



**Caracterización de mutaciones del Virus de la Hepatitis B asociadas a
resistencia al análogo de nucleósido Entecavir en pacientes colombianos sin
tratamiento previo 2021–2023**

Isabela Palacio Gaviria
Laura Isabel Montoya Martínez

Trabajo de grado presentado para optar al título de Microbiólogo y Bioanalista

Tutora
María Cristina Navas Navas, Doctor (PhD) en Virología

Universidad de Antioquia
Escuela de Microbiología
Microbiología y Bioanálisis
Medellín, Antioquia, Colombia
2025

Cita	Palacio Gaviria y Montoya Martínez (1)
Referencia	(1) Palacio Gaviria I, Montoya Martínez LI. Caracterización de mutaciones del Virus de la Hepatitis B asociadas a resistencia al análogo de nucleósido Entecavir en pacientes colombianos sin tratamiento previo 2021–2023 [Trabajo de grado profesional]. Medellín, Colombia. Universidad de Antioquia; 2025.
Estilo Vancouver/ICMJE (2018)	



Seleccione biblioteca, CRAI o centro de documentación UdeA (A-Z)

Repositorio Institucional: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

Tabla de contenido

Resumen	7
Abstract.....	8
Introducción.....	9
Materiales y métodos	12
Resultados.....	18
Discusión	26
Conclusiones	31
Referencias	32

Lista de tablas

Tabla 1. Características sociodemográficas de los pacientes con diagnóstico de Hepatitis B sin historia de tratamiento incluidos en el estudio 19

Tabla 2. Marcadores serológicos de los casos de Hepatitis B crónica sin historia de tratamiento incluidos en el estudio **¡Error! Marcador no definido.**22

Tabla 3. Sustituciones en el dominio RT del ORF P del VHB identificadas en muestras de pacientes con diagnóstico de hepatitis B crónica sin historia de tratamiento antiviral **¡Error! Marcador no definido.**

Lista de figuras

Figura 1 Gel de electroforesis de amplificación del ORF S del VHB ... ¡Error! Marcador no definido.0

Figura 2 Gel de electroforesis de amplificación del ORF P del VHB ¡Error! Marcador no definido.1

No se encuentran elementos de tabla de ilustraciones.

Siglas, acrónimos y abreviaturas

ADV	Adefovir
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALT	Alanino aminotransferasa
Anti-HBs	Anticuerpo contra el antígeno de superficie del Virus de la hepatitis B
AST	Aspartato aminotransferasa
ARN	Ácido ribonucleico
cccADN	ADN circular covalentemente cerrado
CHC	Carcinoma hepatocelular
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
ETV	Entecavir
HBC	Hepatitis B crónica
HBcAg	Antígeno core del Virus de la hepatitis B
HBeAg	Antígeno e del Virus de la hepatitis B
HBsAg	Antígeno de superficie del Virus de la hepatitis B
HPTU	Hospital Pablo Tobón Uribe
INS	Instituto Nacional de Salud
INVIMA	Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos
LdT	Telbivudina
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	Marco abierto de lectura
POS	Plan Obligatorio de Salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
q-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RT	Dominio polimerasa con actividad transcriptasa reversa
SIVIGILA	Sistema de vigilancia epidemiológica
TDF	Tenofovir disoproxil fumarato
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VHB	Virus de la Hepatitis B
3TC	Lamivudina

Resumen

La infección crónica por el Virus de la Hepatitis B (VHB) es factor de riesgo de hepatopatías terminales. El tratamiento permite el control de la infección, pero no el aclaramiento viral y por tanto es necesario el esquema a término indefinido con la posibilidad de selección de mutaciones asociadas a resistencia. En Colombia, Entecavir es un antiviral de primera línea en el tratamiento de la Hepatitis B crónica.

El objetivo de esta investigación es caracterizar las mutaciones del Virus de la Hepatitis B asociadas a resistencia a Entecavir en muestras de pacientes con hepatitis B crónica sin tratamiento previo.

Se realizó un estudio descriptivo en muestras de 16 pacientes. Se amplificaron las regiones ORF S y ORF P del genoma del VHB mediante PCR anidada y tiempo real (q-PCR). Se realizó secuenciación con el método Sanger y se analizó la presencia de mutaciones con BioEdit, MEGA 11 y Geno2Pheno.

En 3/16 (18,75%) de las muestras se amplifica ORF S y en 4/16 (25%) el ORF P del Virus de la Hepatitis B. Se caracterizó el genotipo F en 3 muestras y el genotipo A, en 1 muestra. No se encontraron mutaciones primarias o secundarias asociadas a resistencia a ETV.

El presente estudio permitió demostrar la ausencia de mutaciones asociadas a resistencia Entecavir en muestras de pacientes sin historia de tratamiento antiviral para hepatitis B crónica. Sin embargo, se identificaron 10 cambios de aminoácidos en la región RT del ORF P en las 4 muestras secuenciadas.

Palabras clave: Hepatitis B; antivirales; Entecavir; mutación; hepatitis B crónica.

Abstract

Chronic infection by Hepatitis B Virus (HBV) is a risk factor for end terminal liver diseases. The antiviral treatment controls the Hepatitis B Virus infection, but not the viral clearance, thus requiring an indefinite-term regimen with the possibility of selecting mutations associated with resistance. In Colombia, Entecavir is a first-line antiviral in the treatment of chronic Hepatitis B.

The aim of this research is to characterize HBV mutations associated with Entecavir resistance in samples from patients with chronic hepatitis B without prior treatment.

A descriptive study was conducted on samples from 16 patients. The ORF S and ORF P regions of the HBV genome were amplified using nested PCR and real-time PCR (q-PCR). Sequencing was performed using the Sanger method, and the presence of mutations was analyzed using BioEdit, MEGA 11, and Geno2Pheno.

In 3/16 (18, 75%) of the samples, ORF S was amplified, and in 4/16 (25%) of the samples, ORF P of the Hepatitis B Virus was amplified. Genotype F was characterized in 3 samples and genotype A in 1 sample. No primary or secondary mutations associated with resistance to ETV were found.

This study demonstrated the absence of Entecavir resistance associated mutations in samples from patients without a history of antiviral treatment for chronic hepatitis B. However, 10 amino acid changes were identified in the RT region of the P ORF in the 4 sequenced samples.

Key words: Hepatitis B; antivirals; Entecavir; mutation; chronic hepatitis B.

Introducción

La infección por el Virus de la Hepatitis B (VHB) continúa siendo un problema de salud pública en el mundo. La Organización Mundial de la Salud estima 254 millones de personas con hepatitis B crónica (HBC) a nivel mundial (1), con riesgo de desarrollar hepatopatías terminales como cirrosis y carcinoma hepatocelular (2). En particular, la hepatitis viral crónica representa el 80% de todos los casos de cáncer hepático y ésta a su vez es la tercera causa más común de muerte por cáncer en todo el mundo (1).

La hepatitis B es una infección viral que puede ser transitoria con resolución espontánea o evolucionar a infección crónica (2), causada por el virus de la Hepatitis B, perteneciente a la familia *Hepadnaviridae* y género *Orthohepadnavirus* (3). El genoma es un ADN de doble cadena parcial de aproximadamente 3200 pb con cuatro marcos abiertos de lectura (ORF, por sus siglas en inglés) superpuestos: Core, S, P y X. El ORF Core codifica la proteína Core, subunidad estructural de la cápside (HBcAg) y el antígeno e (HBeAg) con función inmunomoduladora; el ORF S codifica las tres isoformas del antígeno de superficie (HBsAg, S, M, L) que participan en la adhesión, la entrada del virión a la célula blanco y desencadena la respuesta inmune a través de un determinante antigénico conocido como determinante “a” que posee epítopes inmunodominantes reconocidos por anticuerpos monoclonales específicos (4); el ORF P codifica la polimerasa viral con sus cuatro dominios: TP, espaciador, RT y RNasa H; y el ORF X que da origen a la proteína X, cuya función es esencial en el proceso de replicación y regulación de la transcripción viral y celular (5–7).

