

REVISIÓN

Gac Med Bilbao. 2018;115(2):96-103



Variantes o mutaciones del virus de la hepatitis B

Ángel San Miguel-Hernández^a, Patria de La Fuente-Alonso^a, M.^a Almudena Sánchez-Martín, Emilio Rodríguez-Barbero^b, Jesús Pachón-Julián^b, Rosario Pastor-Martín^b, Patricia Cabrero-Lobato^b

(a) Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Universitario Río Hortega. Valladolid. Castilla y León. España

(b) Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Internacional Isabel I de Castilla. Burgos. Castilla y León. España

Recibido el 1 de septiembre de 2017; aceptado el 24 de septiembre de 2017

PALABRAS CLAVE

Virus de la hepatitis B.
Mmutaciones.
Variantes.

Resumen:

La hepatitis B es una infección hepática potencialmente mortal causada por el virus de la hepatitis B (VHB). Constituye un importante problema de salud a nivel mundial ya que puede causar hepatopatía crónica y conlleva un alto riesgo de muerte por cirrosis y cáncer hepático. Se estima que hay aproximadamente 250 millones de personas que padecen infección crónica por el virus de la hepatitis B. A pesar de que la existencia de vacunas y tratamientos antivirales ha provocado una notable reducción de los casos de insuficiencia hepática aguda asociados a la infección por el VHB, su cronicidad supone todavía un importante problema de salud.

El genoma del VHB presenta una tasa de mutación muy alta, 100 veces más que otros virus ADN. Esto hace que sea un virus muy variable, pudiendo producir en un mismo huésped diferentes variantes o *quasiespecies*, diferenciadas por pequeñas mutaciones que favorecen el potencial oncogénico del virus además de atenuar la inmunogenicidad y la antigenicidad.

© 2018 Academia de Ciencias Médicas de Bilbao. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Hepatitis B virus.
Mutations.
Variants.

Variants or mutations of the hepatitis B virus

Abstract:

Hepatitis B is a life-threatening liver infection caused by the hepatitis B virus (HBV). It is a major health problem worldwide as it can cause chronic liver disease and carries a high risk of death from cirrhosis and liver cancer. It is estimated that there are 250 million people suffering from chronic hepatitis B virus infection. Although the existence of vaccines and antiviral treatments has led to a notable reduction in cases of acute liver failure associated with HBV infection, its chronicity is still an important health problem.

The HBV genome has a very high mutation rate, 100 times more than other DNA viruses. This makes it a highly variable virus, being able to produce in the same host different variants or quasispecies, differentiated by small mutations that favor the oncogenic potential of the virus besides attenuating the immunogenicity and antigenicity.

© 2018 Academia de Ciencias Médicas de Bilbao. All rights reserved.

Introducción

La hepatitis B es una infección hepática potencialmente mortal causada por el virus de la hepatitis B (VHB). Constituye un importante problema de salud a nivel mundial ya que puede causar hepatopatía crónica y conlleva un alto riesgo de muerte por cirrosis y cáncer hepático. En el último informe de la OMS sobre hepatitis víricas, se estima que hay aproximadamente 250 millones de personas que padecen infección crónica por el virus de la hepatitis B, encontrándose más del 60% de los casos en África y en el Pacífico Occidental (OMS, 2017). Gracias a la existencia de vacunas se ha producido una notable reducción de la incidencia de infección aguda por el VHB, especialmente en poblaciones de alto riesgo, pero su cronicidad supone todavía un importante problema de salud a escala mundial^{1, 2}.

El VHB es un virus DNA, hepatotropo no citotóxico perteneciente a la familia de los *Hepadnavirus*, género *Orthohepadnavirus*. La estructura del VHB está formada por una cubierta lipoproteica que envuelve una nucleocápside icosaédrica, en cuyo interior se encuentran, principalmente, la polimerasa vírica y el ADN circular formado por una hebra de DNA completa y otra incompleta, que se circularizan gracias a la complementariedad entre los extremos 5' de ambas hebras¹. En la figura 1 aparece recogida la estructura del virus de la hepatitis B y, en la figura 2, el genoma del virus.

Los diferentes marcadores serológicos de la infección por el virus de la hepatitis B (VHB), tanto aguda como crónica parecen recogidos en la figura 3.

