

Universidad Nacional de San Martín
Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud
“Dr. Carlos G. Malbrán”
Maestría en Microbiología Molecular

***ESTUDIO DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B EN
DONANTES DE SANGRE DE LA PROVINCIA DE
MISIONES ENTRE LOS AÑOS 2007 Y 2013:
PREVALENCIA, DISTRIBUCIÓN, PRESENCIA
DE INFECCIÓN OCULTA, VARIABILIDAD
GENOMICA Y MUTACIONES.***

Tesista: Bqco. Williams René Pedrozo

Directora de Tesis: Dra. Mirna Marcela Biglione
Co-Director de Tesis: Dr. Richard Malán

Lugares de Trabajo: Banco de Sangre Tejidos y Biológicos de la Provincia de Misiones. Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA (INBIRS, UBA), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

2016

RESUMEN

ESTUDIO DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B EN DONANTES DE SANGRE DE LA PROVINCIA DE MISIONES ENTRE LOS AÑOS 2007 Y 2013: PREVALENCIA, DISTRIBUCIÓN, PRESENCIA DE INFECCIÓN OCULTA, VARIABILIDAD GENOMICA Y MUTACIONES

Existen actualmente más de 2.000 millones de personas infectadas con el Virus de la Hepatitis B (HBV) de las cuales 240 millones son portadores crónicos. HBV causa 780.000 muertes cada año constituyendo un importante problema de salud a nivel mundial. La infección oculta por HBV (OBI) presenta una distribución mundial heterogénea con impacto epidemiológico y clínico.

En esta tesis de maestría nos propusimos determinar las características epidemiológicas de la infección por HBV y caracterizar los casos de infección oculta en una población de donantes de sangre de la provincia de Misiones, Argentina.

Para ello, se llevó a cabo un estudio descriptivo trasversal que incluyó a todos los donantes de sangre que concurrieron voluntariamente al Banco de Sangre Tejidos y Biológicos durante el período 2007-2013 que fueron calificados para realizar la donación. Se realizó el diagnóstico inmunoserológico y molecular para el HBV. Se pesquisaron los casos de OBI, a partir de los cuales se determinaron los genotipos, la diversidad genética y la presencia de sustituciones aminoacídicas en la proteína del Core de los aislamientos detectados.

Sobre un total de 53247 donantes (repetidos y de primera vez) y considerando los criterios de inclusión y exclusión establecidos en el estudio, se incluyeron para el análisis final 42887 donantes de sangre. La edad media fue de 34,7±11,1 años, el 70,4% correspondió al sexo masculino, el porcentaje de repetición de las donaciones fue de 19,5%. La prevalencia de infección por HBV por marcadores inmunoserológicos HBsAg y/o anticuerpos anti-HBc fue del 8,4% (IC95%= 8,2-8,7%), correspondiendo 7,7% (n=3293) al Ac anti-HBc, 0,1% (n=64) HBsAg y 0,6% (n=265) para ambos, con una disminución en los últimos años de 9,3% hasta valores de 5,7%. En los donantes de sangre masculinos la prevalencia de infección por HBV fue significativamente superior y la misma se asoció a una mayor edad de los donantes de sangre. La mayor parte de la provincia de Misiones presentaba cifras de prevalencia correspondiente a baja endemicidad (HBsAg<2%), sin embargo en tres departamentos del Noreste -San Pedro, Guaraní y Gral. Manuel Belgrano- que limitan Brasil la endemicidad clasificó como intermedia (HBsAg de 2 a 8%). Se halló una prevalencia de casos OBI del 15,6% en muestras con anti-HBc reactivo de donantes de sangre, algunos de ellos con reactividad para los anticuerpos anti-HBs. Todos los aislamientos correspondieron al genotipo HBV D3 y presentaron las mutaciones A1762T, G1764A, A1846T y G1899A y en diferentes regiones de los epítopes para linfocitos T de la proteína del Core.

Los datos obtenidos evidencian la necesidad de establecer al HBV como una prioridad en salud pública y plantean la importancia de afianzar el modelo de donación voluntaria y repetida en adultos jóvenes.

Palabras claves: Hepatitis B, Donadores de Sangre, Prevalencia, Infección Oculta (OBI), Genotipos y Mutaciones.

AGRACECIMIENTOS

Un agradecimiento muy especial a Mirna “mi DIRECTORA”, gracias por tu dedicación y calidez humana. Gracias por guiarme en esta tesis con tú sólida formación docente-investigadora-profesional, tú compromiso con esta tesis me ha permitido concretarla.

A Richard, por darme la posibilidad de trabajar en el Banco de Sangre Tejidos y Biológicos de la provincia de Misiones.

A Cecilia, por su ayuda, paciencia y predisposición para la realización y lectura crítica de esta tesis.

A Naty, Mariana y María Laura gracias por su ayuda con la obtención de lass muestras.

A mis compañeros de trabajo Beto, Gladis, Mónica, Joaquín, Laura, Romi, Alejandro y todos los técnicos en hemoterapia y administrativos, que contribuyeron en este trabajo con su labor diaria.

A los directivos del Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA (INBIRS), y a todo el personal por su apoyo, en especial a Carolina.

A Mirta, porque siempre confió en mí.

y A Graciela, “mi Amor”, por estar siempre.

DEDICATORIA

A mi papá, que hubiera estado orgulloso.

A mi mamá, que seguro está orgullosa.

A mis hermanos, cuñados y sobrinos.

A Graciela, mi Amor, en una sociedad perfecta.

*A mi hijo Pedro Simón... que también está orgulloso
y a Dios, que me llena espiritualmente.*

ABREVIATURAS

aa: aminoácidos.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNccc: ácido desoxirribonucleico circular covalentemente cerrado.

ADV: adefovir dipivoxil.

ALT: alaninoaminotransferasa.

anti-HBc: anticuerpos anti antígeno del core del virus de la hepatitis B.

anti-HBe: anticuerpos anti antígeno “e” del virus de la hepatitis B.

anti-HBs: anticuerpos anti antígeno de superficie del virus de la hepatitis B.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

AST: aspartatoaminotransferasa.

BCP: promotor basal del core del inglés *Basal Core Promotor*.

BE: brazo espaciador.

BSTB: Banco de Sangre Tejidos y Biológicos de la provincia de Misiones.

C-terminal: carboxilo-terminal.

DS: donantes de sangre.

EIA: enzimoimmunoensayos.

ETV: entecavir.

GRE: elemento de respuesta a glucocorticoides del inglés *Glucocorticoids Response Element*.

HBcAg: antígeno del Core del virus de la hepatitis B.

HBeAg: antígeno soluble "e" del virus de la hepatitis B.

HBsAg: antígeno de superficie del virus de la hepatitis B.

HBV: Virus de la Hepatitis B.

HCC: hepatocarcinoma celular.

HCV: Virus de la Hepatitis C.

HIV: Virus de la Inmunodeficiencia adquirida Humana.

HTLV: Virus Linfotrópico T Humano tipo I y II.

IC95%: intervalo de confianza del 95%.

IFN- γ : interferón gamma.

IgG: inmunoglobulina G.

IgM: inmunoglobulina M.
ITT: infecciones transmisibles por transfusión.
 χ^2 : prueba de ji-cuadrado.
LB: linfocitos B.
LMV: lamivudina.
LTc: linfocitos T citotóxicos.
LTh: linfocitos T colaboradores.
NAT.: test de detección de ácidos nucleicos del ingles Nucleic Acid Testing.
NJ: Neighbor-joining.
NK: células *Natural Killers*.
NKT: células *Natural killer T*.
n-PCR: nested PCR.
NTCP: polipéptido co-transportador de sodio-taurocolato.
N-terminal: extremo amino-terminal.
OBI: infección oculta por HBV del ingles *Occult hepatitis B Infection*.
OMS: Organización Mundial de la Salud.
ORF: marco de lectura abierto del ingles *Open Reading Frame*.
P: polimerasa
pb: pares de bases.
pC: polipéptido C.
PCR-C: reacción en Cadena de la Polimerasa de la región del preCore/Core.
PCR-S: reacción en Cadena de la Polimerasa de la región parcial del gen S/P.
PCR: reacción en cadena de la polimerasa.
pgARN: ácido ribonucleico pregenómico.
PMT: modificaciones postraduccionales.
PT: proteína terminal.
RHP: región hidrofílica principal.
TDF: tenofovir.
TEL: telbivudina.
TLR: *receptores toll-like*.
TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa.
U: prueba U de Mann Witney.
UDIs: usuarios de drogas inyectables.

INDICE

	Pagina
I- INTRODUCCIÓN	
VIRUS DE HEPATITIS B	
1- Estructura	10
2- Genoma	10
3- Proteínas virales y regiones regulatorias	11
3.1.1- Promotor basal del core (BCP), Proteínas pC y HBcAg	11
3.1.2- Variantes en BCP, pC y HBcAg	12
3.2.1- Proteínas de envoltura: L-, M- y S-HBsAg	13
3.2.2- Variantes en preS1, preS2 y S	14
3.3.1- Polimerasa Viral	15
3.3.2- Variantes de la polimerasa viral	16
3.4- Proteína X y sus variantes	17
4- Ciclo de replicación	17
5- Patogenia del HBV	18
6- Curso clínico de la infección	19
6.1- Infección aguda	21
6.2- Infección persistente o crónica	22
7- Diagnóstico de la infección por HBV	23
8- Infección oculta por HBV (OBI)	24
8.1- Factores virales implicados en la presencia de OBI	25
8.1.1- Variabilidad del HBV	25
8.1.2- Procesos epigenéticos	25
8.1.3- Coinfección con HCV	25
8.2- Factores del huésped implicados en la presencia de OBI	26
8.3- Diagnóstico de OBI	26
8.4- Implicancia clínica de OBI	27
9- Epidemiología de la infección por HBV	28
9.1- Prevalencia	28
9.2- Genotipos	29
II-OBJETIVOS	32

	Página
III- METODOLOGÍA	
1- Población estudiada	34
1.1- Tipo de estudio	34
1.2- Criterios de Inclusión	34
1.3- Criterio de exclusión	35
1.4- Aspectos éticos	35
2- Obtención de datos epidemiológicos	35
3- Obtención de muestras para marcadores inmunoserológicos de HBV	35
4- Diagnóstico inmunoserológico de la infección por HBV	36
4.1- Detección de HBsAg y Anti-HBc	36
5- Obtención de las muestra para establecer la infección oculta por HBV	37
6- Diagnóstico molecular de la infección oculta por HBV	37
6.1- Extracción de ADN	
6.2- Amplificación parcial del gen S/P de HBV (PCR-S)	37
6.2.1- Mezcla de reacción	38
6.2.2- Primers utilizados	38
6.2.3- Ciclado	38
6.2.4- Siembra	38
6.2.5- Lectura	38
6.3- Amplificación de la región genómica preCore-Core de HBV(PCR-C)	38
6.3.1- Mezcla de reacción	39
6.3.2- Primers utilizados	39
6.3.3- Ciclado para ambas rondas de PCR	39
6.3.4- Siembra	39
6.3.5- Lectura	39
6.4- Secuenciación nucleotídica de las regiones S/P y pC/C de HBV40	
6.4.1- Reacción de purificación	40
6.4.2- Mezcla de reacción	40

6.4.3- Primers utilizados	40
6.4.4- Ciclado	40
	Pagina
6.4.5- Precipitado	40
6.4.6- Secuenciación	40
6.5- Análisis filogenético del HBV	41
6.6- Análisis de variabilidad génica del HBV	41
6.6.1- Análisis de mutaciones en el promotor basal del core y región preCore	41
6.6.2- Análisis de mutaciones en los genes S Polimerasa, Core y X	41
7- Estudio complementario inmunoserológico: detección de anticuerpos anti-HBs	42
8- Análisis estadístico	42
IV- RESULTADOS	
1- Características generales de la población de DS que concurrió entre los años 2007 y 2013 al Banco de Sangre Tejidos y Biológicos (BSTB)	44
2- Prevalencia y distribución de los marcadores anti-HBc y/o HBsAg	45
3- Detección de infección oculta por HBV (OBI) en DS con anticuerpos anti-HBc reactivos	49
4- Identificación de los genotipos de HBV en los casos de OBI detectados	51
5- Variabilidad génica de las cepas de HBV aisladas productoras de OBI	53
5.1. Presencia de variaciones génicas en el BCP y la región de preCore	53
5.2 Presencia de variantes en los aminoácidos de la proteína Core	53
V- DISCUSIÓN	55
VI- CONCLUSIONES	63
VII- BIBLIOGRAFÍA	65

I- Introducción

VIRUS DE HEPATITIS B

1- Estructura

El Virus de la Hepatitis B humano (HBV) pertenece al género *Orthohepadnavirus*, familia *Hepadnaviridae*, que comprende virus hepatotropos de ácido desoxirribonucleico (ADN) capaces de infectar mamíferos y presentan una cápside icosaédrica y una envoltura lipoproteica con antígenos de superficie (**Figura 1**) [1].