A la fecha se han caracterizado 10 genotipos del Virus de la Hepatitis B, denominados de la A a la J y 40 sub-genotipos (8) que se encuentran distribuidos heterogéneamente alrededor del mundo: En Colombia el genotipo predominante es el F, con los sub genotipos F1a, F1b y F3 (6,9) en departamentos de Guainía, Cundinamarca, Magdalena, Meta, Guaviare, Cauca, Atlántico, Caldas, Boyacá, Córdoba (10), Antioquia, Cundinamarca, Santander (11) y en poblaciones indígenas del departamento del Amazonas (12,13), aunque también se ha reportado la circulación de los genotipos A

prevalente en poblaciones afrocolombianas, E, D y C en ese orden de frecuencia y de los sub genotipos: A1, A2, D3 y D4 (13–20). El VHB es uno de los virus con tasas de mutación más alta entre los virus de tipo ADN que infectan humanos, debido principalmente a la ausencia de actividad correctora de la polimerasa viral, lo que lleva a una alta tasa de errores ($2,3 \times 10^{-5}$ sitios/año), generando acumulación de mutaciones y generación de cuasi especies que según las condiciones del hospedero y la interacción que se dé entre el virus, el hepatocito y la respuesta inmune y/o tratamiento antiviral, pueden desencadenar la selección de mutaciones de escape o de resistencia a los antivirales que pueden disminuir la afinidad de los anticuerpos Anti-HBs y generar casos de infección en individuos vacunados (12,21).

El Entecavir (ETV) es un análogo de nucleósido que después de su administración oral sufre fosforilación intracelular y en su forma trifosfato activa, actúa como inhibidor competitivo de la 2'-desoxiguanosina durante la unión al cebador, la síntesis de la cadena negativa de ADN a partir del ARN pre-genómico y la síntesis de la cadena positiva de ADN a partir de la cadena negativa por la polimerasa viral (22), una vez se incorpora en la cadena, detiene el proceso de elongación al generar restricciones estéricas en el sitio de unión de dNTPs de la polimerasa viral durante la posterior adición de nucleótidos (23,24).

El ETV ha sido utilizado en el sistema de salud en Colombia desde el año 2007 como antiviral de primera línea en el tratamiento de la hepatitis B crónica, por su barrera genética a la resistencia antiviral, su eficacia, seguridad y escasos efectos secundarios (2,25). Sin embargo, existe la necesidad de esquemas de tratamiento a largo plazo, debido a que los resultados esperados con el tratamiento antiviral son principalmente el control de la replicación viral, reflejada en un carga viral de ADN indetectable y la normalización de los niveles de ALT y no la cura definitiva de la enfermedad, debido a que la reserva del ADN circular covalentemente cerrado (ADN ccc) en los hepatocitos no se ve afectada por la terapia antiviral y puede reactivar el proceso de replicación viral en caso de la suspensión del tratamiento, aumentando el riesgo de desarrollar mutaciones de resistencia (5).

La resistencia viral al tratamiento de Entecavir es un fenómeno que se ha descrito tanto en pacientes con tratamiento previo como en pacientes "naïve" (sin historia de tratamiento antiviral) a pesar de que estos últimos presentan alrededor del 1,2% de probabilidad de desarrollar resistencia a este medicamento luego de los 3 a 6 años de tratamiento, de acuerdo a ensayos clínicos y de cohorte realizados en diferentes poblaciones desde su aprobación en 2005 por la Food and Drug Administration (22,26–29).

Diversos estudios han permitido la caracterización de las mutaciones en el ORF P, específicamente en la región que codifica el dominio transcriptasa reversa (RT, por sus siglas en inglés), asociadas a la resistencia a ETV (30–33). Se han descrito la selección inicial de las mutaciones primaria rtM204V/I o rtL180M asociadas a resistencia al análogo de nucleósido lamivudina, utilizado también para el tratamiento de la hepatitis B crónica, seguida de las mutaciones secundarias rtT188, rtS202 o rtM250 (30,34). En estudios in vitro se ha encontrado la necesidad de la coexistencia de las mutaciones para que se dé una reducción significativa de la eficacia; es por esto que la monoterapia con ETV tiene baja tasa de resistencia viral en pacientes sin tratamiento previo con análogos de nucleósidos (35).

En este estudio se realizó la búsqueda de mutaciones asociadas a resistencia en el dominio RT de la polimerasa del VHB en 16 de muestras de suero de pacientes colombianos con diagnóstico de hepatitis B crónica sin tratamiento previo.

Materiales y métodos

Tipo de estudio

Se realizó un estudio descriptivo retrospectivo, cuya población de estudio se seleccionó de forma no probabilística y a conveniencia, dicha selección se dio bajo el criterio médico de los hepatólogos encargados Juan Carlos Restrepo y Mauricio Orrego; quienes amablemente remitieron a sus pacientes para la realización de este estudio.

Población de estudio

Se realizó un estudio con 6 muestras de suero obtenidas de pacientes con diagnóstico de hepatitis B crónica, definida por la presencia de HBsAg por más de 6 meses, de regiones como Chocó y Antioquia, atendidos en el Hospital Pablo Tobón Uribe y en la Clínica Las Vegas de Medellín durante el periodo 2021-2023. Además, se incluyeron 9 muestras de casos notificados de Hepatitis B al SIVIGILA durante el periodo 2015-2022 que corresponden a indígenas de los departamentos de Guaviare, La Guajira y Amazonas obtenidas en el marco del proyecto Caracterización serológica y molecular de la infección por el Virus de la Hepatitis B y Virus de la Hepatitis Delta en comunidades indígenas de Colombia (36) desarrollado por el grupo de Gastrohepatología y el grupo de Epidemiología de la Universidad de Antioquia. Los criterios de inclusión fueron: ser mayor de edad y tener diagnóstico de Hepatitis B crónica; no tener historia de tratamiento previo con antivirales (naïve) y aceptar de forma voluntaria hacer parte del estudio. Como criterio de exclusión se define la coinfección con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH).

Toma de muestra

Las muestras de sangre periférica de los pacientes con Hepatitis B crónica fueron obtenidas mediante punción venosa posterior a la firma del consentimiento informado y el diligenciamiento de la encuesta sobre factores sociodemográficos. El suero se obtuvo mediante centrifugación a 3500 rpm por 15 minutos. El suero obtenido se distribuyó en

alícuotas y se almacenó a -70°C para su posterior envío al Laboratorio de Gastrohepatología.

Extracción del ADN viral y amplificación de los ORF S y P del genoma de VHB

Para la extracción del ADN total a partir de las muestras de suero se utilizó un kit comercial QIAamp DNA Blood mini kit (QIAGEN, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante, con un volumen de elución final de 80 μl . El ADN obtenido se distribuyó en alícuotas de 20 μL y fueron almacenadas a -20°C en caja plástica para viales. El ADN obtenido se cuantificó por espectrofotometría (NanoDrop 2000- Thermo Scientific) considerando los ratios de absorbancia (260/280) y (260/230) entre los rangos 1,8-2 y 2,0-2,2, respectivamente, como indicadores de pureza aceptables. Para la PCR anidada del ORF S se utilizan los cebadores previamente descritos (37) YS1 - YS2 en la primera ronda (5'-GCGGGGTTTTTCTTGTTGA-3' y 5'- GGGACTCAAGATGTTGTACAG-3') y S3s - S3as para la segunda ronda (5'- TGCCTCATCTTCTTRTTGGTTCT-3') y (5'- CCCCWAWACCAVATCATCCATATA3'); estos cebadores amplifican la región del nucleótido 422 al nucleótido 758 con respecto al genoma del VHB de referencia NC_003977.2, que corresponde a un fragmento de 336 pb. Las condiciones de amplificación y ciclaje fueron adaptadas de protocolos previamente publicados en la literatura (37,38) y estandarizadas en el Grupo de Gastrohepatología de la Universidad de Antioquia. Las condiciones de la primera ronda de la PCR fueron: buffer 1X, MgCl_2 4mM (Thermo Scientific), dNTPs 0,2mM (Promega), cebadores YS1 y YS2 0,4 μM , 1,25U Taq DNA polimerasa (Thermo Scientific, USA), 5 μl de ADN y agua libre de nucleasas, para un volumen final de 25 μl . El ciclaje inició a 94°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 53°C durante 1 minuto, 72°C por 1:30 minutos y una extensión final a 72°C por 6 minutos, usando el termociclador C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad). Las condiciones de la segunda ronda fueron buffer 1X, MgCl_2 2mM (Thermo Scientific), dNTPs 0,2mM (Promega), cebadores S3a y S3as 0,4 μM , 1,25U Taq DNA polimerasa (Thermo Scientific) y 5 μL de producto de amplificación de la primera ronda. El ciclaje fue de 94°C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto y 15 segundos y 72°C por 1:30 minutos, y una extensión final de 72°C por 5