Cuando este virus se presenta ante el sistema inmunológico humano, es capaz de producir una respuesta humoral frente a diferentes antígenos. La cara externa de la bicapa lipídica del virus presenta un antígeno conocido como antígeno de superficie (HBsAg), frente al cual se generan anticuerpos en el hospedador. El HBsAg, también conocido como antígeno Australia, está formado por 3 proteínas: S, M y L, en orden de menor a mayor longitud aminoacídica, codificadas por el gen S. En su estructura tridimensional, este antígeno deja al descubierto al menos 5 epítomos conformacionales (HBs1-HBs5), formando la unión de al menos 3 de ellos el determinante antigénico "a" comprendido entre los aminoácidos 121 a 149 de la región S, dentro del gen S³. Por otra parte, en la estructura de la nucleocápside se encuentra el antígeno Core (HBcAg), también con capacidad inmunogénica. Es una pequeña proteína que forma dímeros que se ensamblan y forman una partícula Core icosaédrica⁴. Su extremo C-terminal rico en argininas, localizado en la cara interna de las partículas, se encarga de unir el RNA pregenómico para la replicación del virus⁵. La cadena de aminoácidos de la proteína core junto con 29 aminoácidos codificados en la región pre-Core, es procesada por el aparato de Golgi liberando a la circulación sanguínea el antígeno e (HBeAg), del que no se conoce su función exacta pero produce el estímulo de los linfocitos B para la generación de anticuerpos, produciendo una respuesta inmunológica de tipo humoral⁶. Además de estos antígenos, existen otras proteínas y enzimas,

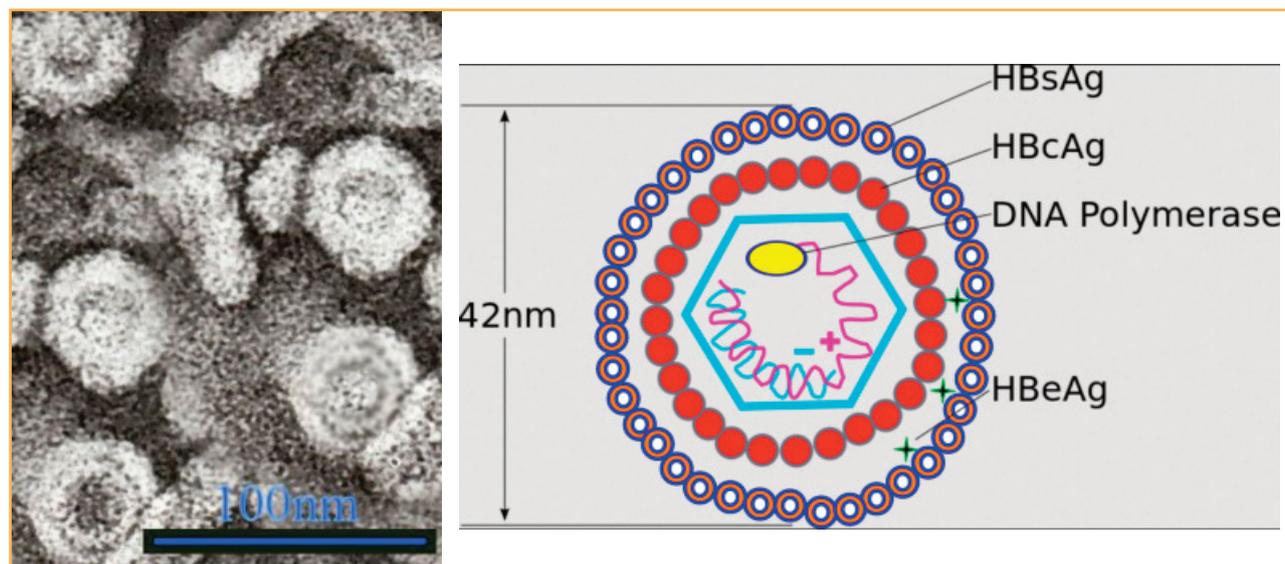


Figura 1. Imagen y estructura del virus de la hepatitis B.

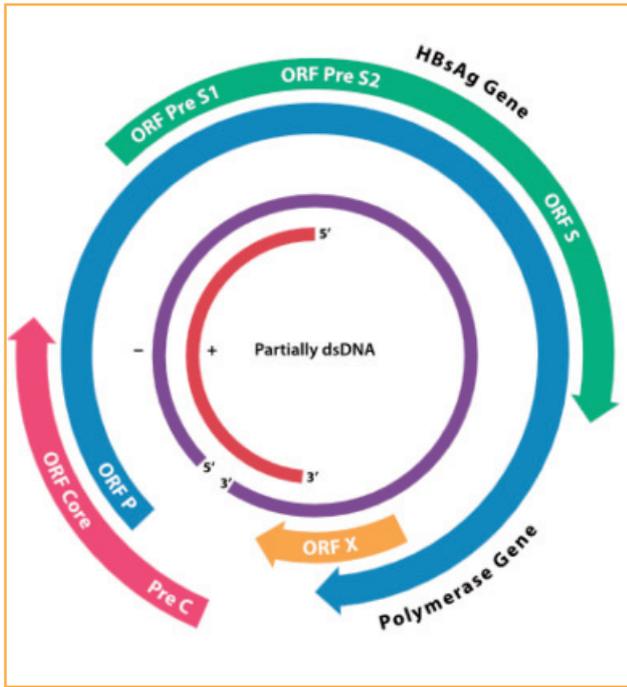


Figura 2. Genoma del virus de la hepatitis B.

como la proteína X o la polimerasa, codificadas en el DNA viral. La polimerasa de este virus posee funciones que en otros virus son realizadas por enzimas independientes. Estas actividades son DNA polimerasa, transcriptasa inversa y actividad ribonucleasa⁷.

