su TH, et al. Higher lifetime chance of spontaneous surface antigen loss in hepatitis B carriers with genotype C infection. *Aliment Pharmacol Ther.* 2015;41(10):949-60.
197. Yuen MF, Wong DK, Sablon E, Tse E, Ng IO, Yuan HJ, et al. HBsAg seroclearance in chronic hepatitis B in the Chinese: virological, histological, and clinical aspects. *Hepatology.* 2004;39(6):1694-701.
198. Yu MW, Yeh SH, Chen PJ, Liaw YF, Lin CL, Liu CJ, et al. Hepatitis B virus genotype and DNA level and hepatocellular carcinoma: a prospective study in men. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97(4):265-72.
199. Oommen PT, Wirth S, Wintermeyer P, Gerner P. Relationship between viral load and genotypes of hepatitis B virus in children

- with chronic hepatitis B. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2006;43(3):342-7.
200. Lindh M, Horal P, Dhillon AP, Norkrans G. Hepatitis B virus DNA levels, precore mutations, genotypes and histological activity in chronic hepatitis B. *J Viral Hepat.* 2000;7(4):258-67.
201. Ni YH, Chang MH, Wang KJ, Hsu HY, Chen HL, Kao JH, et al. Clinical relevance of hepatitis B virus genotype in children with chronic infection and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2004;127(6):1733-8.
202. Kmet Lunacek N, Poljak M, Maticic M. Distribution of hepatitis B virus genotypes in Europe and clinical implications: a review. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat.* 2018;27(3):141-6.
203. McMahan BJ. The influence of hepatitis B virus genotype and subgenotype on the natural history of chronic hepatitis B. *Hepatol Int.* 2009;3(2):334-42.
204. Orito E, Mizokami M, Sakugawa H, Michitaka K, Ishikawa K, Ichida T, et al. A case-control study for clinical and molecular biological differences between hepatitis B viruses of genotypes B and C. Japan HBV Genotype Research Group. *Hepatology.* 2001;33(1):218-23.
205. Wong GL, Chan HL, Yiu KK, Lai JW, Chan VK, Cheung KK, et al. Meta-analysis: The association of hepatitis B virus genotypes and hepatocellular carcinoma. *Aliment Pharmacol Ther.* 2013;37(5):517-26.
206. Yang HI, Yeh SH, Chen PJ, Iloeje UH, Jen CL, Su J, et al. Associations between hepatitis B virus genotype and mutants and the risk of hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100(16):1134-43.
207. Chu CM, Liaw YF. Genotype C hepatitis B virus infection is associated with a higher risk of reactivation of hepatitis B and progression to cirrhosis than genotype B: a longitudinal study of hepatitis B e antigen-positive patients with normal

- aminotransferase levels at baseline. *J Hepatol.* 2005;43(3):411-7.
208. Thakur V, Guptan RC, Kazim SN, Malhotra V, Sarin SK. Profile, spectrum and significance of HBV genotypes in chronic liver disease patients in the Indian subcontinent. *J Gastroenterol Hepatol.* 2002;17(2):165-70.
209. Garfein RS, Bower WA, Loney CM, Hutin YJ, Xia GL, Jawanda J, et al. Factors associated with fulminant liver failure during an outbreak among injection drug users with acute hepatitis B. *Hepatology.* 2004;40(4):865-73.
210. Liaw YF, Brunetto MR, Hadziyannis S. The natural history of chronic HBV infection and geographical differences. *Antivir Ther.* 2010;15 Suppl 3:25-33.
211. Kew MC, Kramvis A, Yu MC, Arakawa K, Hodgkinson J. Increased hepatocarcinogenic potential of hepatitis B virus genotype A in Bantu-speaking sub-saharan Africans. *J Med Virol.* 2005;75(4):513-21.
212. Pezzano SC, Torres C, Fainboim HA, Bouzas MB, Schroder T, Giuliano SF, et al. Hepatitis B virus in Buenos Aires, Argentina: genotypes, virological characteristics and clinical outcomes. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(2):223-31.
213. Boglione L, D'Avolio A, Cariti G, Milia MG, Simiele M, De Nicolo A, et al. Sequential therapy with entecavir and PEG-INF in patients affected by chronic hepatitis B and high levels of HBV-DNA with non-D genotypes. *J Viral Hepat.* 2013;20(4):e11-9.
214. Marciano S, Galdame OA, Gadano AC. HBV genotype F: natural history and treatment. *Antivir Ther.* 2013;18(3 Pt B):485-8.
215. Erhardt A, Gobel T, Ludwig A, Lau GK, Marcellin P, van Bommel F, et al. Response to antiviral treatment in patients infected with hepatitis B virus genotypes E-H. *J Med Virol.* 2009;81(10):1716-20.