minutos. Para la PCR anidada del ORF P se utilizaron los cebadores diseñados por Bautista et al, 2023: HBF1 - HBR1 en la primera ronda (5'-CTGCTGGTGGCTCCAGTTC-3' y 5'-GCTCCAATTCTTTATAAGGGTCAATG-3') y HB F2 - HB R2 para la segunda ronda (5'-CATCAGGACTCCTAGGACCCCT-3') y (5'-TGCGTCAGCAAACACTTGGCA-3'); estos cebadores amplifican un fragmento de 1027pb que se ubica entre los nucleótidos 170 y 1196 con respecto al genoma de referencia NC_003977.2. La amplificación se realizó según el protocolo publicado por Bautista-Amorocho y colaboradores (39). La amplificación se realizó según las siguientes condiciones: cebadores HBF1 y HBR1 0,2 µM, 1X OneTaq Hot Start Master Mix (New England BioLabs, Inglaterra), agua libre de nucleasas y 11,5 µl de ADN para un volumen final de 25 µl. El ciclaje fue de 94°C por 30 segundos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 20 segundos, 60°C por 30 segundos, 68°C por 1:50 minutos y una extensión final a 68°C por 5 minutos, usando el termociclador C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad). Las condiciones de la segunda ronda fueron: cebadores HBF2 y HBR2 0,2 µM, 1X OneTaq Hot Start Master Mix (New England BioLabs) y 2 µl de producto de amplificación de la primera ronda para un volumen final de 25 µl. El ciclaje fue de 94°C por 30 segundos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 20 segundos, 60°C por 30 segundos, 68°C por 1:10 minutos y una extensión final a 68°C por 5 minutos, usando el termociclador C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad). Los productos de amplificación de los ORF S y P del genoma del VHB de 336 pb y 1027 pb, respectivamente se confirmaron con un segundo ensayo de PCR utilizando una enzima de alta fidelidad (Taq DNA polymerase, Thermo Scientific) y se visualizaron mediante electroforesis en buffer TAE 1X a 100 voltios por 1 hora en gel de agarosa al 1,5% teñido con bromuro de etidio (BrEt 0,5mg/mL) al 0,1% v/v antes de la corrida. Para la visualización se utilizó un marcador de peso molecular de 100pb (Hyperladder, Thermo Scientific) o un marcador de 1kb (Hyperladder, Bionline). En todos los ensayos de amplificación se utilizó como control negativo agua libre de nucleasas y como control positivo ADN de la muestra HPTU-01-005, obtenida de un caso de hepatitis B con carga viral conocida. Los geles se visualizaron con el equipo UVPV2 Transiluminator (UVP). Para la PCR en tiempo real (q-PCR) se utilizó un volumen final de reacción de 25µL con SYBR Mix 12,5 ul (Thermo Scientific), cebadores S3a y S3as a 0,3 µM, y 2 µL de ADN. El ciclaje fue 50°C por 2 minutos y 95°C por 10 minutos, seguido

de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 50°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos, y una extensión final de 72°C por 1 minuto. Se amplifica un fragmento de 336 pb (40).

Análisis filogenético

Los amplicones obtenidos de los ensayos fueron enviados a secuenciar a MacroGen Inc (Seoul, Korea) utilizando el método de dideoxinucleótidos automatizado de Sanger (BigDye™ terminator). Las secuencias se verificaron con BLASTN (NCBI). Se diseñó un dataset con las secuencias obtenidas y las secuencias representativas de todos los genotipos del VHB disponibles en GenBank. El alineamiento se realizó con Clustal W en BioEdit. Para determinar el modelo de sustitución que más se ajustara, se utilizó MEGA 11. Posteriormente, se realizaron análisis filogenéticos por el método de Máxima Verosimilitud con un Bootstrap de 1000 réplicas.

Análisis de mutaciones de resistencia al antiviral Entecavir

Para los análisis de variantes genéticas en el ORF Pol, se realizó el alineamiento de la secuencia de aminoácidos a partir de las secuencias de ADN obtenidas (software MEGA 11) por secuenciación. Se buscó identificar variantes y mutaciones asociadas con la resistencia a Entecavir. Adicionalmente, se utilizaron las herramientas bioinformáticas HIV-grade HBV Drug Resistance Interpretation (DRI) y Geno2pheno [HBV] (G2P) para la identificación de mutaciones previamente reportadas en estas regiones del genoma viral.

Consideraciones éticas

El estudio y los investigadores se acogieron a las normas éticas internacionales consignadas en la Declaración de Helsinki, la resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud y Protección Social y el decreto 2378 de 2008, los cuales establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud y las buenas prácticas clínicas. Todos los participantes hicieron parte del estudio de manera voluntaria

accediendo a firmar un consentimiento informado previo al diligenciamiento de la encuesta y toma de muestra. La investigación contó con el aval del comité de ética del Hospital Pablo Tobón Uribe mediante el acta 14/2021.

Objetivos

Objetivo general

Caracterizar las mutaciones del Virus de la Hepatitis B asociadas a resistencia a Entecavir en muestras de pacientes con hepatitis B crónica sin tratamiento previo.

Resultados

Características sociodemográficas

En total se incluyeron muestras obtenidas de 16 pacientes con diagnóstico de Hepatitis B crónica sin historia de tratamiento antiviral. Del total, 7 pacientes, 3 de ellos procedentes del departamento de Antioquia (18,75%) y 4 del departamento del Chocó (25%) fueron referidos por los hepatólogos de la ciudad. Además, se incluyeron muestras obtenidas de 9 pacientes notificados al SIVIGILA, 5 del departamento del Amazonas (31,25%), 3 del departamento del Guaviare (18,75%) y 1 del departamento de La Guajira (6,25%), todos pertenecientes a comunidades indígenas. Estas muestras fueron obtenidas en el marco de un proyecto de investigación de la infección por VHB en comunidades indígenas en 4 departamentos del país (40).

La proporción de hombres fue de 56,25%, con una mediana de edad de 41 años (DS \pm 16,0). En cuanto al nivel de escolaridad, el 31,25% cuenta con estudios superiores y el 50% no tiene familiares con Hepatitis B (Tabla 1).

Tabla 1. Características sociodemográficas de los pacientes con diagnóstico de hepatitis B sin historia de tratamiento, incluidos en el estudio.

Características	Pacientes con HBC sin tratamiento previo
Mediana edad, años mujeres/hombres (\pm DS)	33/41 (12/16)
Sexo femenino/masculino, n (%)	7/9 (43,75/56,25)
Proveniencia	n (%)
Antioquia	3 (18,75)
Amazonas	5 (31,25)
Chocó	4 (25)

Guaviare	3 (18,75)
La Guajira	1 (6,25)
Escolaridad	n (%)
Primaria	4 (25)
Secundaria	3 (18,75)
Superior	5 (31,25)
Sin dato	4 (25)
Familiares con Hepatitis B	n (%)
Si/No	1/8 (6,25/50)
No sabe	2 (12,5)
Sin dato	5 (31,25)

Detección del genoma de VHB

En 3/16 (18,75%) de las muestras se amplifica el ORF S del VHB (422 nt -758 nt) (Figura 1) y en 4/16 (25%) de las muestras se amplifica el ORF P del VHB (170-1196) (Figura 2). Las amplificaciones se confirmaron con un segundo ensayo de PCR utilizando una enzima de alta fidelidad (Taq DNA polymerase, Thermo Scientific).

Figura 1. Amplificación del ORF S del VHB (422nt-758nt) a partir de muestras de suero de pacientes con diagnóstico de hepatitis B crónica sin historia de tratamiento. Gel de agarosa al 1,5%. MW: Marcador de peso molecular de 100pb. Carril 1 Control negativo de extracción. Carril 2 Control negativo de PCR. Carril 3-7 Muestras 01-N, 04-N, 06-N, 08-N, 10—N. Carril 8 Control positivo.