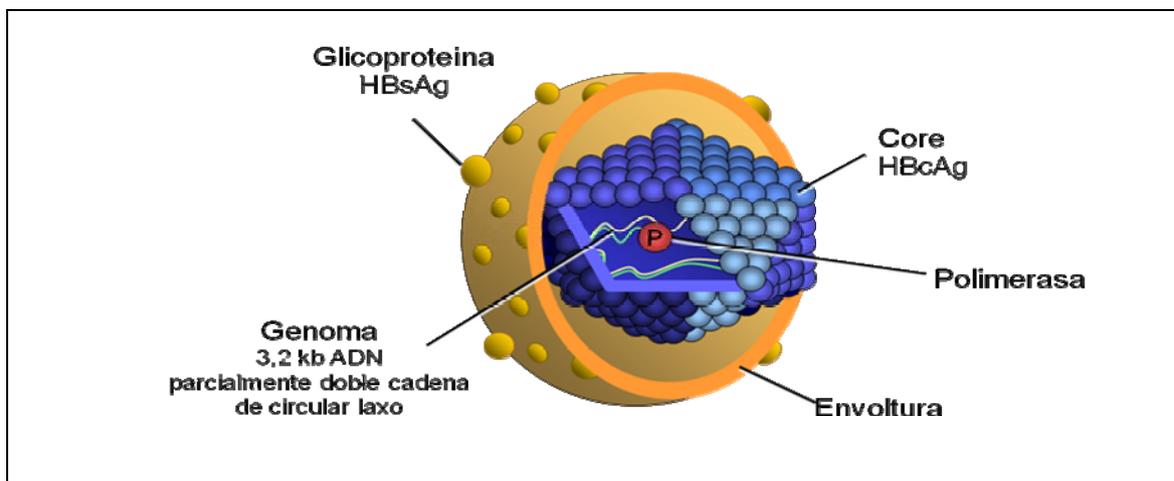


Figura 1. Estructura del HBV.

2- Genoma

El genoma de HBV consiste en ADN circular parcialmente de doble cadena. La cadena L o negativa está unida covalentemente al dominio proteína terminal de la polimerasa viral en el extremo 5' y la cadena S o positiva lo hace a un oligómero de ARN. El genoma es de aproximadamente 3.200 nucleótidos de longitud, y contiene cuatro marcos abiertos de lectura (*Open Reading Frame: ORF*) que se superponen parcialmente, pre-C/C, pre-S/S, P y X. El **ORF preC/C**, codifica el antígeno del núcleo (HBcAg) y el antígeno soluble "e" (HBeAg). El **ORF S**, codifica la tres proteínas de superficie virales, preS1 (L o grande), preS2 (M o mediana), y S (pequeña) que corresponde al HBsAg. El **ORF P** codifica la proteína terminal (TP) y la polimerasa viral que posee la ADN polimerasa, la transcriptasa inversa, y las actividades ARNasa. El **ORF X** codifica la proteína X, reguladora esencial para en la replicación viral y capaz de transactivar la

expresión de numerosos genes celulares y virales (**Figura 2**). Los procesos transcripcionales del genoma de HBV están regulados por dos potenciadores (*enhancer I*: enhI y *enhancer II*: enhII), cuatro promotores (el promotor basal del core, el de preS2/S, el de preS1 y el de X), un elemento silenciador, un elemento de respuesta a glucocorticoides (*Glucocorticoids Response Element*: GRE), y un elemento CCAAT (que es una caja de inicio de la transcripción) [2].

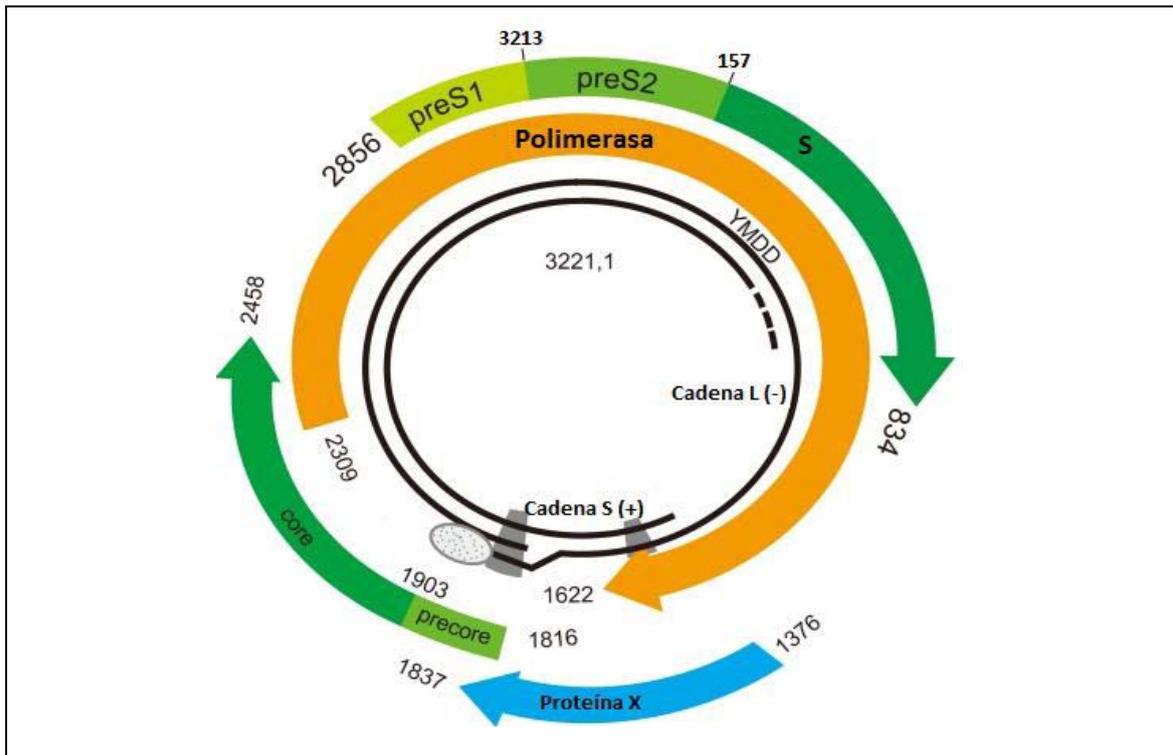


Figura 2. Esquema del genoma de HBV describiendo la ubicación de los genes yuxtapuestos.

3- Proteínas virales y regiones regulatorias

3.1.1- Promotor basal del core (BCP), Proteínas pC y HBcAg

Las proteínas preCore (polipéptido C: pC) y Core (antígeno del Core: HBcAg) se encuentran codificadas por el ORF preC/C, nucleótidos antes del mismo se encuentra el promotor basal del core (BCP: en inglés BCP por *Basal Core Promotor*). El mismo contiene dos codones de iniciación (ATG) ubicados en fase, de ahí que los dos polipéptidos codificados son idénticos en parte de su extensión, difiriendo solamente entre sí por la presencia de 29 aminoácidos (aa) adicionales en el extremo amino-terminal (N-terminal) del polipéptido pC y por la delección peptídica del HBcAg en el extremo

carboxilo-terminal (C-terminal). El HBcAg es el principal componente de la nucleocápside de HBV. Es una fosfoproteína de 22 kDa, de aproximadamente 185 aa (dependiendo del genotipo viral), que se autoensambla *in vivo* formando partículas esféricas. Cada una de ellas constituye una subunidad de la nucleocápside viral. La microscopía electrónica demuestra que estas cápsides se encuentran predominantemente en el núcleo de los hepatocitos; no se secretan a la circulación libres sino rodeadas de la envoltura viral. El pC es rico en arginina en su extremo C-terminal y tiene por función la unión al ADN viral. En el otro extremo N-terminal se encuentra la secuencia necesaria para el autoensamblaje. Diecinueve de los primeros 29 aa del extremo N-terminal del pC funcionan como una señal de secreción que dirige la molécula nascente hacia el retículo endoplásmico desde donde, luego del clivaje de los extremos N- y C-terminal por una peptidasa aportada por la célula hospedadora infectada, se dirige al aparato de Golgi para ser secretado a la circulación como un antígeno soluble de 16 kDa denominado Antígeno “e” (HBeAg). El pC no es imprescindible para la replicación viral, por lo que se lo considera un polipéptido accesorio (**Figura 3**) [2].

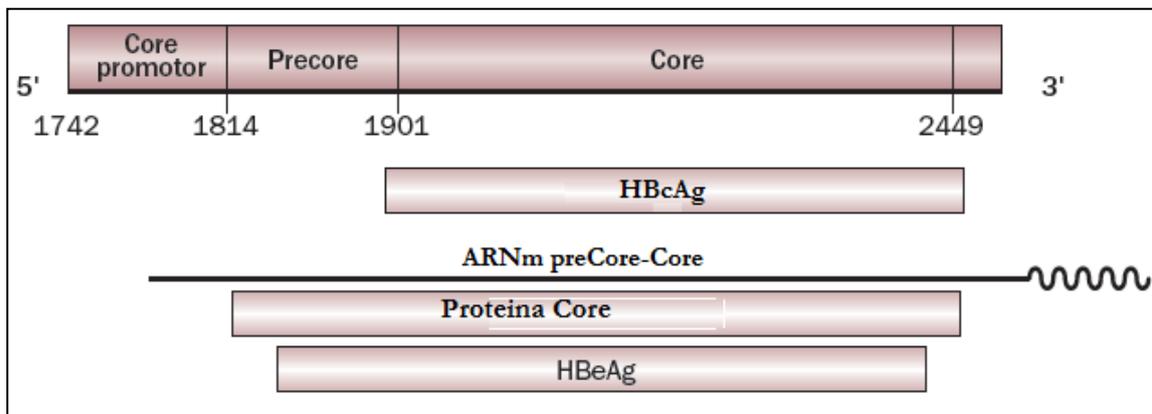


Figura 3. Esquema de Core con el promotor basal del core y el ORF preC/C que codifica para el HBcAg, la proteína del Core y el HBeAg.