216. Wai CT, Chu CJ, Hussain M, Lok AS. HBV genotype B is associated with better response to interferon therapy in HBeAg(+) chronic hepatitis than genotype C. *Hepatology*. 2002;36(6):1425-30.
217. Erhardt A, Blondin D, Hauck K, Sagir A, Kohnle T, Heintges T, et al. Response to interferon alfa is hepatitis B virus genotype dependent: genotype A is more sensitive to interferon than genotype D. *Gut*. 2005;54(7):1009-13.
218. Kao JH, Wu NH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy. *J Hepatol*. 2000;33(6):998-1002.
219. Marcellin P, Bonino F, Lau GK, Farci P, Yurdaydin C, Piratvisuth T, et al. Sustained response of hepatitis B e antigen-negative patients 3 years after treatment with peginterferon alpha-2a. *Gastroenterology*. 2009;136(7):2169-79.e1-4.
220. Fan HB, Guo YB, Zhu YF, Chen AS, Zhou MX, Li Z, et al. Hepatitis B Virus Genotype B and High Expression of Interferon Alpha Receptor beta Subunit are Associated With Better Response to Pegylated Interferon Alpha 2a in Chinese Patients With Chronic Hepatitis B Infection. *Hepat Mon*. 2012;12(5):333-8.
221. Lampertico P, Vigano M, Cheroni C, Facchetti F, Invernizzi F, Valveri V, et al. IL28B polymorphisms predict interferon-related hepatitis B surface antigen seroclearance in genotype D hepatitis B e antigen-negative patients with chronic hepatitis B. *Hepatology*. 2013;57(3):890-6.
222. Kao JH, Liu CJ, Chen DS. Hepatitis B viral genotypes and lamivudine resistance. *J Hepatol*. 36. Netherlands2002. p. 303-4.
223. Chan HL, Wong ML, Hui AY, Chim AM, Tse AM, Hung LC, et al. Hepatitis B virus genotype has no impact on hepatitis B e antigen seroconversion after lamivudine treatment. *World J Gastroenterol*. 2003;9(12):2695-7.

224. Westland C, Delaney Wt, Yang H, Chen SS, Marcellin P, Hadziyannis S, et al. Hepatitis B virus genotypes and virologic response in 694 patients in phase III studies of adefovir dipivoxil. *Gastroenterology*. 2003;125(1):107-16.
225. Yuen MF, Wong DK, Sablon E, Yuan HJ, Sum SM, Hui CK, et al. Hepatitis B virus genotypes B and C do not affect the antiviral response to lamivudine. *Antivir Ther*. 2003;8(6):531-4.
226. Hou J, Yin YK, Xu D, Tan D, Niu J, Zhou X, et al. Telbivudine versus lamivudine in Chinese patients with chronic hepatitis B: Results at 1 year of a randomized, double-blind trial. *Hepatology*. 2008;47(2):447-54.
227. Chen XL, Li M, Zhang XL. HBV genotype B/C and response to lamivudine therapy: a systematic review. *Biomed Res Int*. 2013;2013:672614.
228. Wiegand J, Hasenclever D, Tillmann HL. Should treatment of hepatitis B depend on hepatitis B virus genotypes? A hypothesis generated from an explorative analysis of published evidence. *Antivir Ther*. 2008;13(2):211-20.
229. Buster EH, Hansen BE, Lau GK, Piratvisuth T, Zeuzem S, Steyerberg EW, et al. Factors that predict response of patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B to peginterferon-alfa. *Gastroenterology*. 2009;137(6):2002-9.
230. Damerow H, Yuen L, Wiegand J, Walker C, Bock CT, Locarnini S, et al. Mutation pattern of lamivudine resistance in relation to hepatitis B genotypes: hepatitis B genotypes differ in their lamivudine resistance associated mutation pattern. *J Med Virol*. 2010;82(11):1850-8.
231. Brunetto MR, Marcellin P, Cherubini B, Yurdaydin C, Farci P, Hadziyannis SJ, et al. Response to peginterferon alfa-2a (40KD) in HBeAg-negative CHB: on-treatment kinetics of HBsAg serum levels vary by HBV genotype. *J Hepatol*. 2013;59(6):1153-9.