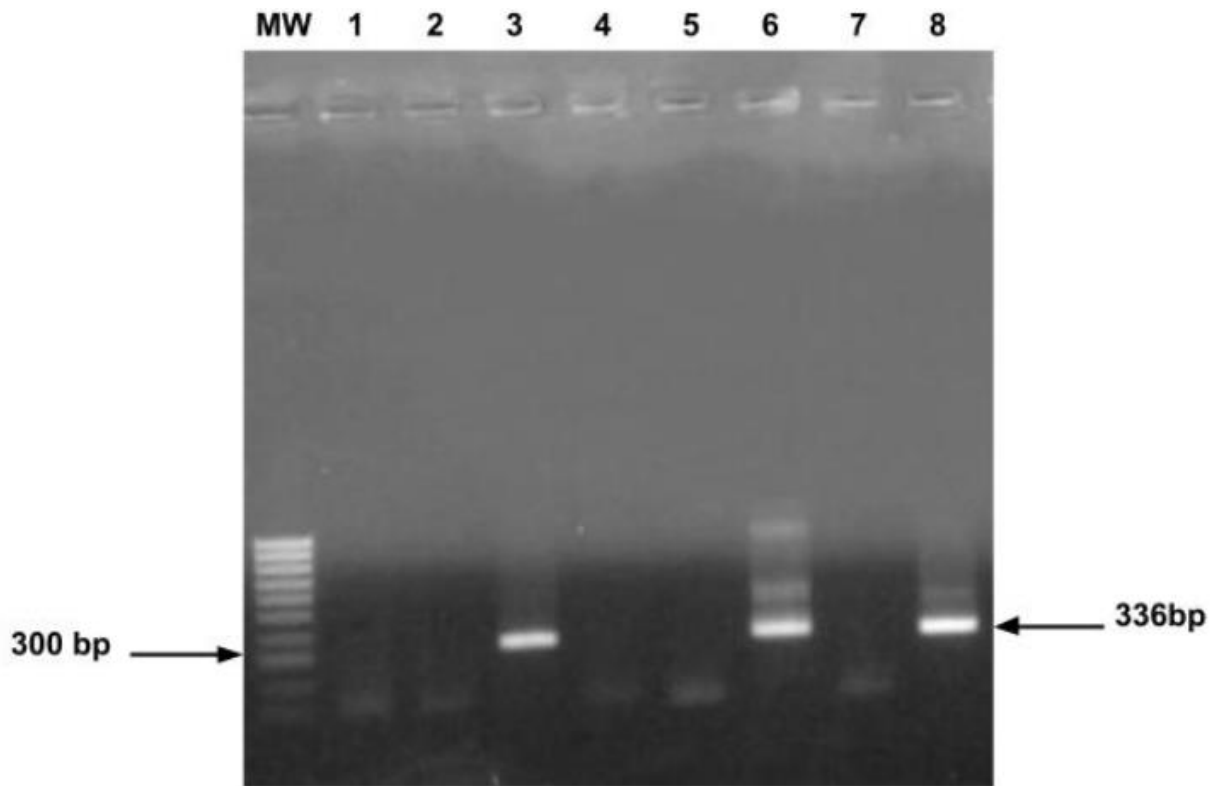
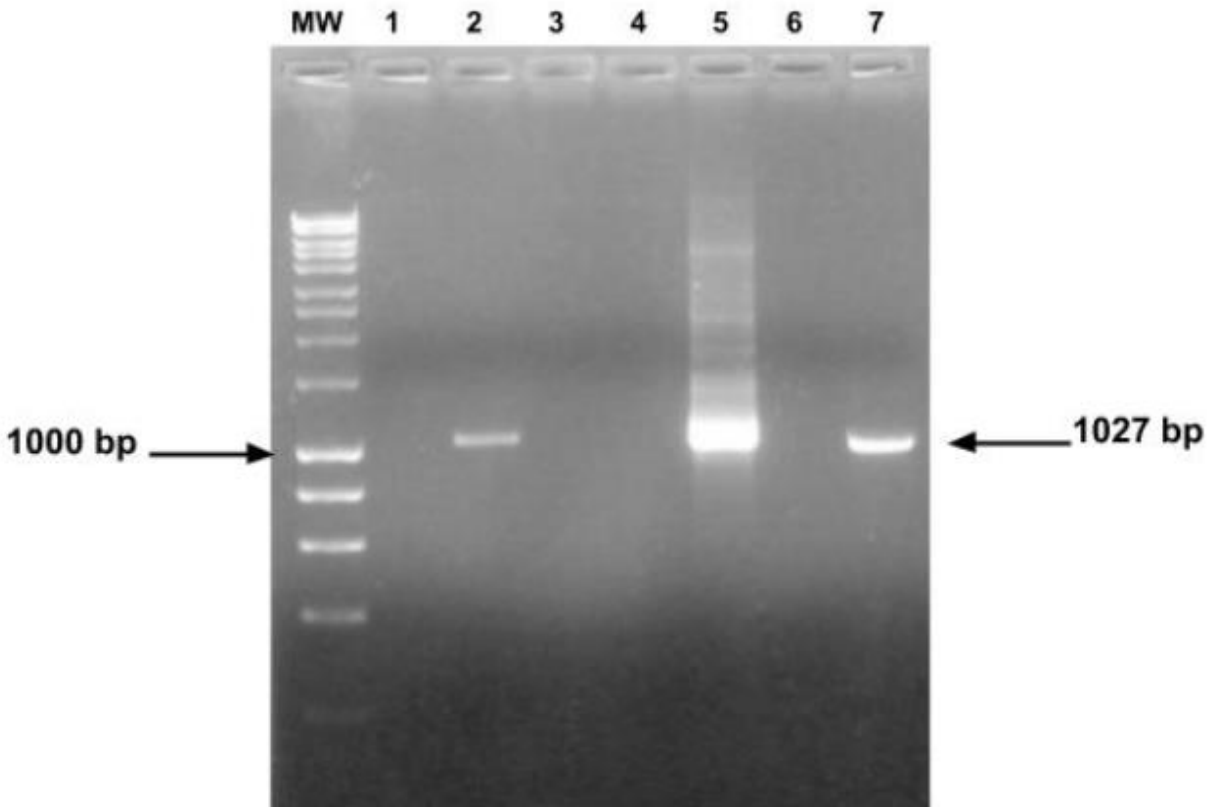


Figura 2. Amplificación del ORF P del VHB (170nt-1196nt) a partir de muestras de suero de pacientes con diagnóstico de hepatitis B crónica sin historia de tratamiento. Gel de agarosa al 1,5%. MW: Marcador de peso molecular de 1kb. Carril 1 Control negativo de PCR. Carril 2-6 Muestras 01-N, 04-N, 06-N, 08-N, 10-N. Carril 8 Control positivo.



En 10/16 muestras se amplifica el ORF S del VHB mediante q-PCR. Los resultados positivos se confirmaron comparando los picos de la curva de Melting de las muestras, con los picos de los controles positivos que fueron muestras con amplificación del ORF S y ORF P del VHB por PCR anidada.

Marcadores serológicos y hepáticos

Según los datos registrados en la historia clínica o los datos del estudio, el 87,5% (14/16) y el 12,5% (2/16) de los casos eran positivos para HBsAg y/o HBeAg, respectivamente (Tabla 2). Según la información disponible en la historia clínica, el rango del nivel sérico de AST en 15 muestras fue de 9,6-131,7 UI/mL con promedio de 32,78 UI/ml y desviación estándar de 29,7; y el rango de ALT fue de 9,4-53,4 UI/mL con promedio de 26,52 UI/ml y desviación estándar de 13,6.