Debido a la falta de función correctora de errores y a su actividad retrotranscriptasa, presenta una alta tasa de mutación, influyendo también en este aspecto el solapamiento de genes en el DNA viral. El genoma del VHB presenta una tasa de mutación de $1,4 \cdot 3,2 \times 10^{-5}$ sustituciones/nucleótido/año, 100 veces más que otros virus ADN⁸. Esto hace que sea un virus muy variable, pudiendo producir en un mismo huésped diferentes variantes o quasiespecies, diferenciadas por pequeñas mutaciones que pueden favorecer el potencial oncogénico del virus y/o de atenuar la inmunogenicidad y la antigenicidad⁹. Actualmente se conocen al menos 10 genotipos diferentes del VHB, nombrados de la "A" a la "J". Para que una variante sea reconocida como un genotipo del VHB debe tener al menos el 8% de su cadena nucleotídica diferente a cualquier otro, considerándose como subgenotipo si presenta del 4 al 8% diferente. Existen evidencias de que los diferentes genotipos y subgenotipos muestran una distribución geográfica característica relacionada también con la progresión clínica y el pronóstico de la enfermedad, además de influir en la respuesta al tratamiento¹⁰.

La definición actual de hepatitis B crónica según la OMS se basa en la demostración de la persistencia del antígeno Australia (HBsAg) en el suero de un paciente durante un periodo de más de 6 meses, clasificación recomendada por las guías clínicas de la American Association for the Study of Liver Disease (AASLD) y La Asociación Europea para el Estudio del Hígado (EASL); siendo la persistencia del HBsAg el principal marcador del riesgo de sufrir una hepatopatía crónica y cáncer

de hígado o carcinoma hepatocelular, posteriormente.

También se puede determinar en suero la concentración de ADN vírico, siendo el marcador más específico de replicación viral. Su positividad se suele correlacionar muy directamente con el HBcAg intrahepático, con la ventaja de que su determinación no precisa biopsia. De este modo, conocer los valores de ADN se considera indispensable para tomar la decisión de tratar y para controlar el tratamiento¹¹.

Recientemente, la Asociación Europea para el Estudio del Hígado (EASL) ha publicado las recomendaciones para el manejo de la infección crónica por el VHB, mostrando una nueva nomenclatura que clasifica a las diferentes fases de la infección crónica por el VHB según los marcadores serológicos:

- Fase 1: infección por VHB crónica HBeAg positiva, caracterizada por presencia del antígeno "e" del VHB, junto con un nivel elevado de ADN del VHB, un nivel normal de ALT y un nivel mínimo o nulo de fibrosis.
- Fase 2: hepatitis B crónica HBeAg positiva. Se caracteriza por una elevada carga viral del VHB, unos niveles elevados de ALT, un nivel de moderado a grave de necroinflamación hepática y fibrosis progresiva.