232. Lin CL, Kao JH. Clinical implications of hepatitis B virus variants. *J Formos Med Assoc.* 2010;109(5):321-5.
233. Lin CL, Kao JH. Natural history of acute and chronic hepatitis B: The role of HBV genotypes and mutants. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2017;31(3):249-55.
234. Kao JH, Chen DS. HBV genotypes and outcome of HBV infection. *Hepatology.* 2005;41(1):216; author reply
235. Watanabe K, Takahashi T, Takahashi S, Okoshi S, Ichida T, Aoyagi Y. Comparative study of genotype B and C hepatitis B virus-induced chronic hepatitis in relation to the basic core promoter and precore mutations. *J Gastroenterol Hepatol.* 2005;20(3):441-9.
236. Hussain M, Chu CJ, Sablon E, Lok AS. Rapid and sensitive assays for determination of hepatitis B virus (HBV) genotypes and detection of HBV precore and core promoter variants. *J Clin Microbiol.* 2003;41(8):3699-705.
237. Liu S, Zhang H, Gu C, Yin J, He Y, Xie J, et al. Associations between hepatitis B virus mutations and the risk of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(15):1066-82.
238. Chang MH. Breakthrough HBV infection in vaccinated children in Taiwan: surveillance for HBV mutants. *Antivir Ther.* 2010;15(3 Pt B):463-9.
239. DECRETO 168/2010, de 7 de octubre, por el que se regula la estructura organizativa de gestión integrada del Servicio Gallego de Salud.
240. Instituto Galego de Estadística <https://www.ige.eu/web/index.jsp?paxina=001&idioma=gl> [
241. Moreira VF, E. G. Elastografía hepática (Fibroscan®) en hepatología. *Revista Española de Enfermedades Digestivas* 2013. p. 235.

242. Mallory MA, Page SR, Hillyard DR. Development and validation of a hepatitis B virus DNA sequencing assay for assessment of antiviral resistance, viral genotype and surface antigen mutation status. *J Virol Methods*. 2011;177(1):31-7.
243. Schildgen O, Sirma H, Funk A, Olotu C, Wend UC, Hartmann H, et al. Variant of hepatitis B virus with primary resistance to adefovir. *N Engl J Med*. 2006;354(17):1807-12.
244. Price MN, Dehal PS, Arkin AP. FastTree 2--approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One*. 2010;5(3):e9490.
245. Pourkarim MR, Amini-Bavil-Olyae S, Kurbanov F, Van Ranst M, Tacke F. Molecular identification of hepatitis B virus genotypes/subgenotypes: revised classification hurdles and updated resolutions. *World J Gastroenterol*. 2014;20(23):7152-68.
246. Rahman MA, Hakim F, Ahmed M, Ahsan CR, Nessa J, Yasmin M. Prevalence of genotypes and subtypes of hepatitis B viruses in Bangladeshi population. *Springerplus*. 2016;5:278.
247. Lacombe K, Massari V, Girard PM, Serfaty L, Gozlan J, Pialoux G, et al. Major role of hepatitis B genotypes in liver fibrosis during coinfection with HIV. *Aids*. 2006;20(3):419-27.
248. Ganne-Carrie N, Williams V, Kaddouri H, Trinchet JC, Dziri-Mendil S, Alloui C, et al. Significance of hepatitis B virus genotypes A to E in a cohort of patients with chronic hepatitis B in the Seine Saint Denis District of Paris (France). *J Med Virol*. 2006;78(3):335-40.
249. Deterding K, Constantinescu I, Nedelcu FD, Gervain J, Nemecek V, Srtunecky O, et al. Prevalence of HBV genotypes in Central and Eastern Europe. *J Med Virol*. 2008;80(10):1707-11.
251. Moussa S, Brah S, Parola P, Gerolami R, Gannerre M, Boubli L, et al. Epidemiological, clinical, virological features of hepatitis