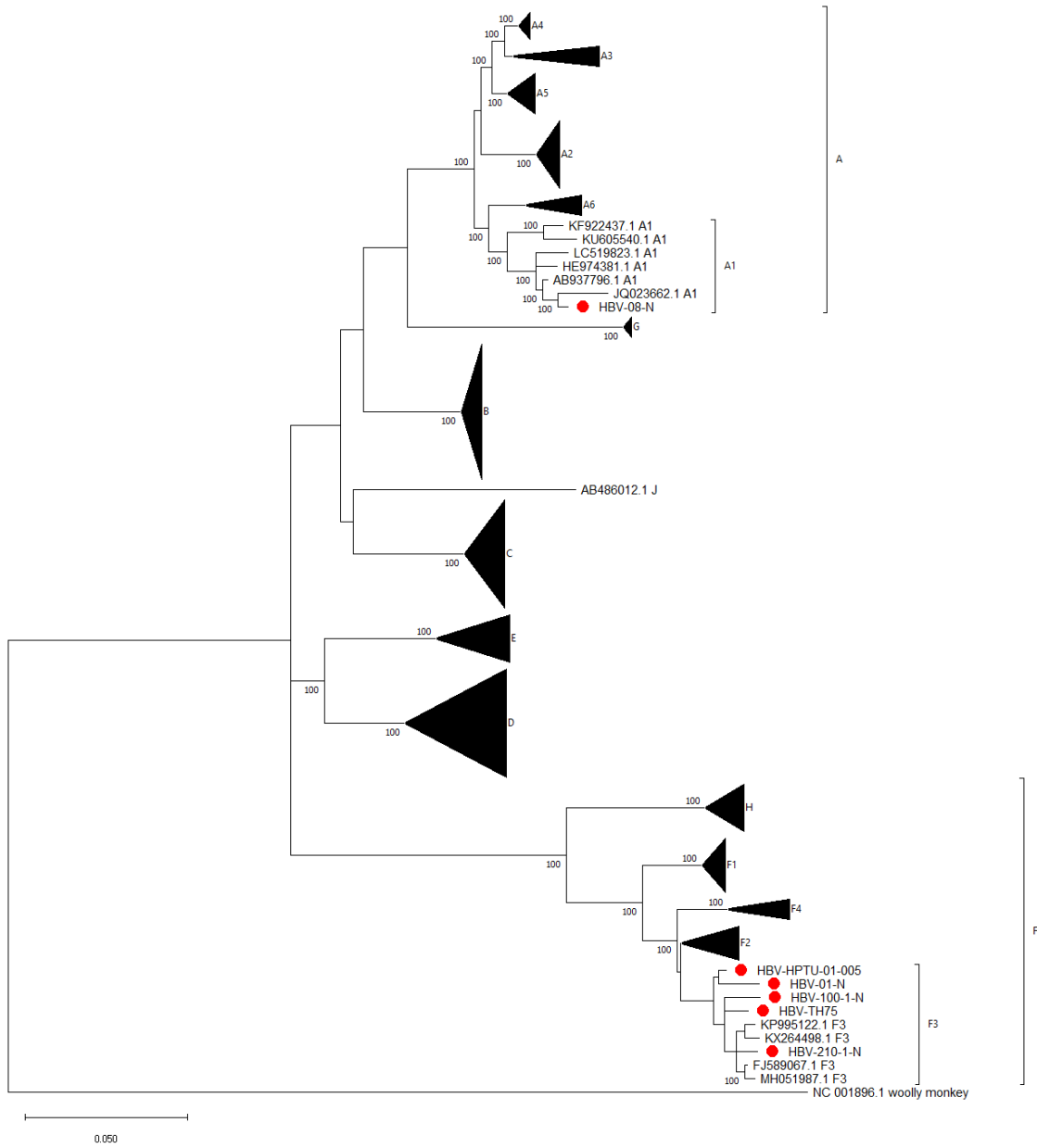
Tabla 2. Marcadores serológicos de los casos de hepatitis B crónica sin historia de tratamiento, incluidos en el estudio.

Marcador	Positivo n (%)	Negativo n (%)	Sin datos n (%)
HBsAg	14 (87,5)	1 (6,25)	1 (6,25)
HBeAg	2 (12,5)	5 (31,25)	9 (56,25)
Anti- HBc IgM	0	9 (56,25)	7 (43,75)
Anti-HBc Total	9 (56,25)	0	7 (43,75)

Análisis in silico

Se determinó en el programa MEGA 11 que el mejor modelo de sustitución para el dataset construido es el modelo Máxima Verosimilitud con distribución GTR G+I. De las secuencias obtenidas del ORF P (1027 pb), 3 se agruparon en el genotipo F, subgenotipo F3, que corresponden a pacientes proveniente de los departamentos de Antioquia, Guaviare y La Guajira y 1 secuencia en el genotipo A, subgenotipo A1 de un paciente del departamento del Chocó (Figura 3).

Figura 3. Análisis filogenético del ORF Pol del VHB.



Nota: Análisis por Máxima Verosimilitud en MEGA 11 con Bootstrap de 1000 con el modelo GTR G+I.

Se analizaron cada una de las secuencias obtenidas del ORF P del VHB, utilizando el genoma de referencia NC_003977.2, para identificar posibles mutaciones primarias y/o secundarias asociadas a resistencia a ETV; sin embargo, no se hallaron mutaciones de este tipo en las secuencias.

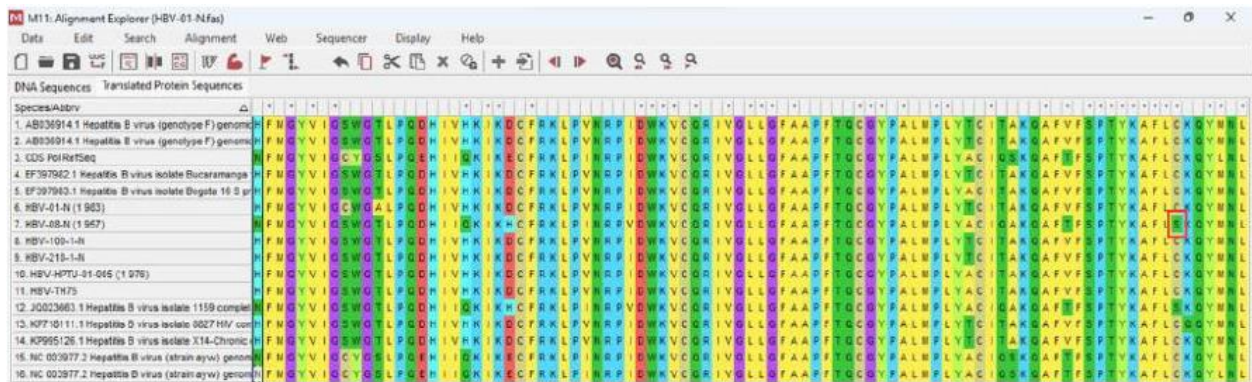
Posteriormente, se realizó un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de cada muestra, para verificar de forma manual la presencia de posibles cambios de aminoácidos. En el dominio RT del ORF Pol del VHB se encontraron los cambios de aminoácidos rtH35Q y rtS259A en la muestra 01-N; rtT38A, rtI26Y, rtF151Y, rtR153W, rtE271H y rtC332S en la muestra 08-N y en las muestras 100-1-N y 210-1-N se encontraron los cambios rtD134Y y rtN139H, respectivamente (Tabla 3 y Figura 4).

Tabla 3. Sustituciones en el dominio RT del ORF P del VHB identificadas en muestras de pacientes con diagnóstico de hepatitis B crónica sin historia de tratamiento antiviral.

Código de muestra	Cambios de aminoácidos en región RT del ORF P del VHB	Departamento	Edad (años)	Sexo	Genotipo	HBeAg	HBsAg	ALT (UI/ml)	AST (UI/ml)
01-N	rtH35Q, rtS259A	Antioquia	57	M	F3	Positivo	Positivo	43	23
08-N	rtT38A, rtI26Y, rtF151Y, rtR153W, rtE271H, rtC332S	Chocó	55	F	A1	Negativo	Positivo	19	21
100-1-N	rtD134Y	Guaviare	55	M	F3	Negativo	Positivo	53,4	131,7
210-1-N	rtN139H	La Guajira	19	M	F3	Positivo	Positivo	36,9	37

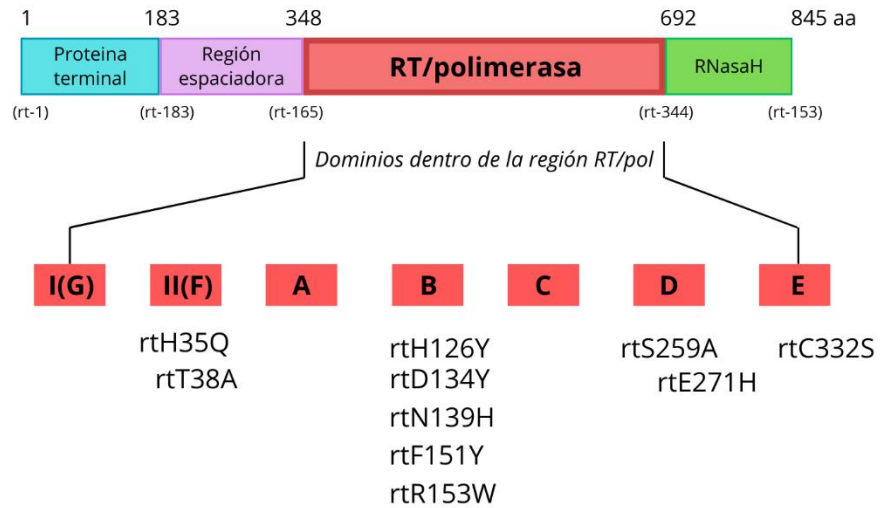
Nota: Como referencia se utilizó la secuencia NC_003977.2

Figura 4. Alineamiento de secuencias de aminoácidos en MEGA 11 de las muestras secuenciadas.



Nota: El cambio rtC332S de la muestra 08-N aparece en recuadro rojo.

Figura 5. Diagrama representativo del ORF P del Virus de la Hepatitis B.



Nota: Adaptado de Zoulim, et al.

Discusión

El desarrollo de hepatopatías terminales como cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular (CHC), son la principal preocupación de la infección crónica por el VHB. De acuerdo con la OMS, en 2022 la infección por Hepatitis B fue la causa de 1 millón de muertes alrededor del mundo, principalmente asociada a hepatopatías terminales (1).