3.1.2- Variantes en BCP, pC y HBcAg

Las mutaciones en la región BCP y pC influyen en la producción del HBeAg. La detección simultánea de mutaciones pC y HBcAg es muy frecuente, se estima que aparecen en primer lugar las mutaciones del HBcAg y tras la seroconversión de anti antígeno “e” (anti-HBe) sobrevienen las mutaciones en la región del pC. La existencia de estas cepas mutantes tiene importantes implicaciones clínicas, ya que se ha demostrado que las mutantes pC provocan una inflamación hepática más agresiva y, en algunos casos, una

insuficiencia hepática aguda, además de asociarse con resistencia al tratamiento con interferón- α , una mayor probabilidad de pérdida del injerto después de un trasplante de hígado e incluso con el desarrollo de hepatitis fulminante. Sin embargo, dichas mutaciones también se han encontrado en portadores asintomáticos [3-6].

Si bien, un grupo de ocho mutaciones dentro de esta región génica (G1613A, C1653T, T1753V, A1762T, G1764A, A1846T, G1896A y G1899A) han sido asociadas frecuentemente con el hepatocarcinoma celular (HCC), cuatro de estas (C1653T, T1753V, G1764A y A1846T) han sido reconocidas como factores decisivos para el desarrollo de dicho cáncer. Además, mutaciones que decrecen la producción del HBeAg también pueden disminuir la eficiencia de la replicación viral [7,8].

3.2.1- Proteínas de envoltura: L-, M- y S-HBsAg

Estas proteínas son el producto de la traducción del *ORF S* que se divide en tres dominios: preS1, preS2 y S. Cada uno de ellos presenta un codón de iniciación de la traducción diferente ubicado en fase y un idéntico codón de terminación, obteniéndose así las tres proteínas de envoltura: L-HBsAg, M-HBsAg y S-HBsAg, siendo esta última la más abundante (**Figura 4**). Las tres proteínas son traducidas a partir de distintos ARNm y comparten el mismo extremo C-terminal, por lo tanto pueden ser detectadas mediante los inmunoensayos convencionales utilizados para el diagnóstico de la infección por el HBV. L-HBsAg sólo se encuentra glicosilada, mientras que, M-HBsAg y S-HBsAg pueden estarlo como no. El L-HBsAg contiene una secuencia consenso que interactúa con el receptor para permitir la entrada al hepatocito. Variaciones en este epítipo, así como en secuencias adyacentes, tendrían significativas implicancias tanto en el tropismo celular, como en la especificidad de especie en la infección por HBV. L-HBsAg cumple un rol importante en el ciclo de replicación del HBV, por ser esencial tanto para el ensamblaje del virus como para las primeras etapas de la infección de la célula blanco [9-12].

Recientemente, se ha propuesto que la proteína de transmembrana celular, denominada polipéptido co-transportador de sodio-taurocolato (NTCP) es la que media la entrada del virión a la célula blanco [13].

El HBsAg contiene una alta cantidad de puentes disulfuro que estabilizan su estructura secundaria. Posee una región hidrofílica principal (RHP) (100 al 160 aa), dentro del cual se encuentra el determinante "a" (107 a 147 aa), considerado como el más importante blanco para los anticuerpos neutralizantes anti-HBs que confieren protección

contra la infección (y/o reinfección) con cualquiera de los nueve genotipos (A-H, J) del virus (**Figura 4**). Esta región altamente inmunogénica se expone en la superficie de los viriones y de las formas sub-virales, y se encuentra sometida a la presión de selección del sistema inmune del hospedador [9-11].

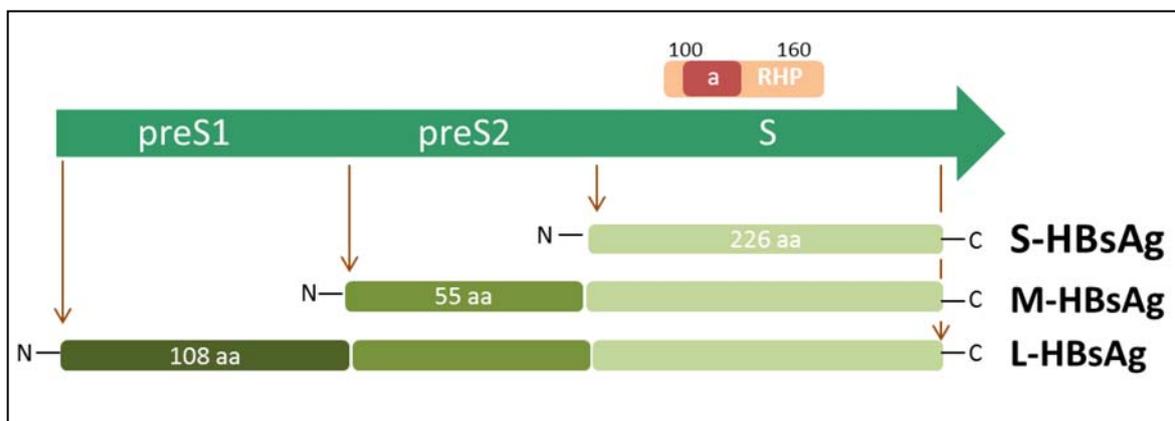


Figura 4. Descripción del ORF S y los tres antígenos de envoltura. Se muestra la posición aminoacídica de la región hidrofílica principal (RHP) en la región S y dentro de ésta, el determinante “a”.

3.2.2- Variantes en preS1, preS2 y S

La infección con cepas de HBV que presentan deleciones en preS1 y/o preS2 o mutaciones en el codón de inicio de preS2 favorecen la progresión al hepatocarcinoma (HCC) [14-17]. Según estudios *in vitro* ciertas mutaciones específicas en dichos genes, como la mutación en el codón de inicio de preS2, afectan considerablemente la síntesis de las proteínas de superficie del HBV con la consiguiente disminución en la producción y secreción del HBsAg [18]. Mutaciones en S-HBsAg son de suma importancia, debido a que pueden alterar la síntesis y la estructura conformacional del mismo afectando la unión HBsAg/anti-HBs. Por ejemplo, mutaciones en las cisteínas afectan la formación de puentes disulfuro y pueden modificar la estructura conformacional del HBsAg [19]. Por otro lado, estudios *in vitro* permitieron demostrar que la mutación E164D reduce la unión del HBsAg/anti-HBs y produce una disminución en la secreción del virión, mientras que la mutante G145R escapa al reconocimiento de los anticuerpos neutralizantes preexistentes originados por profilaxis activa (vacuna) [20-22]. Subsiguientemente, se fueron reportando mutantes de escape inducidas por profilaxis activa y/o pasiva (gammaglobulina específica) con cambios en aa dentro y fuera del determinante “a” [23-25]. Si bien actualmente la importancia clínica de estas mutaciones se continúa investigando, algunas variantes como

L95W, I126S, T131N, M133T y V173L se han descrito asociadas a exacerbaciones de la hepatitis B crónica [26].

3.3.1- Polimerasa Viral

La polimerasa viral es una enzima multifuncional de 845 aa que presenta cuatro dominios funcionales: dominio proteína terminal (PT), un brazo espaciador (BE), el dominio llamado “rt” y un dominio que contiene actividad ARNasa-H. Esta proteína cumple un rol fundamental en la replicación viral, llevando a cabo las siguientes funciones: 1) encapsidación del ARN pregenómico (pgARN); 2) iniciación de la síntesis de ADN; 3) transcripción inversa del pgARN; y 4) degradación del pgARN debido a su actividad de ARNasa-H asociada. También es blanco de distintas drogas antivirales utilizadas en el tratamiento de la hepatitis B crónica. El dominio PT actúa como cebador de la síntesis de la cadena L mientras que se desconoce la función del dominio BE. El dominio rt tiene actividad de transcriptasa inversa/ADN polimerasa-ADN dependiente y la síntesis de la segunda cadena del ADN viral; y posee un motivo altamente conservado (YMDD) que forma parte del sitio catalítico. Se cree que este motivo es el sitio de la enzima donde se produce el reconocimiento de los distintos nucleótidos necesarios para llevar a cabo su función en la replicación viral. Por último, el dominio ARNasa-H, degrada el intermediario RNA-DNA. Esta enzima viral presenta una alta tasa de error (aproximadamente $1.4-3.2 \times 10^{-5}$ sustituciones nucleotídicas por sitio por año), superior al resto de los virus a ADN, debido a que carece de la posibilidad de correcciones si hubiere incorporación errónea de bases nucleotídicas. La alta tasa de error genera mutaciones en el genoma del HBV, sumadas a las inducidas por las enzimas celulares APOBEC y ARN pol II. Si bien las mutaciones se generan espontáneamente durante el curso de la infección natural del HBV, lo hacen con especial frecuencia y eficacia en un ambiente de presión selectiva, propiciado por el uso de las inmunoprofilaxis activa y pasiva o el tratamiento antiviral [5].

3.3.2- Variantes de la polimerasa viral

En los últimos años las opciones terapéuticas de la hepatitis B crónica han aumentado, pero el fallo en los tratamientos antivirales se debe fundamentalmente a la presencia de mutaciones en la polimerasa (P), que son las responsables de la resistencia de dicha enzima a los fármacos. Las cepas de HBV resistentes al tratamiento antiviral presentan mutaciones puntuales en los subdominios A, B o C de la P. Dentro del subdominio C, las mutaciones puntuales en el motivo YMDD, son las más frecuentes y son clínicamente significativas, dado que la mayoría son seleccionadas durante el tratamiento antiviral. Actualmente, 5 análogos de nucleósidos/nucleótidos son utilizados para el tratamiento de HBV crónica: lamivudina (LMV), adefovir dipivoxil (ADV), entecavir (ETV), telbivudina (TEL) y tenofovir (TDF). La mutación rtM204V/I, más común de las variantes, está asociada con la resistencia al tratamiento con LMV y se sitúa en el motivo YMDD. La variante rtL180M por sí sola, no afecta el tratamiento a LMV pero cuando se asocia con la mutación rtM204V/I ambas aumentan considerablemente la replicación viral. Estas mutaciones hacen que la unión entre la LMV y la P no se produzca por un impedimento estérico [5,27,28]. Otra mutación es la rtV173L que altera el ambiente alrededor del sitio catalítico de manera de aumentar la eficiencia de polimerización [29]. Además, se han descrito mutaciones como rtD206E y rtV207I asociadas a la resistencia de este fármaco *in vitro* y en pacientes chinos [28,30-32]. La resistencia a ADV se asocia con la presencia de las mutaciones rtN236T y/o rtA181V/T. La primera está compartida con el TDF y cambia la configuración del bolsillo de unión a las drogas [33]. Además pueden aparecer otras mutaciones secundarias como rtI181T, rtV214A y rtQ215S. Las dos primeras son mutaciones compensatorias que se pueden encontrar en pacientes con resistencia a LMV [34]. Hasta el momento únicamente se han observado cepas resistentes a ETV (rtI169T, rtT184S, rtS202I, rtM250V) en pacientes que presentaban también mutaciones relacionadas con resistencia a LMV [29,35,36]. La resistencia a TDF fue hallada en pacientes con la mutación rtA194T [37], mientras que la rtM204I se asoció a TEL [5].

3.4- Proteína X y sus variantes

La proteína X o HBxAg es un polipéptido multifuncional con actividad reguladora que modula la transcripción de genes virales y celulares afectando, de forma directa o indirecta, la replicación y proliferación del virus [38]. Diversos autores han documentado que las cepas mutantes K130M y V131I exhiben una actividad transactivadora mayor que la cepa salvaje, lo que implica que estas mutantes pueden contribuir significativamente a la progresión de HCC [39]. Más aún, recientemente se ha determinado que la triple mutante I127-N-S-T/K130M/V131I es uno de los factores decisivos en el desarrollo del HCC [7].