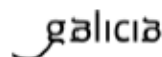
- B newly diagnosed in 2011 in Marseille University hospitals, southeastern France. *J Med Virol.* 2016;88(5):828-36.
252. Hirzel C, Wandeler G, Owczarek M, Gorgievski-Hrisoho M, Dufour JF, Semmo N, et al. Molecular epidemiology of hepatitis B virus infection in Switzerland: a retrospective cohort study. *BMC Infect Dis.* 2015;15:483.
253. Coppola N, Alessio L, Pisaturo M, Macera M, Sagnelli C, Zampino R, et al. Hepatitis B virus infection in immigrant populations. *World J Hepatol.* 2015;7(30):2955-61.
254. Bottecchia M, Madejon A, Puente S, Garcia-Samaniego J, Rivas P, Herrero D, et al. Detection of hepatitis B virus genotype A3 and primary drug resistance mutations in African immigrants with chronic hepatitis B in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(3):641-4.
255. Sagnelli E, Alessio L, Sagnelli C, Gualdieri L, Pisaturo M, Minichini C, et al. Hepatitis B Virus Genotypes, Epidemiological Characteristics, and Clinical Presentation of HBV Chronic Infection in Immigrant Populations Living in Southern Italy. *Hepat Mon.* 2017.
256. Scotto G, Martinelli D, Di Tullio R, Fazio V. Epidemiological and Clinical Features of Hepatitis B Virus Genotypes among Immigrants in Southern Italy. *Hepat Res Treat.* 2010;2010:878356.
257. Zuccaro O, Romano L, Mele A, Mariano A, Clementi M, Tosti ME, et al. Clinical, epidemiological and virological features of acute hepatitis B in Italy. *Infection.* 2015;43(4):431-41.
258. Quarleri J, Moretti F, Bouzas MB, Laufer N, Carrillo MG, Giuliano SF, et al. Hepatitis B virus genotype distribution and its lamivudine-resistant mutants in HIV-coinfected patients with chronic and occult hepatitis B. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2007;23(4):525-31.

259. Inoue T, Tanaka Y. Hepatitis B virus and its sexually transmitted infection - an update. *Microb Cell*. 2016;3(9):420-37.
260. Zehender G, De Maddalena C, Giambelli C, Milazzo L, Schiavini M, Bruno R, et al. Different evolutionary rates and epidemic growth of hepatitis B virus genotypes A and D. *Virology*. 2008;380(1):84-90.
261. Shepard CW, Simard EP, Finelli L, Fiore AE, Bell BP. Hepatitis B virus infection: epidemiology and vaccination. *Epidemiol Rev*. 2006;28:112-25.
262. Tseng YT, Sun HY, Chang SY, Wu CH, Liu WC, Wu PY, et al. Seroprevalence of hepatitis virus infection in men who have sex with men aged 18-40 years in Taiwan. *J Formos Med Assoc*. 2012;111(8):431-8.
263. Stroffolini T, Almasio PL, Sagnelli E, Mele A, Gaeta GB. Evolving clinical landscape of chronic hepatitis B: A multicenter Italian study. *J Med Virol*. 2009;81(12):1999-2006.
264. Cross TJ, Rizzi P, Horner M, Jolly A, Hussain MJ, Smith HM, et al. The increasing prevalence of hepatitis delta virus (HDV) infection in South London. *J Med Virol*. 2008;80(2):277-82.
265. El Bouzidi K, Elamin W, Kranzer K, Irish DN, Ferns B, Kennedy P, et al. Hepatitis delta virus testing, epidemiology and management: a multicentre cross-sectional study of patients in London. *J Clin Virol*. 2015;66:33-7.
266. Reinheimer C, Doerr HW, Berger A. Hepatitis delta: on soft paws across Germany. *Infection*. 2012;40(6):621-5.
267. Zhang Q, Cao G. Genotypes, mutations, and viral load of hepatitis B virus and the risk of hepatocellular carcinoma: HBV properties and hepatocarcinogenesis. *Hepat Mon*. 2011;11(2):86-91.
268. Tonetto PA, Goncales NS, Fais VC, Vigani AG, Goncales ES, Feltrin A, et al. Hepatitis B virus: molecular genotypes and