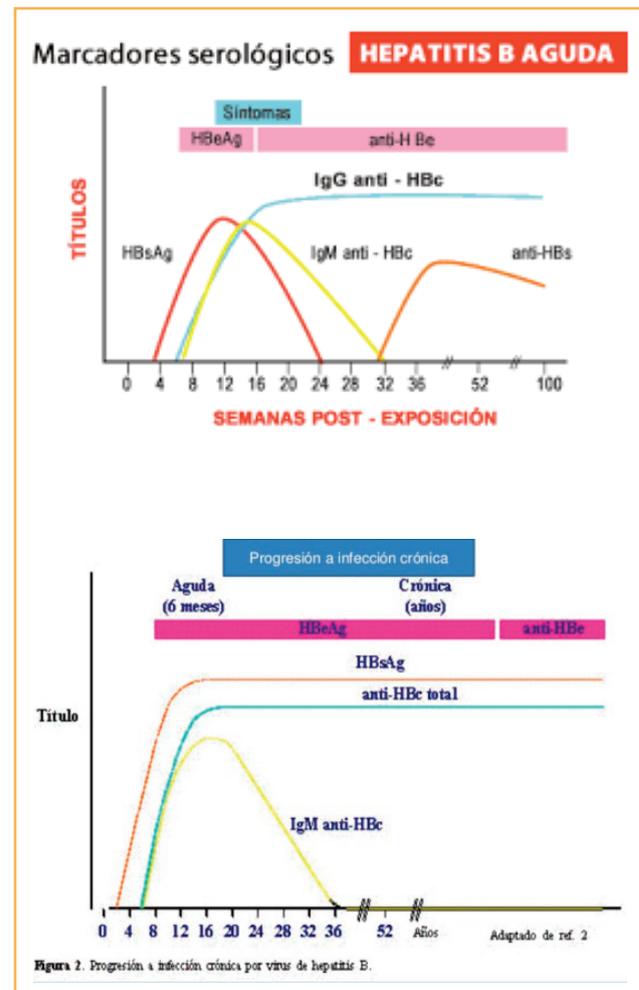


Figura 2. Progresión a infección crónica por virus de hepatitis B.

Figura 3. Marcadores serológicos del virus de la Hepatitis B (arriba hepatitis aguda y abajo hepatitis crónica).

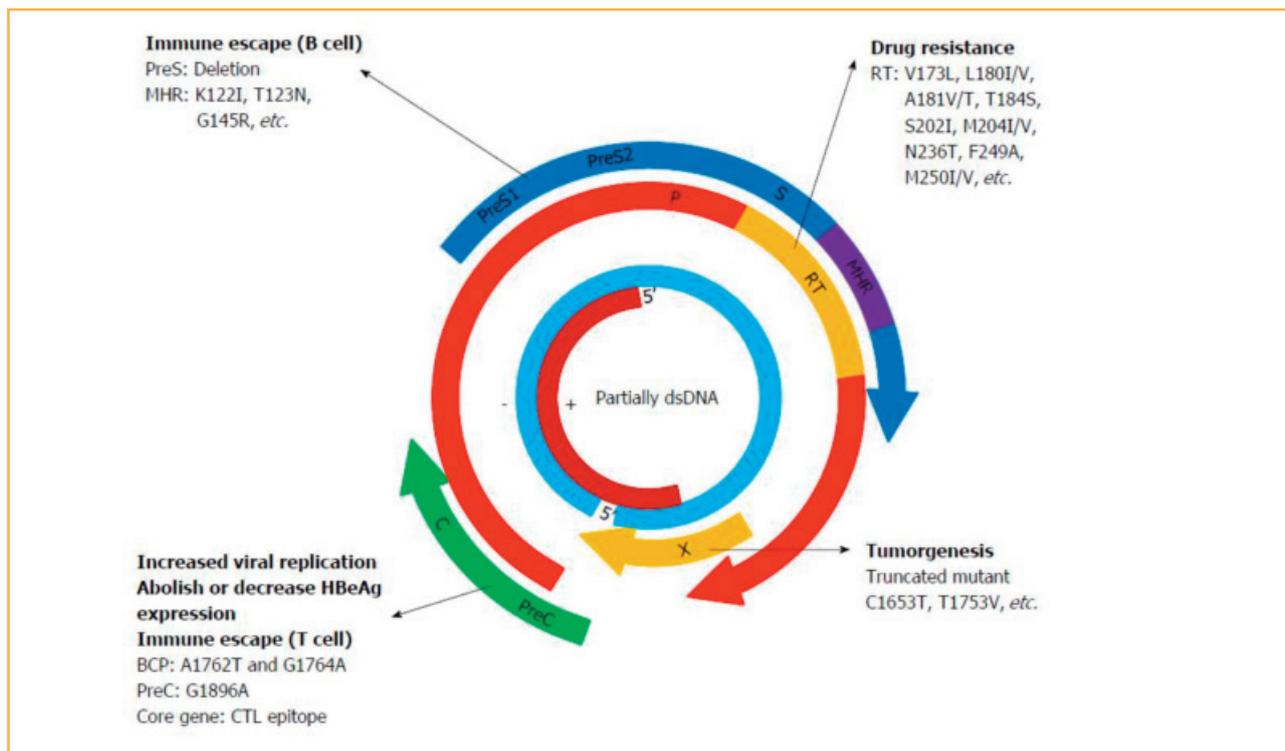


Figura 4. Mutaciones en los genes X, P y C del virus de la hepatitis B más frecuentes. Se muestran las dos hebras del DNA viral (+ y -) (tomada de ¹³).

- Fase 3: infección por VHB crónica HBeAg negativa (anteriormente denominada de portador inactivo).
- Fase 4: hepatitis B crónica HBeAg negativa.
- Fase 5: fase HBsAg negativa (hasta ahora llamada fase oculta). Su principal característica es que el antígeno de superficie del VHB está indetectable.