Los análogos de nucleósidos Tenofovir disoproxil fumarato (TDF) y ETV son los regímenes de primera línea recomendados por la OMS para el tratamiento de pacientes con HBC (1). En Colombia, desde el año 2017 (41,42) el antiviral aprobado por el registro sanitario INVIMA, incluido dentro del Plan Obligatorio de Salud (POS) y de elección para el tratamiento de la Hepatitis B en adultos ha sido ETV, a pesar de que desde el año 2012 otros países de Latinoamérica han pasado gradualmente al uso del TDF (43–46). En este contexto, el presente estudio se planteó y recibió la aprobación para su desarrollo por el programa CODI de la Universidad de Antioquia. Sin embargo, en el año 2021 el Ministerio de Salud de Colombia inició el cambio progresivo al antiviral TDF para el manejo de los casos de HBC, principalmente por carecer de resistencia cruzada con otros antivirales, a la similitud en efectividad y seguridad con ETV (27) y a la reducción de los costos aproximado de 141.800 millones de pesos por año, lo que representaría una disminución del costo superior al 50% y un aumento en la cobertura (47).

En el presente estudio no se encontraron mutaciones primarias o secundarias de resistencia a ETV en las posiciones de mutación clásica rt180, rt202, rt204 y rt250. Aunque, se identificaron 10 cambios de aminoácidos en la secuencia del dominio RT de la polimerasa viral (rtH35Q, rtS259A, rtT38A, rtH126Y, rtF151Y, rtR153W, rtE271H, rtC332S, rtD134Y y rtN139H) en las 4 muestras en las que se amplificó ORF P del VHB (Figura 5).

El 50% de las posiciones de los cambios de aminoácidos se ubicaron en los interdominios A-B (rt75-rt175aa) (48) (rtH126Y, rtD134Y, rtN139H, rtF151Y y rtR153W) que se superponen al determinante “a” del HBsAg (s124-s147aa) resultando así los cambios de aminoácidos en el ORF S: sG118Y, sL131H, sG143Y y sG145W. Ninguno

de los cambios aminoacídicos hallados estaba dentro del motivo YMDD altamente conservado de la región catalítica de la transcriptasa reversa del VHB. Es importante destacar que las secuencias del ORF P y S del VHB se superponen, por lo que las sustituciones en el ORF P podrían afectar la secuencia del ORF S y por tanto la estructura del antígeno de superficie; alterando así también la interacción del virus con el receptor de la célula blanco y la efectividad de la vacuna (28).

La ausencia de mutaciones primarias y/o secundarias de resistencia a ETV en este estudio (0%, 0/16), son similares a los descritos por estudios similares realizados en Brasil (0%, 0/100) (46), Italia (1,6%, 11/702) (49) y EE.UU (0,84%, 4/472) (50). Sin embargo, algunos autores en China (51) y en Brasil (52) reportan frecuencias de 8,9% y 6% respectivamente. Lo anterior se puede explicar por la distribución geográfica y situación epidemiológica de la infección por VHB de cada región (53). En Colombia, la endemia es moderada con un patrón de incidencia heterogéneo que va desde 2,4 hasta 29,8 por 100.000 habitantes según el informe del Instituto Nacional de Salud entre el periodo 2010-2021(54).

En el país, se han realizado dos estudios similares, en 2018 por Peláez-Carvajal (10), en el que describieron las mutaciones L180M y M204V asociadas con resistencia a Telbivudina (LdT), Lamivudina (3TC) y ETV y la mutación I169L asociada con resistencia a ETV en muestras remitidas al INS para confirmación de diagnóstico de infección por el VHB. En 2018, Cortés y Navas (International HBV Meeting, Taormina Italy) describieron las mutaciones rtL80I, rtM204V, rtQ215H, rtA200V, rtW/R153Q, rtD134N y rtN139H en muestras de pacientes asintomáticos y en donantes de sangre.

La mutación rtN139H también ha sido descrita por Kim et al (55), en un estudio de cohorte en el que comparan frecuencias y tipos de mutaciones en la secuencia que codifica el dominio RT de la polimerasa del VHB en pacientes coreanos sin historia de tratamiento con Hepatitis B crónica o carcinoma hepatocelular (CHC). Los autores encontraron una asociación significativa ($p < 0,001$) entre las mutaciones rtL80I, rtN139K/T/H y rtM204I/V y la resistencia a los análogos de nucleósidos y a la progresión de la enfermedad hepática, particularmente en el desarrollo de hepatocarcinoma,

posiblemente debido al aumento del fitness del VHB o a la alteración de la eficacia de la respuesta inmune que facilita la persistencia del virus (55).

Por otro lado, los cambios aminoacídicos rtH126Q/Y, rtT38A y en rt153 (53) y rt134 (56) se describieron en estudios realizados con pacientes chinos con hepatitis B crónica sin historia de tratamiento con análogos de nucleósidos. Y el cambio rtF151Y/L (57) fue descrito en pacientes tratados con adefovir (ADV) y telbivudina (LdT).

Los cambios rtH35Q, rtS259A y rtC332S no se encontraron reportados previamente en la literatura, siendo su importancia biológica o clínica aún desconocida.

La alta tasa de generación de sustituciones en el genoma del VHB puede propiciar la aparición espontánea de mutaciones de resistencia a lamivudina, las cuales son mutaciones primarias para el desarrollo de resistencia a ETV; aunque en principio en niveles indetectables por métodos de biología molecular y bioinformática.

Cuando se inicia la terapia con ETV en un paciente, es importante realizar un monitoreo cuidadoso de marcadores bioquímicos y serológicos que pudieran sugerir resistencia al antiviral, puesto que el tratamiento antiviral puede ejercer la presión de selección necesaria de estas mutantes para el aumento de su proliferación y posterior acumulación de otras sustituciones que sumado a otros factores como la carga viral del VHB previo al tratamiento, la rapidez de la supresión viral, la duración y la adherencia al tratamiento, pueden llevar al desarrollo total de resistencia a ETV (55,58).

El genotipo F ha sido reportado en diversos estudios como el genotipo predominante en población colombiana (14, 19, 49, 59), lo que concuerda con los resultados de este estudio. El subgenotipo F3 se ha reportado en el departamento del Guaviare (10), en donantes de sangre de la región andina (11, 14, 60) y en secuencias aisladas de tejido hepático de pacientes con cirrosis y/o CHC atendidos en el Hospital Pablo Tobón Uribe en Medellín (15,17). El sub genotipo A1 ha sido reportado por Alvarado-Mora (20) en población afro del departamento del Chocó, lo que concuerda con la etnia y lugar de procedencia del paciente 08-N en la que se identificó el genotipo A, subgenotipo A1.

Este estudio presenta algunas limitaciones, tales como la selección de la población de estudio, realizada de forma no aleatoria y a conveniencia según el criterio médico de los hepatólogos que refirieron a sus pacientes para la participación en la investigación. El tamaño de la muestra analizado también es una limitación. Un mayor número de muestras podría proporcionar una imagen más completa y representativa de las mutaciones de resistencia en pacientes colombianos. Por otra parte, la muestra de los pacientes indígenas podría ser considerada representativa de los casos notificados en el periodo de estudio; sin embargo, estos resultados no pueden ser extrapolados a otros grupos poblacionales por tener un comportamiento epidemiológico diferente, con tasas de prevalencia superiores a la tasa nacional (13,40).

A su vez, se contó con información limitada sobre los antecedentes clínicos completos de todos los participantes. Factores como fecha del diagnóstico de infección por VHB, vacunación, carga viral y coinfección con Virus de la Hepatitis Delta podrían influir en la aparición y detección de mutaciones de resistencia.

La obtención de una única muestra de sangre limita la capacidad para observar la evolución dinámica del virus en respuesta al tratamiento antiviral. El seguimiento a largo plazo permitiría detectar la aparición de mutaciones de resistencia que pueden surgir naturalmente en el genoma de VHB, como se mencionó anteriormente. Además, estudios longitudinales proporcionarán datos críticos sobre los mecanismos de selección y desarrollo de mutaciones de resistencia, mejorando la comprensión de los procesos moleculares involucrados. Ampliar esta investigación mediante un monitoreo continuo de adherencia al tratamiento y marcadores serológicos y bioquímicos y múltiples puntos de muestreo podría favorecer la creación de estrategias clínicas más efectivas para prevenir la resistencia antiviral en los pacientes con Hepatitis B crónica.