- HBeAg serological status among HBV-infected patients in the southeast of Brazil. *BMC Infect Dis.* 2009;9:149.
269. Yang HI, Sherman M, Su J, Chen PJ, Liaw YF, Iloeje UH, et al. Nomograms for risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Oncol.* 2010;28(14):2437-44.
270. Hundie GB, Raj VS, Michael DG, Pas SD, Osterhaus AD, Koopmans MP, et al. Molecular epidemiology and genetic diversity of hepatitis B virus in Ethiopia. *J Med Virol.* 2016;88(6):1035-43.
271. Sticchi L, Caligiuri P, Cacciani R, Alicino C, Bruzzone B. Epidemiology of HBV S-gene mutants in the Liguria Region, Italy: Implications for surveillance and detection of new escape variants. *Hum Vaccin Immunother.* 2013;9(3):568-71.
272. Svicher V, Cento V, Bernassola M, Neumann-Fraune M, Van Hemert F, Chen M, et al. Novel HBsAg markers tightly correlate with occult HBV infection and strongly affect HBsAg detection. *Antiviral Res.* 2012;93(1):86-93.
273. Zollner B, Petersen J, Schroter M, Laufs R, Schoder V, Feucht HH. 20-fold increase in risk of lamivudine resistance in hepatitis B virus subtype adw. *Lancet.* 357. England2001. p. 934-5.

9 ANEXOS

Anexo I



DITAME DO COMITÉ DE ÉTICA DA INVESTIGACIÓN DE SANTIAGO-LUGO

Juan Manuel Vázquez Lago, Secretario do Comité de Ética da Investigación de Santiago-Lugo

CERTIFICA:

Que este Comité avaliou na súa reunión do día 22/11/16 o estudo:

Título: Epidemiología molecular del virus de la hepatitis B en el Área Sanitaria de Santiago de Compostela (España)

Promotor: Rocío Trastoy Pena

Tipo de estudo: Outros

Código de Rexistro: 2016/506

E, tomando en consideración as seguintes cuestións:

- A pertinencia do estudo, tendo en conta o coñecemento dispoñible, así como os requisitos legais aplicables, e en particular a Lei 14/2007, de investigación biomédica, o Real Decreto 1716/2011, de 18 de novembro, polo que se establecen os requisitos básicos de autorización e funcionamento dos biobancos con fins de investigación biomédica e do tratamento das mostras biolóxicas de orixe humana, e se regula o funcionamento e organización do Rexistro Nacional de Biobancos para investigación biomédica, a ORDE SAS/3470/2009, de 16 de decembro, pola que se publican as Directrices sobre estudos Posautorización de Tipo Observacional para medicamentos de uso humano, e o RD 1090/2015, de 4 de decembro, polo que se regulan os ensaios clínicos con medicamentos, os Comités de Ética da Investigación con medicamentos e Rexistro Español de Estudos Clínicos
- A idoneidade do protocolo en relación aos obxectivos do estudo, xustificación dos riscos e molestias previsibles para o suxeito, así como os beneficios esperados.
- Os principios éticos da Declaración de Helsinki vivente.
- Os Procedementos Normalizados de Traballo do Comité.

Emite un **INFORME FAVORABLE** para a realización do estudo polo/a investigador/a do centro:

| Centros | Investigadores Principais |
|--------------------------------|---------------------------|
| C.H. Universitario de Santiago | Rocío Trastoy Pena |

En Santiago de Compostela, a 22 de novembro de 2016

O secretario



Juan M. Vázquez Lago



10 ÍNDICES COMPLEMENTARIOS

10.1 INDICE DE FIGURAS

| | | |
|-------------------|--|-----|
| Figura 1. | Representación esquemática del genoma del VHB. | 28 |
| Figura 2. | Ciclo biológico del virus de la hepatitis B. | 30 |
| Figura 3. | Distribución global de los ocho genotipos del virus de la hepatitis B. | 43 |
| Figura 4. | Historia natural de la infección aguda por VHB según la vía de transmisión. | 52 |
| Figura 5. | Algoritmo de manejo del paciente con infección por VHB. | 66 |
| Figura 6. | AS de Santiago de Compostela localizada en la Comunidad Autónoma de Galicia (España). | 83 |
| Figura 7. | Mapa de localidades del AS de Santiago de Compostela. | 84 |
| Figura 8. | Distribución de edad de la población objeto de estudio. | 98 |
| Figura 9. | Distribución de genotipos en pacientes nativos e inmigrantes. | 104 |
| Figura 10. | Prevalencia de infectados crónicos totales por VHB en el AS. | 115 |
| Figura 11. | Genotipado del virus de la hepatitis. | 129 |
| Figura 12. | Filogeografía VHB para subgenotipo D4. | 130 |
| Figura 13. | Filogeografía VHB tipos A. | 131 |
| Figura 14. | Análisis demográfico de la epidemia de VHB en Santiago de Compostela. | 132 |
| Figura 15. | Filogenia datada de VHB tipos A y D4. | 133 |