Esta guía de práctica clínica recomienda la detección de HBeAg y anti-HBe para la determinación de la fase de infección crónica. La medida de los niveles séricos de DNA se considera esencial para el diagnóstico, el establecimiento de la fase de infección, la decisión de comenzar un tratamiento y la monitorización del mismo. En el caso concreto de la infección crónica HBeAg negativa y en pacientes tratados con interferón-alfa, es de utilidad la cuantificación del HBsAg sérico¹².

Mutaciones en el virus de la hepatitis B

El genoma del virus de la hepatitis B se compone de 4 genes que se encuentran solapados en el DNA de doble cadena parcial: gen C, gen S, gen P y gen X. En la figura 4, aparecen recogidas las mutaciones más frecuentes del virus de la hepatitis B en los genes X, P y C¹³.

1. Gen C

El gen C, precore-core (preC/C), contiene la información necesaria para formar la proteína Core y el antígeno e. Las mutaciones que se producen en el promotor basal Core, comprende desde el aminoácido 1742 al 1849, pueden suprimir la producción de RNAm_{preC} a nivel transcripcional contribuyendo así a la síntesis defectiva de HBeAg¹⁴. Las mutaciones en las regiones Core y promotor basal del Core son frecuentemente en-

contradas en pacientes que no expresan el antígeno e, son HBeAg (-) pero si presentan replicación viral activa provocando un daño severo en la función hepática¹⁵. Las mutaciones en el primer aminoácido de la región pre-Core, como las sustituciones A1814C/T, T1815C/A, son encontradas frecuentemente en pacientes con genotipo A y conducen a un fallo en la producción de HBeAg.

También la sustitución de valina por fenilalanina en el residuo 17 de la región pre-Core (G1862T), puede afectar a la expresión de HBeAg interfiriendo en la eliminación de la señal peptidasa¹⁶. Pero la mutación más frecuentemente encontrada en la región pre-Core afecta al nucleótido situado en posición 1896, en la que el triplete UGG pasa a UAG (G1896A) generándose un codón de parada, lo que provoca una terminación prematura de la síntesis de la proteína pre-Core.

La mayoría de mutaciones en esta región son generadas durante la fase de seroconversión en la infección crónica por el virus de la hepatitis B. La proteína o antígeno Core es la principal diana de los Linfocitos T, provocando así, estas mutaciones, infecciones persistentes¹⁷.

Otro cambio descrito es la doble mutación T1762A/A1764G, que se relaciona con la disminución en la síntesis del RNA que codifica la proteína Core y la polimerasa, lo que puede provocar que la carga viral sea baja (<200 UI/mL) (18). Las mutaciones en el extremo C terminal de la región preC/C conducen a alteraciones en la síntesis, transporte y secreción del HBeAg. Así, se produce una acumulación de pro-proteína HBeAg (p22) en los hepatocitos, observándose una disminución de la replicación activa del virus que pro-

voca una disminución de la carga viral detectada en el suero del paciente¹⁴.

Otras 5 mutaciones preC/C, G1896A en la región preC y 4 mutaciones en la región C: E43K, P50A/H/Y, A131G/N/P y S181H/P, han sido relacionadas significativamente con el estatus serológico de HBeAg en pacientes con hepatitis B crónica con el subgenotipo C2¹⁶.

Las mutaciones en la región pre-Core, además de asociarse con la cronificación de la infección por VHB, pueden tener implicaciones clínicas como una inflamación hepática más agresiva o una insuficiencia hepática aguda, asociándose con resistencia al tratamiento con interferón alfa, mayor probabilidad de rechazo del injerto tras un trasplante de hígado, e incluso con el desarrollo de hepatitis fulminante. Sin embargo, también se han encontrado en portadores asintomáticos¹⁹.

2. Gen S

Otro de los genes que componen el ADN del virus de la hepatitis B es el gen S compuesto por 3 regiones preS1/preS2/S, que cuando son traducidas forman las proteínas L, M, S. Estas proteínas dan lugar a la formación del antígeno de superficie dejando al descubierto, al adquirir su estructura tridimensional, el determinante "a", diana de la inmunidad humoral generada por la infección del VHB. Así, las mutaciones que afectan a este epítipo originan variantes de escape, tanto de la inmunidad natural como de la vacunación³.

Las deleciones de fragmentos de PreS pueden afectar a dominios de unión al hepatocito y a la nucleocápside entre otros, siendo aquellas deleciones que afectan al promotor del gen S las más importantes. Este tipo de variantes se relacionan con una acumulación en el retículo endoplásmico de HBsAg generando estrés oxidativo, favoreciendo así el desarrollo de carcinoma hepatocelular²⁰.