4- Ciclo de replicación

El ciclo de replicación de HBV presenta características muy particulares que pueden ser resumidas esquemáticamente. (a) La interacción del virus con receptores de superficie celular, aún sin identificar. Se ha postulado como receptores potenciales los *receptores toll-like* (TLR) y dos proteínas de membrana plasmática, Anexina V y Apolipoproteína H. [40,41]. La unión al receptor depende de un dominio principal de la porción preS1 del L-HBsAg, específicamente el epítoto QLDPAF [42] (b) La liberación de la nucleocápside central en el citoplasma y su transporte a la membrana nuclear. (c) Descarga del genoma del HBV en el núcleo y su conversión en ADN circular covalentemente cerrado (ADNccc); [43,44] (d) La transcripción de ADNccc por la ARN polimerasa II de la célula anfitriona en todos ARN mensajero (ARNm) viral, incluyendo un ARN pregenómico (pgARN); (e) Translocación de los transcritos del HBV al citoplasma, donde se realiza la traducción de la envoltura viral, núcleo, "e", polimerasa, y proteína X. (f) El montaje de nucleocápside y, dentro de ellos, la síntesis de ADN viral *de novo* desde el pgARN por polimerasa en su función de transcriptasa inversa viral. (g) Recubrimiento de la mayoría de las nucleocápsides con sus glicoproteínas de superficie virales de envoltura en el retículo endoplásmico y/o aparato de Golgi, para su posterior liberación de viriones maduros. (h) El reciclado de una pequeña porción de la nucleocápside en el núcleo para mantener el depósito de ADNccc estable (**Figura 5**). Por otro lado, en algunos pacientes con hepatitis B crónica y –habitualmente– en aquellos con HCC, el ADN viral se integra al genoma celular. La integración parece ser mayoritariamente un evento al azar que ocurre en

diversos cromosomas celulares y puede interferir en algunos casos en el proceso de immortalización celular [45].

El HBV se ha clasificado como un pararetrovirus porque tiene alguna similitud con los retrovirus. De hecho, el ADN del virus se replica a través de la transcripción inversa a partir del pgARN que representa su forma intermediaria replicativa. Similares a los retrovirus, el ADN de HBV puede integrarse en el genoma de las células huésped hepáticas pero, a diferencia de lo que sucede para los retrovirus, la integración no tiene ningún papel en el ciclo de replicación de HBV y sólo intervienen los segmentos del genoma viral. El HBV integrado puede persistir para siempre en las células hepáticas de los individuos infectados, incluso cuando presentan HBsAg no reactivo [46].

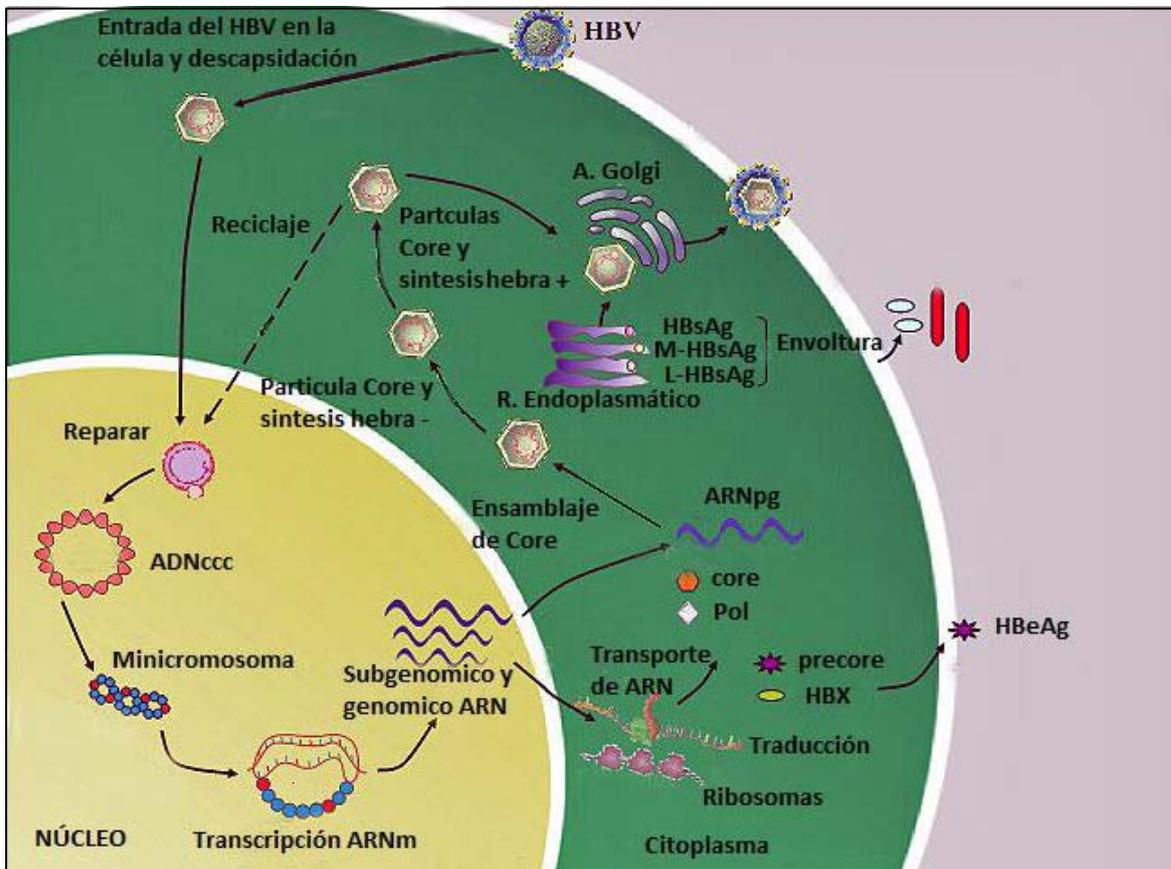


Figura 5. Ciclo de replicación de HBV [45].

5- Patogenia del HBV

El HBV es un virus no citopático en hepatocitos de individuos inmunocompetentes, que causa un amplio espectro de enfermedades hepáticas que comprenden desde la

hepatitis aguda (incluyendo la falla hepática fulminante) hasta la hepatitis crónica, cirrosis y HCC. El eventual desarrollo y severidad de la infección por HBV depende de una variedad de factores tanto virales como del hospedador. En general, se acepta que la injuria hepatocelular está dada por el reconocimiento de antígenos virales expresados en la superficie del hepatocito por parte de Linfocitos T citotóxicos (LTc) CD8+ específicos, bajo la influencia de los Linfocitos T colaboradores (LTh) CD4+ Th1, con la consiguiente inducción de la apoptosis de las células infectadas [47]. Precedentemente, también se ha documentado que la eliminación viral ocurre fundamentalmente mediante mecanismos no citolíticos mediados por el interferón gamma (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) secretados por células CD8+, células *Natural Killers* (NK) y células *Natural killer T* (NKT); a los que sucede una fase complementaria mediada por la actividad citotóxica de dichas células [48]. A su vez, bajo la influencia de LTh CD4+ Th2, los Linfocitos B (LB) sintetizan anticuerpos necesarios para la eliminación del HBV circulante. Durante la infección aguda autolimitada, la patología es moderada y la replicación viral es efectivamente controlada por la respuesta inmune del hospedador, dado que éste desarrolla una respuesta inmune vigorosa, policlonal que es dirigida contra múltiples epítopes de todas las proteínas virales, con resolución de la hepatitis. Excepcionalmente, esta respuesta inflamatoria está marcadamente exacerbada por factores virales o determinantes del hospedador -algunos aún no conocidos- dando como resultado una injuria masiva hepatocelular y una hepatitis fulminante.

Por otro lado, la hepatitis crónica resulta de la continua injuria hepática como consecuencia de una eliminación viral poco efectiva. La respuesta inmune es débil y dirigida contra uno o pocos epítopes (respuesta inmune mono u oligo-específica). Los pacientes infectados crónicamente con HBV presentan una respuesta de los LT CD4+ y CD8+ específicos para epítopes virales significativamente disminuida. Por lo tanto, la respuesta de LT tiene doble significado en la infección por HBV: si es vigorosa permite la eliminación viral, mientras que si es poco efectiva resulta en una injuria hepatocelular crónica. Por último, en portadores asintomáticos la tolerancia a antígenos del HBV produce escaso o ningún daño en el hígado infectado mediado por el sistema inmune [47].

6- Curso clínico de la infección

Las vías de transmisión del HBV son la horizontal, la vertical perinatal y la parenteral; con un periodo de incubación que varía entre 4 a 6 semanas post-infección. Un individuo se puede contagiar a través de sangre, semen u otros líquidos corporales de una persona infectada por el virus, siendo la vía de transmisión perinatal (de madre a hijo) la más común en zonas de alta endemividad y la sexual la más importante en países de baja prevalencia, como la Argentina (50%), y le continúa en importancia la transmisión parenteral por el uso compartido de materiales (jeringas, agujas, etc) por parte de los usuarios de drogas inyectables (15%) y también los casos en que la cocaína es inhalada (canuto) [49].

La infección por HBV puede ser aguda o crónica. En los recién nacidos la infección tiende a la cronicidad (98%), en cambio en los adultos se dan principalmente las formas agudas. El espectro de la infección aguda por el HBV varía de infección asintomática y auto-limitada a hepatitis fulminante dependiendo de varios factores relacionados con el virus y el huésped. La infección aguda por HBV sintomática es rara en neonatos y en los adultos se presenta en un tercio de los pacientes. Por otro lado, la infección crónica puede presentarse asintomática o producir hepatitis crónica asociada o no a la cirrosis y al HCC; raramente se manifiesta como hepatitis fulminante (**Figura 6**) [49].

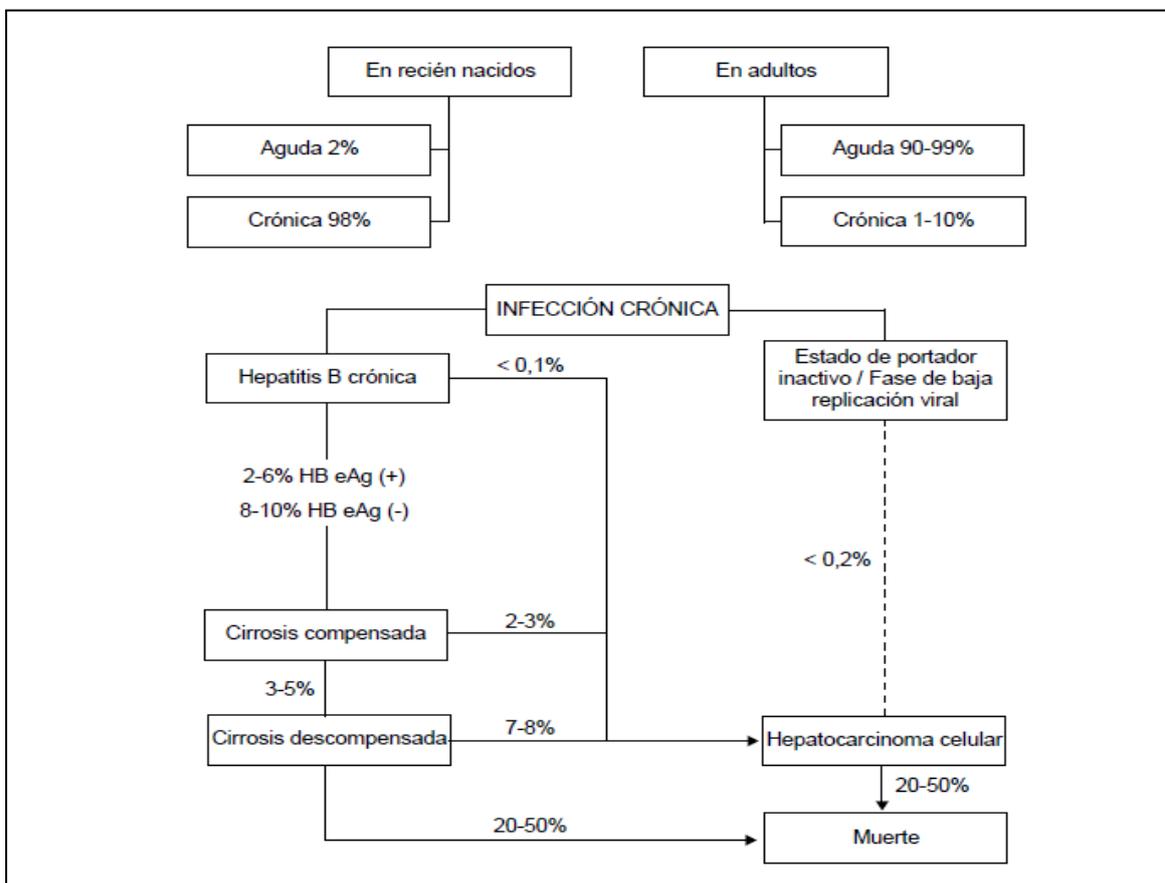


Figura 6. Evolución clínica del HBV.