10.2 ÍNDICE DE TABLAS

| | | |
|------------------|--|-----|
| Tabla 1. | Relación entre los genotipos, subgenotipos y subtipos serológicos del VHB | 31 |
| Tabla 2. | Técnicas de genotipado del VHB más comunes. | 40 |
| Tabla 3. | Prevalencia de genotipos del VHB en las distintas áreas geográficas. | 44 |
| Tabla 4. | Características serológicas y clínicas de las distintas fases de la hepatitis B crónica. | 56 |
| Tabla 5. | Factores de riesgo asociados a la progresión de la enfermedad en pacientes con hepatitis B crónica | 57 |
| Tabla 6. | Características principales de las dos estrategias para tratar la HBC. | 68 |
| Tabla 7. | Comparación entre los genotipos más prevalentes en países asiáticos (B y C) y occidente (A y D) de las principales características virológicas, inmunológicas y clínicas relacionadas con el genotipo del VHB..... | 76 |
| Tabla 8. | Tratamientos administrados | 86 |
| Tabla 9. | Distribución de genotipos en el total de pacientes infectados crónicos por el VHB y en cada sexo en el AS. | 99 |
| Tabla 10. | Distribución de subtipos en el AS de Santiago de Compostela. | 100 |
| Tabla 11. | Distribución de genotipos por edades en el total de la población..... | 102 |
| Tabla 12. | Distribución de genotipos en pacientes nativos versus pacientes inmigrantes..... | 103 |
| Tabla 13. | Distribución de factores de riesgo por edades en el total de la población..... | 105 |
| Tabla 14. | Distribución de genotipos por vía de transmisión en el AS ... | 107 |
| Tabla 15. | Distribución de genotipos en las diferentes áreas. | 108 |
| Tabla 16. | Distribución de genotipos en los distintos grupos de coinfectados. | 110 |

| | | |
|------------------|--|-----|
| Tabla 17. | Prevalencia de infectados crónicos por cada mil habitantes en el AM, AC, AR y AS total..... | 111 |
| Tabla 18. | Prevalencia infectados crónicos por cada mil habitantes en cada una de las localidades del AM..... | 112 |
| Tabla 19. | Prevalencia de infectados crónicos por cada mil habitantes en cada una de las localidades del AC..... | 113 |
| Tabla 20. | Prevalencia de infectados crónicos por cada mil habitantes en cada una de las localidades del AR..... | 114 |
| Tabla 21. | Distribución de genotipos en las distintas fases de la enfermedad | 116 |
| Tabla 22. | Distribución de genotipos según la positividad o no de HBeAg..... | 117 |
| Tabla 23. | Progresión a cirrosis por edad, sexo y consumo de alcohol en el total de pacientes donde se conocía su estadio hepático..... | 118 |
| Tabla 24. | Desarrollo de CHC por edad, sexo y Diabetes mellitus en el total de pacientes donde se conocía su estadio hepático..... | 119 |
| Tabla 25. | Necesidad de trasplante hepático por edad, sexo y consumo de alcohol en el total de la población donde se conocía su estadio hepático..... | 120 |
| Tabla 26. | Distribución de genotipos en la población total de infectados crónicos y en los pacientes con cirrosis, CHC y/o trasplantados..... | 121 |
| Tabla 27. | Tratamiento recibido por los pacientes infectados crónicamente por VHB..... | 122 |
| Tabla 28. | Proporción de pacientes con mutaciones de resistencia..... | 123 |
| Tabla 29. | Comparación entre la distribución de genotipos en el total de pacientes diagnosticados de infección crónica por el VHB en el AS y la distribución de genotipos en la población virémica circulante..... | 124 |
| Tabla 30. | Comparación entre la distribución de genotipos en el total de pacientes diagnosticados de infección crónica por el VHB en cada área geográfica y la distribución de genotipos en la población virémica circulante..... | 125 |

| | | |
|------------------|--|-----|
| Tabla 31. | Tendencia en la distribución de genotipos del VHB en Galicia y España. | 126 |
| Tabla 32. | Comparación de las características principales de los genotipos A y D, predominantes en nuestra AS | 127 |