La detección cualitativa del genoma del VHB en 10/16 muestras mediante q-PCR y de 4/26 muestras amplificadas por PCR anidada puede atribuirse a carga viral por debajo del límite de detección de esta técnica según descrito por Montoya M. et al, (100 copias/ul) (36). Una carga viral inferior a 2000 copias/ml es un hallazgo usual en el perfil de los casos de Hepatitis B crónica incluidos en el estudio.

Aunque la PCR y la secuenciación directa son técnicas robustas y ampliamente utilizadas, podrían no ser lo suficientemente sensibles para detectar mutaciones de resistencia presentes en subpoblaciones virales minoritarias. Técnicas más avanzadas y sensibles como la Secuenciación de Próxima Generación (NGS por sus siglas en inglés), ofrecen una mayor profundidad de secuenciación y la capacidad de detectar variantes de baja frecuencia que podrían pasar desapercibidas con los métodos tradicionales.

Conclusiones

En conclusión, en el presente estudio no se encontraron mutaciones primarias y/o secundarias de resistencia a ETV en muestras provenientes de pacientes con infección crónica sin historia previa de tratamiento antiviral. Aunque sí se describieron 10 cambios de aminoácidos en la región RT del ORF P del VHB en las 4 muestras secuenciadas. Así pues, los resultados de este estudio contribuyen a ampliar el conocimiento de la variabilidad genética y epidemiología molecular del VHB en Colombia y destacan la necesidad de investigaciones futuras.

Agradecimientos

Al Hospital Pablo Tobón Uribe, la Clínica Las Vegas y a la Universidad de Antioquia.

Declaración de conflicto de intereses

Ninguno declarado por los autores.

Financiación

Este estudio fue financiado por el Comité para el Desarrollo de la Investigación (CODI) de la Universidad de Antioquia.

Referencias

1. World Health Organization. Global hepatitis report 2024: action for access in low- and middle-income countries. [Internet]. 2024. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240091672>
2. Hepatitis B [Internet]. World Health Organization. 2024. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>
3. Wu W, Watts NR, Cheng N, Huang R, Steven AC, Wingfield PT. Expression of quasi-equivalence and capsid dimorphism in the Hepadnaviridae. Haliloglu T, editor. PLOS Comput Biol. 20 de abril de 2020; 16(4):e1007782.
4. Alcaraz Soriano MJ. VIRUS DE LA HEPATITIS B: ESTRUCTURA GENÓMICA Y MARCADORES CLÍNICOS. Control Calidad SEIMC; 1998.
5. Simmonds P, Midgley S. Recombination in the Genesis and Evolution of Hepatitis B Virus Genotypes. J Virol. 15 de diciembre de 2005; 79(24):15467-76.
6. Moreno D, Alegre F, García-González N. Virología, epidemiología y mecanismos de transmisión del VHB. An Sist Sanit Navar [Internet]. 2004 [citado 8 de julio de 2022]; 27. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272004000400002&lng=en&nrm=iso&tlng=en
7. Liang TJ. Hepatitis B: The virus and disease. Hepatology. Mayo de 2009; 49(S5):S13-21.
8. Sunbul M. Hepatitis B virus genotypes: Global distribution and clinical importance. World J Gastroenterol. 2014; 20(18):5427.
9. Forero-Castro N. Identificación de genotipos del virus de la hepatitis B y mutaciones en los genes P y S, a partir de muestras de sueros procedentes de treinta y dos departamentos de Colombia 2002-2014. Universidad El Bosque [Internet]. 2017;

Disponible en:

https://repositorio.unbosque.edu.co/bitstream/handle/20.500.12495/1624/Forereo_Castro_Nidia_Janeth_2017.pdf?sequence=1&isAllowed=y

10. Peláez-Carvajal D, Forero NJ, Escalante-Mora M, Laiton-Donato K, Usme-Ciro JA. Variabilidad genética en regiones codificantes del antígeno de superficie y el dominio de la transcriptasa inversa de la polimerasa del virus de la hepatitis B, Colombia, 2002-2014. *Biomédica*. 1 de agosto de 2018; 38:37-50.

11. Ríos-Ocampo WA, Cortes-Mancera F, Olarte JC, Soto A, Navas MC. Occult Hepatitis B virus infection among blood donors in Colombia. *Virol J*. diciembre de 2014; 11(1):206.

12. Jaramillo CM, de La Hoz F, Porras A, di Filippo D, Choconta-Piraquive LA, Payares E, et al. Characterization of hepatitis B virus in Amerindian children and mothers from Amazonas State, Colombia. Roques P, editor. *PLOS ONE*. 10 de octubre de 2017; 12(10):e0181643.

13. di Filippo Villa D, Cortes-Mancera F, Payares E, Montes N, de la Hoz F, Arbeláez MP, et al. Hepatitis D virus and hepatitis B virus infection in Amerindian communities of the Amazonas state, Colombia. *Virol J*. diciembre de 2015; 12(1):172.

14. Alvarado Mora MV, Romano CM, Gomes-Gouvêa MS, Gutiérrez MF, Botelho L, Carrilho FJ, et al. Molecular characterization of the Hepatitis B virus genotypes in Colombia: A Bayesian inference on the genotype F. *Infect Genet Evol*. Enero de 2011; 11(1):103-8.

15. Rendón JC, Cortes-Mancera F, Restrepo-Gutiérrez JC, Hoyos S, Navas MC. Molecular characterization of occult hepatitis B virus infection in patients with end-stage liver disease in Colombia. Chemin I, editor. *PLOS ONE*. 7 de julio de 2017; 12(7):e0180447.

16. Bautista-Amorocho H, Castellanos-Domínguez YZ, Rodríguez-Villamizar LA, Velandia-Cruz SA, Becerra-Peña JA, Farfán-García AE. Epidemiology, Risk Factors and Genotypes of HBV in HIV-Infected Patients in the Northeast Region of Colombia: High Prevalence of Occult Hepatitis B and F3 Sub genotype Dominance. Blackard J, editor. *PLoS ONE*. 2 de diciembre de 2014; 9(12):e114272.

17. Cortes-Mancera F, Loureiro CL, Hoyos S, Restrepo JC, Correa G, Jaramillo S, et al. Etiology and Viral Genotype in Patients with End-Stage Liver Diseases admitted to a Hepatology Unit in Colombia. *Hepat Res Treat*. 20 de septiembre de 2011; 2011:1-10.
18. Alvarado Mora MV, Romano CM, Gomes-Gouvea MS, Gutiérrez MF, Carrilho FJ, Pinho JRR. Molecular epidemiology and genetic diversity of hepatitis B virus genotype E in an isolated Afro-Colombian community. *J Gen Virol*. 1 de febrero de 2010; 91(2):501-8.
19. Devesa M, Loureiro CL, Rivas Y, Monsalve F, Cardona N, Duarte MC, et al. Sub genotype diversity of hepatitis B virus American genotype F in Amerindians from Venezuela and the general population of Colombia. *J Med Virol*. Enero de 2008; 80(1):20-6.
20. Alvarado-Mora MV, Romano CM, Gomes-Gouvêa MS, Gutiérrez MF, Carrilho FJ, R Pinho JR. Phylogenetic analysis of complete genome sequences of hepatitis B virus from an Afro-Colombian community: presence of HBV F3/A1 recombinant strain. *Virol J*. diciembre de 2012; 9(1):244.
21. Ministerio de Salud y Seguridad Social. PLAN NACIONAL DE CONTROL DE LAS HEPATITIS VIRALES 2014 - 2017.
22. Liu Y, Zhou Y, Li X, Niu M, Chen R, Shao J, et al. Hepatitis B virus mutation pattern rtL180M+A181C+M204V may contribute to entecavir resistance in clinical practice. *Emerg Microbes Infect*. 1 de enero de 2019; 8(1):354-65.
23. Langley DR, Walsh AW, Baldick CJ, Eggers BJ, Rose RE, Levine SM, et al. Inhibition of Hepatitis B Virus Polymerase by Entecavir. *J Virol*. 15 de abril de 2007; 81(8):3992-4001.
24. Seeger C, Mason WS. Molecular biology of hepatitis B virus infection. *Virology*. Mayo de 2015; 479-480:672-86.
25. Almeida PH, Matielo CEL, Curvelo LA, Rocco RA, Felga G, Della Guardia B, et al. Update on the management and treatment of viral hepatitis. *World J Gastroenterol*. 21 de junio de 2021; 27(23):3249-61.