6.1- Infección aguda

La infección aguda cursa de forma asintomática en un 70% de los casos, 1-4% desarrollan hepatitis aguda severa y 0,1- 0,5% hepatitis fulminante. El 95% de las formas agudas son autolimitadas y sólo 1-5% desarrollan infección crónica. Entre las 6-10 semanas post-infección comienzan a hacerse detectables los marcadores HBsAg y HBeAg, mientras que el ADN viral se puede encontrar en suero desde los 21 días antes de la aparición de los antígenos mencionados. Posteriormente, el individuo infectado exhibe un incremento de los niveles séricos de las transaminasas hepáticas (alaninoaminotransferasa (ALT) y aspartatoaminotransferasa (AST)) y alrededor de la semana 10 pueden aparecer síntomas inespecíficos (fatiga, náuseas, ictericia, etc.). En esta etapa comienzan a detectarse en suero anticuerpos IgM anti-HBc. En la fase de recuperación, los niveles de transaminasas hepáticas retornan a sus valores normales y se produce la seroconversión hacia anticuerpos anti-HBs y anti-HBe. Cuando los niveles de IgM anti-HBc comienzan a declinar, los niveles de anticuerpos IgG anti-HBc aumentan, permaneciendo por más tiempo en circulación que los anti-HBs. Estos últimos son los que permiten la eliminación de los viriones circulantes. Durante el breve período que corresponde a la seroconversión de HBsAg a anti-HBs, no se detectan dichos marcadores serológicos. Se conoce a este lapso como período de ventana inmunológica. El diagnóstico en este período sólo puede hacerse en función de otros marcadores, como por ejemplo mediante la detección de anticuerpos anti-HBc y/o también pueden detectarse anticuerpos anti-HBe (**Figura 7**) [49].

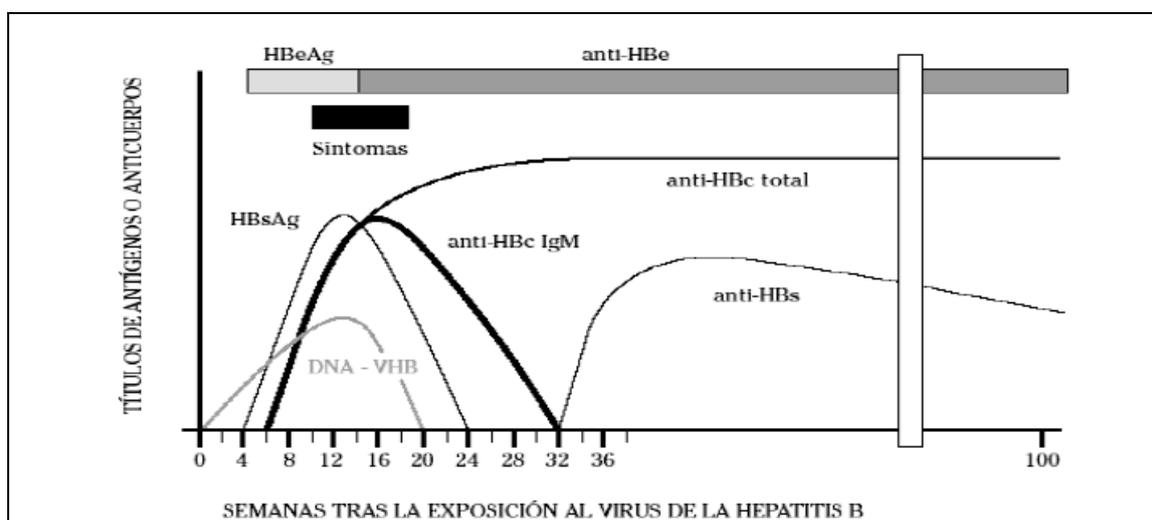


Figura 7. Evolución de marcadores serológicos y virológicos de infección aguda por HBV.

6.2- Infección persistente o crónica

La presencia del HBsAg en suero por más de 6 meses indica progresión de la infección hacia la forma persistente o crónica (**Figura 8**). En la infección crónica se reconocen cuatro fases, sin embargo no todos los individuos atraviesan estas 4 etapas. (a) Inmunotolerancia o replicación activa, que puede durar 30 años o más en donde hay una elevada carga viral en plasma ($>10^5$ copias/ml), HBeAg reactivo y normalidad de las transaminasas séricas. El HBV induce inmunotolerancia mediante la secreción de HBeAg, dado que este antígeno inhibiría la respuesta inmune del hospedador. (b) Inmunoeliminación por una activa respuesta inmune, la cual se caracteriza por la presencia del HBeAg asociado a altos o fluctuantes niveles de carga viral de HBV, persistente o intermitente elevación de las transaminasas séricas e inflamación activa del hígado. (c) Inmunocontrol (portador crónico inactivo) reducción estable de los títulos virales, reflejando el control inmune sobre la replicación viral (d) Inmunoescape donde se observa una reactivación de la replicación del HBV en ausencia del HBeAg, la detección de anticuerpos anti-HBe, elevados y fluctuantes niveles de ADN viral y de transaminasas, en presencia de continua lesión necroinflamatoria. La tasa de seroconversión espontánea del HBsAg en infección crónica es de 0,5-0,8% por año. Aproximadamente un tercio de los pacientes con hepatitis crónica B desarrollan a largo plazo cirrosis o HCC, siendo la incidencia anual de 2,1% y 3-6%, respectivamente [49].

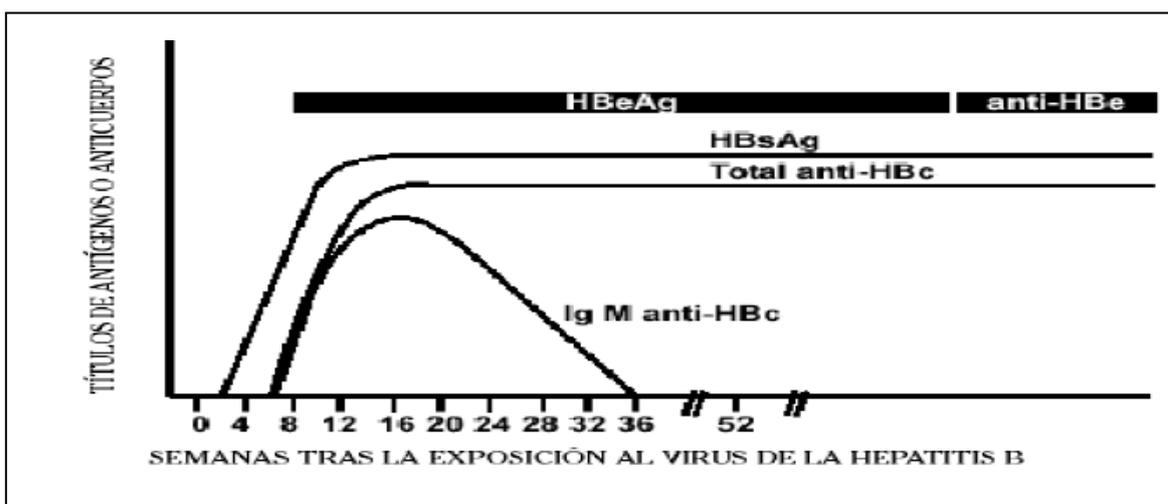


Figura 8. Evolución de los marcadores serológicos de la infección crónica por HBV.

7- Diagnóstico de la infección por HBV

El diagnóstico del HBV se realiza mediante la pesquisa de los marcadores inmunoserológicos de infección HBsAg, anticuerpo IgM anti-HBc o totales y anti-HBs, en el suero o plasma de pacientes mediante la aplicación de técnicas de enzimoimmunoensayos (EIA). En el caso de detectarse la presencia del HBsAg, se debe continuar con el estudio del HBeAg, anticuerpos anti-HBe y la detección o medición de la carga viral del ADN genómico. El HBcAg solo se puede detectar en los hepatocitos y no en el suero, debido a que no circula en forma libre. La presencia de anticuerpos (IgM o IgG) indica la exposición al virus, actual o pasada. Por otra parte, la detección de anticuerpos anti-HBs puede indicar vacunación previa o señalar la resolución de la infección, debido a que estos son los anticuerpos neutralizantes. La presencia del HBeAg indica que el individuo es altamente infeccioso. La seroconversión a anticuerpos anti-HBe se asocia en general con una menor infectividad del paciente, y con un buen pronóstico de la infección, implicando habitualmente que el virus dejó de replicar y que el paciente está comenzando a resolver la infección. Sin embargo, en algunos individuos que son negativos para el HBeAg pero positivos para anti-HBe se les detecta replicación viral activa. La ausencia del HBeAg en estos casos puede deberse a mutantes de preCore y/o del BCP, y se denominan cepas HBe-*minus* [49].

En bancos de sangre se utilizan equipos de EIA con alta sensibilidad, tanto para antígenos virales como para anticuerpos. Es importante mencionar que las pruebas inmunoserológicas detectan la presencia de antígenos o anticuerpos libres en circulación, y no los que están formando inmunocomplejos. A pesar de la implementación de estas determinaciones inmunoserológicas la transmisión puede ocurrir, fundamentalmente al principio de la infección, cuando ningún marcador inmunoserológico es detectable aún.

La detección de ADN del HBV es el marcador más sensible y específico de replicación viral. Puede hallarse tanto en suero como en tejido hepático, médula ósea y células mononucleares de sangre periférica. Su detección puede realizarse en forma cualitativa o en forma cuantitativa (carga viral de HBV). Los métodos cualitativos comerciales tienen aplicación exclusiva en el testeo de ácidos nucleídos en sangre y hemoderivados y no tienen aplicación clínica, salvo en algunos casos ante la sospecha de HBV oculta. En la Argentina, se ha comenzado a utilizar una técnica denominada NAT

(Nucleic Acid Testing) que se basa en la detección de ácidos nucleídos virales a partir de un pool de sueros que se realiza con equipos comerciales [49].