La transmisión vertical de estas variantes se describió por primera vez en 1990, en un estudio italiano con niños de madres portadoras que habiendo sido vacunados desarrollaron la infección. Una de las mutaciones encontradas en este estudio es ahora una de las variantes de escape de la vacuna más frecuentemente encontrada: el cambio de una glicina por una arginina en el aminoácido 145 (G145R), perteneciente al segmento del determinante altamente antigénico del HBsAg²¹. También se ha descrito la transmisión horizontal en presencia de altos títulos de HBsAg²².

La sensibilidad y precisión en la detección sérica del HBsAg es fundamental para detectar la infección por el virus de la hepatitis B, para reducir el periodo ventana en la infección aguda y para detectar las variantes de escape y otras variantes mutadas del VHB.

En un estudio se comparó la detección de antígenos mutados según algunos casos descritos en la literatura científica, recombinantes y naturales, de diferentes inmunoensayos disponibles en el mercado diagnóstico.

Tabla I

En la tabla, tomada de la última guía publicada por la EASL en 2017, se muestran los diferentes perfiles de variantes del virus de la hepatitis B relacionadas con la resistencia a los fármacos usados para el tratamiento de la hepatitis B crónica (tomada de 12). (LAM, lamivudina; LDT, telbivudina; ETV, entecavir; ADV, adefovir; TDF, tenofovir disoproxilfumarato; TAF, tenofovir alafenamida. Datos in vitro para tenofovir, in vivo para TDF y sin datos clínicos para TAF).

HBV variant	LAM	LDT	ETV	ADV	TDF/TAF
Wild type	S	S	S	S	S
M204V	R	S	I	I	S
M204I	R	R	I	I	S
L180M + M204V	R	R	I	I	S
A181T/V	I	I	S	R	I
N236T	S	S	S	R	I
L180M + M204V/I ± I169T ± V173L ± M250V	R	R	R	S	S
L180M + M204V/I ± T184G ± S202I/G	R	R	R	S	S

Según los resultados que obtuvieron, los inmunoensayos de Abbott en diferentes autoanalizadores fueron los que presentaron mayor capacidad de detectar mutaciones en el gen S presentes en el ensayo, aunque la sensibilidad de todos los ensayos fue buena²³. Otro estudio más reciente publicado en 2015, compara dos métodos de detección de HBsAg basados en quimioluminiscencia (Elecsys y Abbot) y estudia su correlación con la carga viral. Los resultados de ambos métodos correlacionan muy bien entre ellos y con la concentración de DNA viral, concluyendo los autores que ambos métodos pueden ser usados en la práctica clínica²⁴.

3. Gen P

El gen P codifica para la formación de la polimerasa del VHB, enzima utilizada como diana en diferentes antivirales usados para el tratamiento de esta infección. Así, las mutaciones en esta secuencia que afectan a dominios catalíticos provocan resistencia a los tratamientos con inhibidores de la enzima que utilizan análogos de nucleótidos/nucleósidos. Cuando éste no puede ser reconocido por la polimerasa, debido a una mutación, disminuye la sensibilidad a la terapia antiviral y el virus se replica.

Las mutaciones en la región YMDD, altamente conservada y esencial en la replicación del virus, pueden producir resistencias y defectos en la replicación. Las mutaciones YVDD (rtM204V) y YIDD (rtM204I), están relacionadas con la resistencia a L-nucleósidos como lamivudina, telbivudina y clevudina, y a entecavir²⁵.

En la tabla I, publicada por la EASL en 2017, se relacionan las variantes más relacionadas con resistencia a fármacos. La secuenciación del gen de la polimerasa, además de permitir conocer las mutaciones que favorecen la resistencia a fármacos, detecta mutaciones en la zona de solapamiento del gen Pol y el gen S donde pueden aparecer codones stop en variantes de escape²⁶.

4. Gen X

La infección crónica por el virus de la hepatitis B es la principal causa de carcinoma hepatocelular, existiendo una evidencia científica acumulada de que el producto viral del gen X juega un importante papel en la patogénesis del citado carcinoma. El antígeno X parece promover la carcinogénesis interaccionando con proteínas que alteran la regulación de diferentes vías de señalización que, a su vez, participan en el ciclo celular y la apoptosis²⁷.

En estos casos podemos encontrar valores muy bajos de HBsAg, por lo que el diagnóstico debe realizarse mediante la demostración de presencia de material genómico, aunque es un perfil infrecuente⁸.

La vacuna recombinante contra el VHB ha sido implementada principalmente en las regiones con alta endemia para la infección contra este virus. La casi totalidad de los países en el mundo han implementado esta vacuna, según los últimos datos de la OMS. En el año 2015, la cobertura mundial con tres dosis de vacuna llegó al 84%, y la cobertura mundial con la dosis

al nacer fue del 39%²⁸. Es decir, 185 países de todo el mundo (95%), habían introducido la vacunación frente a la hepatitis B en los calendarios infantiles y 97 países (49%), habían introducido la dosis recomendada al nacimiento²⁹.