26. E. Quirós-Roldán, M. Airoidi, F. Moretti, G. Carosi. Bases moleculares de resistencia de VHB. *Rev Diagn Biol.* 2001; 50(4):204-6.
27. Ministerio de Salud y Seguridad Social. Guía de práctica clínica: Diagnóstico tratamiento de Hepatitis B crónica. 2016.
28. Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B Virus Resistance to Nucleos (t) ide Analogues. *Gastroenterology.* Noviembre de 2009; 137(5):1593-1608.e2.
29. Suzuki F, Akuta N, Suzuki Y, Yatsuji H, Sezaki H, Arase Y, et al. Selection of a virus strain resistant to entecavir in a nucleoside-naive patient with hepatitis B of genotype H. *J Clin Virol.* Junio de 2007; 39(2):149-52.
30. Villet S, Ollivet A, Pichoud C, Barraud L, Villeneuve JP, Trépo C, et al. Stepwise process for the development of entecavir resistance in a chronic hepatitis B virus infected patient. *J Hepatol.* Marzo de 2007; 46(3):531-8.
31. Hayashi S, Murakami S, Omagari K, Matsui T, Iio E, Isogawa M, et al. Characterization of novel entecavir resistance mutations. *J Hepatol.* Septiembre de 2015; 63(3):546-53.
32. Yamada N, Sugiyama R, Nitta S, Murayama A, Kobayashi M, Okuse C, et al. Resistance mutations of hepatitis B virus in entecavir-refractory patients. *Hepatol Commun.* Abril de 2017; 1(2):110-21.
33. Walsh AW, Langley DR, Colonno RJ, Tenney DJ. Mechanistic Characterization and Molecular Modeling of Hepatitis B Virus Polymerase Resistance to Entecavir. Tavis JE, editor. *PLoS ONE.* 12 de febrero de 2010; 5(2):e9195.
34. Lampertico P, Agarwal K, Berg T, Buti M, Janssen HLA, Papatheodoridis G, et al. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* Agosto de 2017; 67(2):370-98.
35. Terral NA, Lok ASF, McMahon BJ, Chang KM, Hwang JP, Jonas MM, et al. Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance. *Hepatology.* Abril de 2018; 67(4):1560-99.

36. Montoya Guzmán M. Caracterización serológica y molecular de la infección por el Virus de la Hepatitis B y Virus de la Hepatitis Delta en comunidades indígenas de Colombia. [Medellín, Antioquia]: Universidad de Antioquia; 2022.
37. Baldick CJ, Tenney DJ, Mazzucco CE, Eggers BJ, Rose RE, Pokornowski KA, et al. Comprehensive evaluation of hepatitis B virus reverse transcriptase substitutions associated with entecavir resistance. *Hepatology*. Mayo de 2008; 47(5):1473-82.
38. Sunbul M. Hepatitis B virus genotypes: Global distribution and clinical importance. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(18):5427.
39. Bautista-Amorocho H, Silva-Sayago JA, Picón-Villamizar J. High frequency of Lamivudine and Telbivudine resistance mutations in hepatitis B virus isolates from human immunodeficiency virus co-infected patients on highly active antiretroviral therapy in Bucaramanga, Colombia. *Front Microbiol*. 24 de julio de 2023; 14:1202342.
40. Montoya-Guzmán M, Martínez J, Castro-Arroyave D, Rojas C, Navas MC. Epidemiology and Genetic Diversity of Hepatitis B Virus and Hepatitis Delta Virus Infection in Indigenous Communities in Colombia. *Microorganisms*. 3 de julio de 2023; 11(7):1739.
41. Ministerio de Salud y Protección Social. COMPARACIÓN ENTRE EL LISTADO DE MEDICAMENTOS ESENCIALES DE LA OMS NÚMERO 20 Y EL LISTADO DE MEDICAMENTOS CUBIERTOS POR EL PLAN DE BENEFICIOS EN SALUD CON CARGO A LA UNIDAD DE PAGO POR CAPITACIÓN, DEFINIDO MEDIANTE RESOLUCIÓN 6408 DE 2016. 2017.
42. INVIMA. LISTADO DE REGISTROS SANITARIOS VIGENTES DE MEDICAMENTOS CON PRINCIPIO ACTIVO. 2021.
43. Bolaños-Díaz R, Tejada RA, Sanabria C, Escobedo-Palza S. Costo-efectividad de dos terapias antivirales para hepatitis B crónica en el Perú: entecavir y tenofovir. *Rev Perú Med Exp Salud Pública*. 9 de octubre de 2017; 34(3):377.
44. Gobierno de México. Guía de Hepatitis Virales para Establecimientos de Salud [Internet]. 2022. Disponible en: <https://www.gob.mx/censida/documentos/guia-de-hepatitis-virales-para-establecimientos-de-salud-2022>

45. Ministerio de Salud de Argentina. Hepatitis virales en la Argentina. 2022.
46. Gomes-Gouvêa MS, Ferreira AC, Teixeira R, Andrade JR, Ferreira AS, Barros LM, et al. HBV Carrying Drug-Resistance Mutations in Chronically Infected Treatment-Naive Patients. *Antivir Ther.* Mayo de 2015; 20(4):387-95.
47. Ministerio de Salud y Protección Social. ESTUDIO DE CASO DE INVERSIÓN DE HEPATITIS B, COLOMBIA 2019. 2019.
48. Bhise SB. HBV Polymerase as a Target for Development of Anti-HBV Drugs. En: *Viral Polymerases* [Internet]. Elsevier; 2019 [citado 10 de junio de 2024]. p. 237-70. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128154229000097>
49. Pollicino T, Isgrò G, Di Stefano R, Ferraro D, Maimone S, Brancatelli S, et al. Variability of reverse transcriptase and overlapping S gene in hepatitis B virus isolates from untreated and lamivudine-resistant chronic hepatitis B patients. *Antivir Ther.* Julio de 2009; 14(5):649-54.
50. Engullen MH, García RT, Trino HN, Nguyen HA, Nguyen KK, Nguyen LH, et al. Prevalence of hepatitis B virus DNA polymerase mutations in treatment-naïve patients with chronic hepatitis B. *Aliment Pharmacol Ther.* Diciembre de 2009; 30(11-12):1150-8.
51. Zhao Y, Wu J, Sun L, Liu G, Li B, Zheng Y, et al. Prevalence of mutations in HBV DNA polymerase gene associated with nucleos(t)ide resistance in treatment-naive patients with Chronic Hepatitis B in Central China. *Braz J Infect Dis.* Marzo de 2016; 20(2):173-8.
52. Rugieri Pacheco S, Magalhães Andrade dos Santos MI, Stocker A, Sant'Anna Zarife MA, Schinoni MI, Paraná R, et al. Genotyping of HBV and tracking of resistance mutations in treatment-naive patients with chronic hepatitis B. *Infect Drug Resist.* Julio de 2017; Volume 10:201-7.
53. Qian F, Zou W, Jin F, Li D, Shen Y. Prevalence of Potential Resistance Related Variants Among Chinese Chronic Hepatitis B Patients Not Receiving Nucleos(T)ide Analogues. *Infect Drug Resist.* Julio de 2020; Volume 13:2407-16.
54. Ministerio de Salud y Protección Social. BOLETÍN EPIDEMIOLÓGICO DE LAS HEPATITIS VIRALES EN COLOMBIA, 2015 - 2018. 2020.

55. Kim JE, Lee SY, Kim H, Kim KJ, Choe WH, Kim BJ. Naturally occurring mutations in the reverse transcriptase region of hepatitis B virus polymerase from treatment-naïve Korean patients infected with genotype C2. *World J Gastroenterol.* 2017; 23(23):4222.
56. Liu BM, Li T, Xu J, Li XG, Dong JP, Yan P, et al. Characterization of potential antiviral resistance mutations in hepatitis B virus reverse transcriptase sequences in treatment-naïve Chinese patients. *Antiviral Res.* Marzo de 2010; 85(3):512-9.
57. Zhang X, Li M, Xi H, Zhang R, Chen J, Zhang Y, et al. Pre-existing mutations related to tenofovir in chronic hepatitis B patients with long-term nucleos(t)ide analogue drugs treatment by ultra-deep pyro sequencing. *Oncotarget.* 25 de octubre de 2016; 7(43):70264-75.
58. Marino A, Cosentino F, Ceccarelli M, Moscatt V, Pampaloni A, Scuderi D, et al. Entecavir resistance in a patient with treatment-naïve HBV: A case report. *Mol Clin Oncol.* 6 de Abril de 2021; 14(6):113.
59. Norder H, Couroucé 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.* Febrero de 1994; 198(2):489-503.
60. Devesa M, Rodríguez C, León G, Liprandi F, Pujol FH. Clade analysis and surface antigen polymorphism of hepatitis B virus American genotypes. *J Med Virol.* Marzo de 2004; 72(3):377-84.