Tabla 1. Distribución de los marcadores serológicos de infección para el HBV según los tipos y etapas de la infección

Estado del paciente	HBs Ag	Anticuerpos anti-HBs	HBe Ag	Anticuerpos anti-HBe	Anticuerpos anti-HBc	DNA del HBV
<i>Infección aguda</i>						
- Temprana	+	-	+	-	IgM	+
- Período de ventana	-	-	-	+/-	IgM	+/-
- Recuperación	-	+	-	-	IgG	+/-
<i>Infección persistente</i>						
- Estado activo	+	-	+	-	IgG, IgM	>10 ⁵ copias/mL
- Estado inactivo	+	-	-	+	IgG	<10 ⁵ copias/mL
- Reactivación	+	-	+/-	-	IgG, IgM	>10 ⁵ copias/mL
- HBe-minus	+	-	-	+	IgG	>10 ⁵ copias/mL
- Oculta	-	+/-	-	+/-	+/-	+
<i>Infección pasada</i>	-	+	-	-	IgG	-
<i>Vacunado</i>	-	+	-	-	-	-

8- Infección oculta por HBV (OBI)

Se ha descrito la infección oculta por el HBV (*Occult hepatitis B Infection: OBI*), definida por la *Asociación Europea para el Estudio del Hígado*, como la presencia de ADN viral en el hígado (detectable o indetectable en el suero) de individuos con resultados no reactivos para el HBsAg, en base a la evidencia aportada por Cacciola y colaboradores que detectaron la presencia de ADN del HBV en las biopsias hepáticas. El ADN HBV cuando es detectable en suero su concentración es muy baja (<200 UI/ml o 1200 copias/ml) [50,51]. Esta condición se relaciona esencialmente con persistencia intra-hepática duradera de los genomas virales completos como formas episomales libres y, en particular a la persistencia de ADNccc viral, como un episoma, estable en el núcleo de las células infectadas [52]. OBI se asocia significativamente con la presencia de anticuerpos anti-HBc y/o anti-HBs (OBI seropositivos). Sin embargo se estima que aproximadamente un 20% de los individuos con OBI no presentan ningún marcador de HBV detectable (OBI seronegativos) [53].

Factores virales y del huésped están implicados en los posibles mecanismos de presencia de OBI.

8.1- Factores virales implicados en la presencia de OBI

8.1.1- Variabilidad del HBV: la falta de HBsAg detectable en el suero es una característica de la OBI, por lo cual se ha centrado un considerable interés en las mutaciones en el gen S y las regiones reguladoras. Se han descrito mutaciones en las regiones inmunodominantes de las proteínas de superficie capaces de disminuir el reconocimiento del virus por el sistema inmune, deleciones en la región preS1 y/o preS2 que perjudican el ensamblaje viral, mutaciones en el codón de inicio de preS2 que conducen a una fuerte reducción de la expresión de HBsAg, y mutaciones que afectan las modificaciones postraduccionales (PMT) de proteínas del HBV [18,54-56]. En algunos casos el estado de OBI se debe a la variabilidad genética a nivel del gen S (mutantes de escape del gen S) que producen un HBsAg modificado que no puede ser reconocido por los ensayos comerciales de detección disponibles (incluso cuando se utilizan los más sensibles). En un pequeño número de casos, puede deberse a la infección con variantes de HBV que afectan la replicación o síntesis de la proteína S [18,45]. Sin embargo, en la mayoría de los casos, los genomas del HBV en OBI son competentes para la replicación del virus con la calidad y heterogeneidad genética comparable a las cepas de HBV de individuos con infección HBsAg reactivas [57]. Por lo tanto, en la mayoría de los casos se cree que el estado OBI se debería a una fuerte disminución de la replicación y expresión génica del HBV producida por la respuesta inmune.

8.1.2- Procesos epigenéticos: actualmente no se ha identificado ninguna mutación que se encuentre asociada a casos OBI y esté ausente en las muestras HBsAg reactivas. Sin embargo, sí se ha encontrado un patrón diferente de metilación, por tanto, los procesos epigenéticos podrían jugar un rol importante en los casos de OBI [58, 59]

8.1.3- Coinfección con HCV: se ha observado una alta prevalencia en pacientes coinfectados. Este hecho puede deberse a que el HCV disminuye fuertemente la replicación del HBV [53, 60].

8.2- Factores del huésped implicados en la presencia de OBI

Varios autores han demostrado que todas las condiciones de inmunosupresión que se inducen (neoplasias hematológicas, quimio-inmunoterapias, etc.) pueden modificar el estado de la infección de HBV, desde casos OBI a la reaparición de un perfil serológico típico de infección activa (HBsAg reactivas). Esto es una evidencia (aunque indirecta) de la importancia de la respuesta inmune del huésped en el desarrollo de OBI. [53, 45]. Un estudio *in vitro* muestra que la capacidad de replicación, la transcripción y la síntesis de proteínas aisladas de virus “ocultos” se puede restaurar completamente una vez que se sacan del hígado del huésped, sin embargo, los mecanismos por el cual los pacientes mantienen un bajo, pero estable nivel de replicación viral queda por definir [57]. Cuando estudiaron la respuesta inmune específica contra HBV en donantes de sangre (DS) de Barcelona, España, que presentaban OBI, sorprendentemente, en estos individuos se observó una respuesta de células T potente y multiespecífica contra distintos antígenos de HBV. En particular se observó un perfil Th1 específico para HBV cuantitativamente más fuerte en OBI que en los portadores inactivos, e incluso más fuerte que en pacientes con previa resolución de la infección. Estos datos permitieron a los autores arribar a la conclusión de que el sistema inmune del huésped tiene la capacidad de suprimir fuertemente la replicación del HBV, proporcionando de este modo una explicación plausible a la muy baja (o incluso ausente) carga viral y la falta de HBsAg detectable observada en individuos con OBI [61]. Varios datos relevantes sugieren que no sólo la respuesta inmune adaptativa, sino también la innata pueden desempeñar un rol en el control de la replicación viral. Experimentos de replicación con HBV en animales han demostrado que las citoquinas inflamatorias, tales como IFN de tipo I y TNF- α , pueden suprimir de manera eficiente la replicación viral por mecanismos no citolíticos [62].

8.3- Diagnóstico de OBI

No existen ensayos estandarizados para la detección de OBI. De acuerdo con la *Asociación Europea para el Estudio del Hígado*, la prueba *gold estándar* para el diagnóstico de OBI es el análisis de ADN a partir de extractos hepáticos así como también de muestras de sangre, mediante técnicas altamente sensibles y específicas, como la PCR convencional

o PCR en tiempo real utilizando cebadores para diferentes regiones genómicas del HBV, muy conservadas entre los diferentes genotipos. Sin embargo, muchas veces es difícil obtener muestras de tejido hepático, debido a la imposibilidad de realizar una biopsia de hígado. Así, el análisis de muestras de suero o plasma constituye el método más utilizado y ampliamente difundido para identificar casos de OBI [63].

8.4- Implicancia clínica de OBI

La importancia de la detección de OBI en términos de Salud Pública es la posibilidad de transmisión del HBV en transfusiones de sangre y trasplante de órgano hepático causando una hepatitis B clásica en los nuevos infectados o reaparición de enfermedad hepática con posible progresión a cronicidad en un individuo previamente infectado con HBV. También, OBI podría acelerar la progresión a cirrosis en pacientes infectados por HCV y producir reactivación y hepatitis aguda (a veces severa) en pacientes inmunosuprimidos o con quimioterapia. El riesgo de infección por HBV en transfusión se ha reducido drásticamente debido a la combinación de pruebas diagnósticas más sensibles EIA y el NAT. Esta última, tiene relevancia en la detección de individuos inmunoserológicamente no reactivos, ya que directamente se podría observar la presencia de ácidos nucleídos en suero. La detección de OBI en DS, personas que se presumen sanas, con serología reactiva para anti-HBc mejora la respuesta diagnóstica del laboratorio y la seguridad de los hemocomponentes para las transfusiones. Además, permite implementar medidas de seguimiento, control y en caso de ser necesario, instaurar el tratamiento adecuado [45,46,64-69].

Esquemáticamente, tres condiciones pueden ser responsables para la transmisión transfusional del HBV: **1.-** El donante se encuentra en el período de ventana (el HBsAg no reactivo, fase de viremia aguda temprana de la infección por el HBV), representa una minoría de los DS OBI-positivos. **2.-** El donante es un típico "portador OBI" con un virus de tipo salvaje en el que la actividad de replicación y la expresión genética son suprimidas. Este punto es importante y se debe tener en cuenta que OBI se caracteriza por períodos de viremia transitoria con períodos en los que el ADN viral es indetectable en el suero. Por lo tanto, un individuo con OBI puede tener un perfil de la infectividad en la sangre fluctuante en el tiempo y aquellos que presentan solo anti-HBc reactivo sin anti-HBs parecen ser más infectivos. **3.-** El donante está infectado con la variante de cepas del HBV S-mutantes que son competentes para la replicación, pero producen HBsAg anormales que no son

reconocidos por los equipos de detección disponibles comercialmente para detectar HBsAg. Esta condición parece ser una de las principales causas de casos residuales de transmisión del HBV por transfusión sanguínea. En este contexto, el uso de anticuerpos multivalentes anti-HBs en los equipos de detección de HBsAg ha sido recientemente recomendado por un panel de expertos para la identificación de DS infectados por cepas mutantes de escape de HBsAg, esta estrategia no es definitiva para resolver el problema de la infección post-transfusión HBV, especialmente en zonas geográficas en las que la infección por HBV es presenta una endemicidad alta y la variabilidad genómica viral es potencialmente más elevada. Por lo tanto, OBI parece presentar un escenario complejo con diferente virología y perfiles inmunológicos que deben ser abordados [63].

9- Epidemiología de la infección por HBV

9.1- Prevalencia

La Organización Mundial de la Salud (OMS) informó que existen actualmente más de 2.000 millones de personas infectadas con el HBV, y aproximadamente 240 millones son portadores crónicos de esta enfermedad, constituyendo un importante problema de salud a nivel mundial. La infección crónica por el HBV es la principal causa de cirrosis y HCC, produciendo aproximadamente, más de 780.000 muertes cada año [70]. El modo de transmisión perinatal es responsable del 21% de las muertes relacionadas con el HBV. Además, existen grupos con alto riesgo de contraer la infección por el HBV como trabajadores de la salud, usuarios de drogas inyectables (UDIs) y trabajadores sexuales. En América Latina, se ha reportado la vía sexual como la mayor fuente de infección [71]. Existe un amplio rango de tasas de prevalencias en función del HBsAg, en distintas partes del mundo (**Figura 9**). Las áreas con baja prevalencia (0,1-2%) son: oeste de Europa, Estados Unidos, Canadá, Australia y Nueva Zelanda. En los países del Mediterráneo, Japón, Asia central y partes de Sudamérica, la prevalencia alcanza niveles medios (2-8%); mientras que en el sudeste de Asia, China y África sub-Sahariana, la prevalencia es elevada (>8%) [72].

Argentina muestra bajas prevalencias para HBsAg en DS. Sin embargo, en Buenos Aires, se encuentran elevadas prevalencias en algunos grupos de riesgo, entre ellos pacientes infectados con HIV-1 y usuarios de drogas intravenosas (UDIs) [73-80]. En la

provincia de Misiones, se han documentado cifras de prevalencia para HBsAg en DS (0,72%) y en una comunidad Mbyá-guaraní (1,7%), superiores a la media Nacional [74, 81].