Los anticuerpos producidos en respuesta a la vacuna están dirigidos contra el determinante "a" del HBsAg, pero a pesar de la disponibilidad de una vacuna efectiva, la hepatitis B sigue siendo un problema de salud pública a nivel mundial^{30, 31}. Algunas cepas mutantes pueden ser escasas o nulumamente neutralizadas por los anticuerpos anti-HBs adquiriendo una clara ventaja biológica sobre la cepa silvestre que las originó: presentan la posibilidad de replicarse en el hospedador del que surgen y en individuos vacunados³.

Existe consenso en considerar que las cepas mutantes en el gen S, independientemente de cuál sea su origen, pueden ser transmitidas de manera vertical y horizontal y conservan la capacidad de generar infecciones activas, susceptibles de cronificación, en individuos vacunados. Esto puede suponer la diseminación de estas cepas generando un importante problema de salud pública³.

Además de la formación de variantes de escape por mutaciones en el gen S por el tratamiento preventivo con inmunización pasiva, existen variantes que pueden conferir resistencia a un fármaco, a una familia de fármacos, incluso resistencia cruzada entre varios antivirales. Este tipo de variantes se relacionan más con mutaciones en el gen de la polimerasa (gen P).

Cuando un paciente con hepatitis B crónica, en el que hospedan este tipo de variantes es sometido a terapia antiviral, se ejerce una presión selectiva positiva sobre las cepas mutantes, favoreciendo su replicación gracias a la eliminación de la cepa salvaje. La incidencia de la aparición varía según la carga viral previa al tratamiento, la rapidez de la supresión de la replicación viral por el fármaco, el tiempo de exposición al mismo y exposición previa a otros antivirales³².

En 2011 se publicó un estudio sobre un ensayo mejorado en sensibilidad y detección de mutantes para la detección del antígeno de superficie (HBsAg). Comparado con otros dos inmunoensayos, se evaluó la detección de 9 mutantes para el determinante "a", observando que este nuevo ensayo mejoró al resto, detectando los mutantes con las sustituciones T123A y D144A y la inserción en la posición 122, dentro de la región que forma el determinante "a"³³.

Las mutaciones que provocan un cambio en el antígeno, ya sean del antígeno de superficie (HBsAg) o del antígeno e (HBeAg), hacen que éste no sea detectado en el suero del paciente por los métodos comerciales convencionales de análisis; este hecho, unido a que estos cambios son capaces de eludir la respuesta inmunitaria, por lo cual se complica la detección de la enfermedad por los métodos serológicos. Este aspecto, cobra especial relevancia en la transmisión del virus en las transfusiones de sangre y en los trasplantes, ya que los virus de la hepatitis B mutantes podrían no ser detectados³³.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Bibliografía