A nivel mundial, la prevalencia de OBI es heterogénea, si se tiene en cuenta la diferencia de sensibilidad y especificidad de los métodos utilizados para su detección, las diferentes poblaciones donde se ha estudiado la misma y, considerando además, la dificultad de realizar la punción hepática para establecer estas cifras [63, 82-103].

En Argentina, OBI ha sido detectada en pacientes coinfectados con HIV y/o HCV y en diferentes grupos de amerindios de Misiones y San Juan [81, 104]

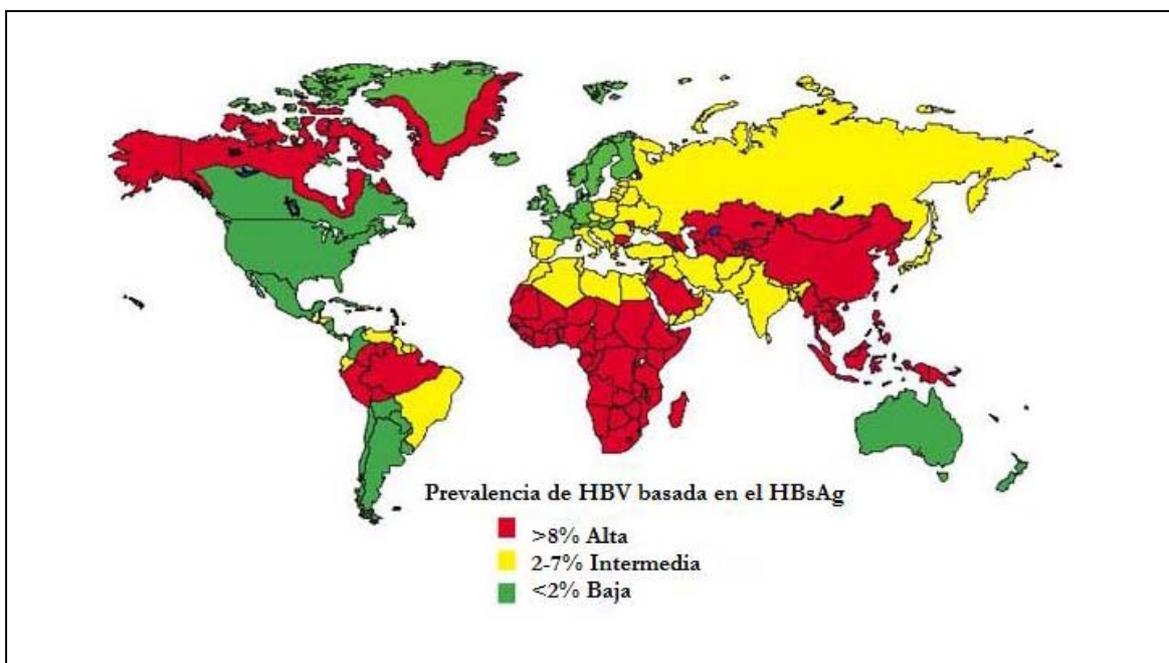


Figura 9. Distribución mundial de la prevalencia basada en el HBsAg [72].

9.2- Genotipos

Actualmente, la variabilidad genética del HBV permite clasificarlo en nueve genotipos (A-H, J), y múltiples subgenotipos, sobre una divergencia del 8% y 4% basada en secuencias de genoma completo, respectivamente. Sin embargo, nuevas clasificaciones contemplan 10 genotipos. Se observa que los genotipos tienen diferente distribución geográfica (**Figura 10**) [72,105, 106].

Los genotipos A, B, C, D, E, F y H fueron detectados en diferentes poblaciones de Argentina como la de DS y pacientes crónicamente infectados con HBV [107-110].

La evidencia hasta la fecha asocia la evolución del curso natural de la infección, el cuadro clínico inicial, y la respuesta al tratamiento antiviral con los genotipos/subgenotipos del HBV involucrados [110-118]. Diferentes estudios han demostrado que el genotipo A está asociado a un mejor pronóstico de la enfermedad y mayor sobrevida, y el genotipo C con una enfermedad más severa [113]. Asimismo, distintos autores han asociado al genotipo F con una mayor tasa de mortalidad y han demostrado que es el genotipo que prevalece en pacientes con HCC (68% en esquimales de Alaska). Además, han observado que en pacientes infectados con dicho genotipo, el tiempo promedio requerido para el desarrollo del HCC es menor que para los otros (22,5 vs 60 años al cabo del diagnóstico inicial de infección por HBV, respectivamente) [119,120]. Con respecto a la respuesta al tratamiento antiviral, se observó que los pacientes infectados con genotipo A o B responden mejor al tratamiento con el INF- α que los infectados con los genotipos C o D [113,121]. Asimismo, se ha demostrado que la emergencia de mutantes del HBV resistentes al tratamiento antiviral con LMV en el subgenotipo A2 como el genotipo D presentan un polimorfismo en los codones 217 y 233, respectivamente de la polimerasa (rtL217R y rtI233V), que le otorga resistencia natural al análogo de nucleótido adefovir [122].

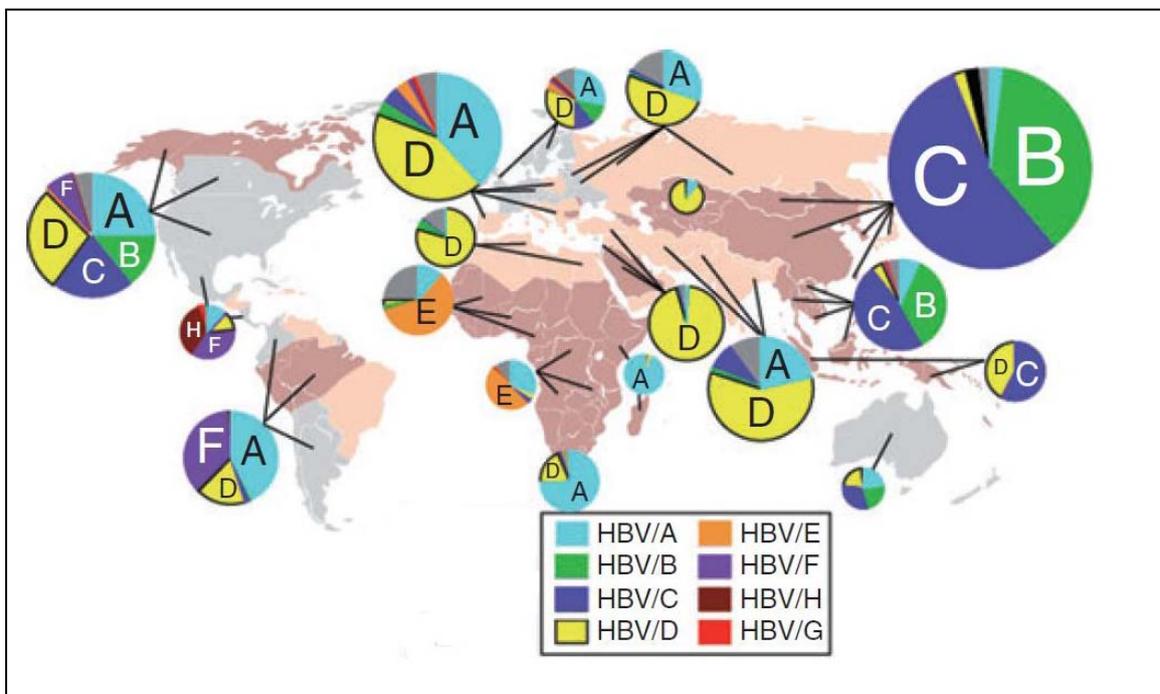


Figura 10. Distribución mundial de genotipos de HBV [72].

II- Objetivos

Objetivo general:

Describir las características epidemiológicas de la infección por el virus de la Hepatitis B (HBV) y caracterizar los casos de infección oculta por HBV (OBI) en una población de donantes de sangre de la provincia de Misiones.

Objetivos específicos:

- 1- Describir las características generales (sexo, edad y tipo de donante) de la población de donantes de sangre del Banco de Sangre Tejidos y Biológicos evaluada entre los años 2007 y 2013
- 2- Determinar la prevalencia y distribución de los marcadores inmunoserológicos anti-HBc y/o HBsAg en la población estudiada.
- 3- Hallar la prevalencia y analizar las características de los casos OBI con anti-HBc reactivos en una muestra de la población estudiada.
- 4- Identificar los genotipos de HBV en los casos de OBI detectados.
- 5- Detectar la presencia de mutaciones no sinónimas en dominios funcionales de los genes preCore/Core, S, Polimerasa y X de HBV en los aislamientos a partir de los casos de OBI.

III- Metodología

1- Población estudiada

Se estudió la totalidad de DS que concurrieron voluntariamente al Banco de Sangre Tejidos y Biológicos (BSTB) de la provincia de Misiones entre los años 2007 – 2013 y que fueron calificados para realizar la donación. La donación de sangre en el sector público, al igual que un gran porcentaje de las instituciones privadas de la provincia de Misiones, se encuentra centralizada en el BSTB.

1.1- Tipo de estudio

Se realizó un estudio de tipo descriptivo transversal en DS del BSTB entre los años 2007 – 2013.

1.2- Criterios de Inclusión

Se consideraron criterios de inclusión a todos los establecidos en la Ley Nacional de Sangre N°22.990 y las normas técnicas y administrativas de servicios de hemoterapia, entre los cuales se manifiesta que la donación de sangre es un acto de disposición voluntaria, solidaria o altruista, mediante el cual una persona acepta su extracción para fines exclusivamente médicos no estando sujeta a remuneración o cobro alguno. Se enumera las condiciones de inclusión y exclusión para ser donante: a) poseer entre 16 y 65 años; y en el caso de los menores de 18 años presentar autorización de sus padres; b) someterse obligatoriamente a una entrevista clínica con preguntas de denuncia inexcusable de toda enfermedad o afección padecida o presente, la que tendrá carácter y alcance legal de declaración jurada; y c) Examen físico que incluye la valoración del peso, presión arterial, frecuencia cardíaca, hemoglobina y temperatura que permite la verificación del estado de salud óptimo para donar sangre y descartar la existencia de alguna patología [123, 124].

1.3- Criterio de exclusión

DS que no presentaron la detección inmunoserológica completa que incluye siete infecciones transmisibles por transfusión (ITT) que por normativa nacional se deben estudiar (virus de la hepatitis C (HCV), Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV) Virus Linfotrópico T Humano tipo I y II (HTLV), HBV, Chagas, Brucelosis, Sífilis) [124].

Para el análisis de datos final, se excluyeron todos los datos correspondientes a las subsiguientes donaciones realizadas por los DS repetidos.

1.4- Aspectos éticos

Todos los donantes que se incluyeron en el estudio firmaron un consentimiento libre e informado aprobado por el comité de ética del Hospital Escuela de Agudos "Dr. Ramón Madariaga" (ANEXO 1).

2- Obtención de datos epidemiológicos

Para la obtención de los datos del sexo, edad, localidad de residencia y departamento de residencia de los DS, se utilizó el cuestionario estandarizado utilizado en la entrevista personal, de acuerdo con la normativa nacional (ANEXO 2 y 3). Estos datos se encontraban ingresados en el sistema informático del BSTB, desde donde finalmente se obtuvieron los mismos [124].

3- Obtención de muestras para marcadores inmunoserológicos de HBV

Las muestras para los marcadores inmunoserológicos de infección por HBV fueron obtenidas mediante el procedimiento estandarizado de las donaciones de sangre que incluye una muestra de la sangre extraída al DS, que es colocada en un tubo primario, que posteriormente se centrifuga para la separación del suero, al cual se le realiza las determinaciones inmunoserológicas para la detección de las ITT. Fueron procesadas todas las muestras que cumplieron con los criterios de inclusión entre los años 2007 – 2013.