- 1 Garcia Alonso F, Martín Mateos R, Moreira Vicente V. Pharmacological treatment of acute hepatitis B. *Med Clin*. 2012;138:633-7.
- 2 Ott JJ, Horn J, Krause G, Mikolajczyk RT. Time trends of chronic HBV infection over prior decades. A global analysis. *J Hepatol* 2017; 66: 48-54.
- 3 Navarro D, Esparcia O, Granda S. Mutantes del virus de la Hepatitis B en el gen S. *SEIMC*. 2006.
- 4 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): 249-255.
- 5 Zlotnick A, Cheng N, Stahl SJ, Conway JF, Steven a C, Wingfield PT. Localization of the C terminus of the assembly domain of hepatitis B virus capsid protein: implications for morphogenesis and organization of encapsidated RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94(18):9 556-61.
- 6 Ou J. Molecular biology of hepatitis B virus e antigen. *J Gastroenterol Hepatol*. 1997; 12(9-10): S178-87.
- 7 Nassal M. Hepatitis virus B replication: novel roles for virus-host interactions. *Intervirology*. 1999; 42: 100-16.
- 8 García Bermejo I. Anomalías y patrones serológicos infrecuentes de los marcadores diagnósticos del virus de la hepatitis B. *Enferm Infecc Microbiol Clin [Internet]*. 2007;25:21-8.
- 9 Aragri M, Alteri C, Battisti A, Di Carlo D, Minichini C, Sagnelli C, et al. Multiple hepatitis B virus (HBV) quasispecies and immune-escape mutations are present in HBV surface antigen and reverse transcriptase of patients with acute hepatitis B. *J Infect Dis* 2016; 213(12): 1897-905
- 10 Sunbul M. Hepatitis B virus genotypes: Global distribution and clinical importance. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(18): 5427-34.
- 11 Buti M. Actualización en el tratamiento de la hepatitis crónica B. *Gastroenterol Hepatol*. 2004; 27: 55-7
- 12 EASL. Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. 2017.
- 13 Zhen-Hua Zhang, Chun-Chen Wu, Xin-Wen Chen, Xu Li, Jun Li, Meng-Ji Lu. Genetic variation of hepatitis B virus and its significance for pathogenesis. *World J Gastroenterol*. 2016; 22(1): 126-144
- 14 Kim H, Lee S-A, Do SY, Kim B-J. Precore/core region mutations of hepatitis B virus related to clinical severity. *World J Gastroenterol*. 2016; 22(17): 4287.
- 15 Wang X-L, Ren J-P, Wang X-Q, Wang X-H, Yang S-F, Xiong Y. Mutations in pre-core and basic core promoter regions of hepatitis B virus in chronic hepatitis B patients. *World J Gastroenterol [Internet]*. 2016;22(11):3268.
- 16 Guarnieri M, Kim K-H, Bang G, Li J, Zhou Y, Tang X, et al. Point mutations upstream of hepatitis B virus core gene affect DNA replication at the step of core protein expression. *J Virol*. 2006;80(2):587-95.
- 17 Kim H, Lee SA, Kim DW, Lee SH, Kim BJ. Naturally Occurring Mutations in Large Surface Genes Related to Occult Infection of Hepatitis B Virus Genotype C. *PLoS One*. 2013;8(1).
- 18 Parekh S, et al. Genomereplication, virionsecretion, and e antigen expression of naturally occurring hepatitis B virus corepromotermutants. *J Virol* 2003; 77(12): 6601-12
- 19 Liu CJ, Chen BF, Chen PJ, Lai MY, Huang WL, Kao JH, et al. Role of Hepatitis B viral load and basal core promoter mutation in hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers. *J Infect Dis*. 2006; 193: 1258-65
- 20 Chen Y, Qian F, Yuan Q, Li X, Wu W, Guo X, et al. Mutations in hepatitis B virus DNA from patients with coexisting HBsAg and anti-HBs. *J Clin Virol* 2011; 52: 198-203
- 21 Carman W, Zanetti A, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G, Tanzi E, et al. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet*. 1990;11: 325-9.
- 22 Chakravarty R, Neogi M, Roychowdhury S, Panda C. Presence of hepatitis B surface antigen mutant G145R DNA in the peripheral blood leukocytes of the family members of an asymptomatic carrier and evidence of its horizontal transmission. *virus Res*. 2002; 90(1-2): 133-41.
- 23 Moerman B, Moons V, Sommer H, Schmitt Y, Sletter M. Evaluation of sensitivity for wild type and mutant forms of hepatitis B surface antigen by four commercial HBsAg assays. *Clin Lab*. 2004; 50(3-4): 159-62.
- 24 Gupta E, Pandey P, Kumar A, Sharma M K, Sarin S K. Correlation between two chemiluminescence based assays for quantification of hepatitis B surface antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Indian J Med Microbiol* 2015; 33: 96-100
- 25 Locarnini S. Primary resistance, multidrug resistance, and cross-resistance pathways in HBV as a consequence of treatment failure. *Hepatol Int*. 2008; 2(2):147-51.
- 26 Caligiuri P, Cerruti R, Icardi G, Bruzzone B. Overview of hepatitis B virus mutations and their implications in the management of infection. *World Journal of Gastroenterology*. 2016; 22(1): 145-154
- 27 Kew MC. Hepatitis B virus x protein in the pathogenesis of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011; 26 Suppl 1: 144-152
- 28 OMS. Hepatitis B. Internet. Consultado el 7 de marzo de 2018. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/es/>.
- 29 Hepatitis B vaccines: WHO position paper – July 2017. *Weekly epidemiological record. Relevé épidémiologique hebdomadaire*. 7 July 2017, 92th year. n° 27. 2017; 92, 369-392. Internet. Consultado marzo de 2018. Disponible en: <http://www.who.int/wer>.

- 30 Sung W-K, Zheng H, Li S, Chen R, Liu X, Li Y, et al. Genome-wide survey of recurrent HBV integration in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* [Internet]. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. 2012; 44(7): 765–9.
- 31 Jaramillo CM, Navas M-C. [Escape mutants of hepatitis B virus]. *Rev Chil Infectol*. 2015; 32(2): 190–7.
- 32 Fung SK, Chae HB, Fontana RJ, Conjeevaram H, Marrero J, Oberhelman K, et al. Virologic response and resistance to adefovir in patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol*. 2006; 44(2): 283–90.
- 33 Lou SC, Pearce SK, Lukaszewska TX, Taylor RE, Williams GT, Leary TP. An improved Abbott ARCHITECT assay for the detection of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg). *J Clin Virol*. 2011; 51(1): 59–63.