4- Diagnóstico inmunoserológico de la infección por HBV

Las muestras para la determinación de los marcadores inmunoserológicos de infección por HBV (HBsAg y anti-HBc), así como el anti-HBs fueron procesadas diariamente en el área de inmunoserología del BSTB de la provincia de Misiones. La detección de marcadores serológicos de HBV se realizó con equipos comerciales mediante técnicas de tamizaje de tipo enzimoimmunoensayo en microplaca y de quimioluminiscencia.

4.1- Detección de HBsAg y Anti-HBc

Las técnicas de tamizaje de tipo enzimoimmunoensayo en microplaca utilizadas fueron de las marcas: Biomerieux (Holanda), Wiener Lab (Argentina), Murex (Alemania), Biokit (España) y Bio-Rad (Francia) y se procesaron de manera automatizada en los equipos Genesis RMP 100 – TECAN (Suiza) y/o Alisei – SEAC RADIM (Italia). Las técnicas de tamizaje de tipo quimioluminiscencia utilizadas fueron de la marca: Abbott (Alemania) y se procesaron de manera automatizada en los equipos AxSYM (Alemania) y/o Architect System (Alemania). Todas las técnicas inmunoserológicas utilizadas fueron procesadas con calibradores y controles internos comerciales, así como también con controles internos multi-reactivos y controles externos provistos por el Servicio de Hemoterapia del Hospital Garrahan.

Los datos de los resultados de las muestras luego de su procesamiento fueron transmitidos de manera electrónica on-line al sistema informático del BSTB desde donde finalmente se obtuvieron los mismos.

Las muestras negativas para HBsAg y reactivas para anti-HBc que fueron utilizadas para el diagnóstico de OBI, fueron re-analizadas, en una segunda instancia, para los mismos marcadores de manera automatizada con técnicas de tipo quimioluminiscencia de la marca: Abbott (Alemania) en un equipo Architect System (Alemania).

La positividad para anti-HBc se consideró confirmada sólo si se obtuvieron dos resultados positivos.

Todos los sueros anti-HBc-positivos se ensayaron repetidamente para el HBsAg de manera automatizada con técnicas de tipo quimioluminiscencia de la marca Abbott (Alemania) en un equipo Architect Sistem (Alemania).

5- Obtención de muestras para diagnóstico de infección oculta por HBV (OBI)

Para establecer la presencia de OBI se realizó un muestreo por conveniencia tomando todos los DS consecutivos del BSTB del año 2013 que presentaban inmunoserología reactiva para anti-HBc y fueron no reactivos para HBsAg hasta completar el tamaño muestral calculado. Para el cálculo del tamaño muestral se consideró una frecuencia de 18 % de OBI en población general con elevada prevalencia de HBV, de una comunidad de Canadá, con anti-HBc reactivo [125], un intervalo de confianza del 5 % y una precisión del 5 %, obteniéndose una cifra de 227 muestras de plasma de DS para la detección de OBI. En base a estos cálculos, se extrajeron las muestras desde las bolsas de plasmas de los DS antes mencionados, que se encontraban conservadas a -80°C. Las alícuotas de plasma de dichas bolsas fueron conservadas en tubos eppendorf debidamente rotulados a -80°C hasta su procesamiento.

6- Diagnóstico molecular de la infección oculta por HBV

6.1- Extracción de ADN

Se utilizó un método comercial (QIAamp DNA blood kit (Qiagen, Suiza)) mediante el cual se procesaron 200 µl de plasma según el protocolo descrito por el fabricante. El ADN fue conservado a -80 °C hasta su posterior utilización al día siguiente. Se realizaron tres extracciones de ADN independientes de cada una de las muestras, junto a controles positivos (plasma de seroteca de pacientes conocidos positivos para la región amplificada del gen del HBV) y negativos (plasma de seroteca de primera donación de DS voluntarios repetidos negativos).

6.2- Amplificación parcial del gen S/P de HBV (PCR-S)

La amplificación de una región parcial del gen S del HBV se realizó mediante la utilización del protocolo descrito previamente por Lindh [126]. Se amplificó un fragmento de 541 pb de la región parcial del gen S/P ubicada entre las posiciones nucleotídicas 256 a 796, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se siguieron las normas de Kwok & Higuchi [127] y se realizaron las determinaciones por

duplicado, en cada una de las tres extracciones de ADN de cada muestras junto a los controles.

6.2.1- Mezcla de reacción: Buffer (10X) 3,00 µl; dNTPs (10 mM) 0,40 µl; MgCl₂ (50 mM) 1,75 µl; P7 (10 µM) 0,50 µl; P8 (10 µM) 0,525 µl; Taq ADN Polimerasa (0,50 U) 0,25 µl, H₂O Sigma (libre de ácidos nucleídos) 20µl. ADN 10 µl. Volumen final de la reacción: 30 µl.

6.2.2- Primers utilizados:

P7 (sentido): 5' GTGGTGGACTTCTCTCAATTT TC 3'.

P8 (anti-sentido): 5' CGGTA(A/T)AAAGGGACTCA(A/C)GAT 3'.

6.2.3- Ciclado: 3' a 94° C, 40 ciclos de 45'' a 94° C, 60'' a 53° C y 90'' a 72° C, finalizando con una extensión de 7' a 72° C. Todas las reacciones de PCR descritas se realizaron en un ciclador térmico Mastercycler gradient (Eppendorf, Alemania).

6.2.4- Siembra: se sembraron los productos de amplificación en un gel de agarosa al 1,2% teñido con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y se realizó la corrida electroforética a 100 V durante 30 min.

6.2.5- Lectura: la lectura de las bandas en los geles fue realizada inmediatamente por dos operadores independientes, a cámara oscura con luz UV.

El límite de detección de la PCR-S fue de 498 UI/ml, el cual se estimó realizando diluciones seriadas de una muestra de un DS infectado por HBV con una carga viral de HBV conocida.

6.3- Amplificación de la región genómica preCore-Core de HBV (PCR-C)

La amplificación de un fragmento de 735 pb -entre las posiciones nucleotídicas 1684 a 2484 se realizó mediante nested PCR (n-PCR) de la región del preCore-Core (pC/C), siguiendo el protocolo descrito previamente por Birkenmeyer [128]. Se siguieron las normas de Kwok & Higuchi [127], y se realizaron las determinaciones por duplicado, en cada una de las tres extracciones de ADN de cada muestras junto a los controles.

6.3.1- Mezcla de reacción:

1° Ronda: Buffer (10X) 2,50 µl; dNTPs (10 mM) 0,50 µl; MgCl₂ (50 mM) 1,25 µl; C1 (10 µM) 0,125 µl; C2 (10 µM) 0,125 µl; Taq ADN Polimerasa (0,50 U) 0,25 µl, H₂O Sigma (libre de ácidos nucleídos) c.s.p. 20µl. ADN 5 µl. Volumen final de la reacción: 25µl.

2° Ronda: Buffer (10X) 2,50 µl; dNTPs (10 mM) 0,50 µl; 3) MgCl₂ (50 mM) 1,25 µl; C3 (10 µM) 0,125 µl; C4 (10 µM) 0,125 µl; Taq ADN Polimerasa (0,50 U) 0,25 µl; H₂O Sigma (libre de ácidos nucleídos) c.s.p. 20µl. ADN 5 µl. Volumen Final: 25 µl.

6.3.2- Primers:

1° Ronda

C1 (sentido): 5' GTCAACGACCGACCTTGAGGC 3'.

C2 (anti-sentido): 5' CCCACCTTATGAGTCCAAGG 3'.

2° Ronda

C3 (sentido): 5' GAGGAGTTGGGGGAGGAGATT 3'

C4 (anti-sentido): 5' TCCAAGGGATACTAACATTTGA 3'.

6.3.3- Ciclado para ambas rondas de PCR: 3' a 94° C, 40 ciclos de 45'' a 94° C, 60'' a 53° C y 90'' a 72° C, finalizando con una extensión de 7' a 72° C.

6.3.4- Siembra: se sembraron los productos de amplificación en un gel de agarosa al 1,2% teñido con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y se realizó la corrida electroforética a 100 V durante 30 min.

6.3.5- Lectura: la lectura de las bandas en los geles fue realizada inmediatamente por dos operadores independientes, a cámara oscura con luz UV.

El límite de detección de la PCR C fue de 249 UI/ml, el cual se estimó realizando diluciones seriadas de una muestra de un DS infectado por HBV con una carga viral de HBV conocida.

6.4- Secuenciación nucleotídica de las regiones S/P y pC/C de HBV

Los productos de PCR obtenidos de la amplificación parcial del gen S/P de HBV (PCR-S) y de la región genómica preC-C de HBV (PCR-C) fueron purificados para remover restos de nucleótidos y *primers* excedentes, y luego se secuenciaron en un secuenciador automático abarcando doble marco de lectura.

6.4.1- Reacción de purificación: se mezclaron 5 μ l del producto de PCR con 2 μ l de ExoSAP-IT. Se incubó a 37°C durante 15' y luego a 80°C durante 15' para inactivar la enzima.

6.4.2- Mezcla de reacción: se preparó utilizando el kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied BioSystems), la mezcla de reacción se compuso de 1 μ l de BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix; 1,5 μ l de 5X Sequencing Buffer; 5,5 μ l de agua Sigma; 1 μ l de oligonucleótidos (4 μ M) y 1 μ l del amplicón (30 ng/ μ l).

6.4.3- Primers utilizados: los oligonucleótidos empleados fueron los mismos que los utilizados en la amplificación de los amplicones correspondiente.

6.4.4- Ciclado: 5' a 96°C, 24 ciclos de 10'' a 96°C, 10'' a 50°C, 4' a 60°C y una extensión final de 5' a 60°C.

6.4.5- Precipitado: luego del ciclado, el producto fue precipitado con el siguiente protocolo utilizado para una placa de 96 pocillos. Se prepararon las soluciones 1 (Sc1: 3,6 ml de alcohol + 1,2 ml de agua) y 2 (Sc2: 14 ml de alcohol + 6 ml de agua) que fueron utilizadas para el protocolo de precipitación: a) se colocó 40 μ l de Sc1 a cada pocillo b) se homogeneizó con un agitador tipo vórtex; c) se incubó 10 min en oscuridad; d) se centrifugó 30 min a 2500g; f) se descartó el sobrenadante por inversión; g) se colocó 150 μ l de Sc2 a cada pocillo; h) se homogeneizó con vórtex; i) se centrifugó 10 min a 2000g; j) se descartó el sobrenadante por inversión; k) se centrifugó 20 seg a 400g; m) se adicionó 10 μ l de formamida a cada pocillo; n) se homogeneizó con vórtex ; y l) se centrifugó 20 seg a 400g.

6.4.6- Secuenciación: la secuenciación final se realizó en el equipo automático ABI Prism 3100 Genetic Analyzer - Applied Biosystems (Estados Unidos).

6.5- Análisis filogenético del HBV

Los cromatogramas obtenidos fueron editados utilizando el programa Bioedit 7.1 [129]. Las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron alineadas con el software CLUSTALX [130], junto a secuencias del GenBank de todos los genotipos y subgenotipos provenientes de diferentes regiones geográficas del mundo, de la Argentina y de la provincia de Misiones. Para cada región genómica amplificada se construyó un árbol filogenético por medio del algoritmo de Neighbor-joining (NJ) con el modelo de evolución molecular Kimura-two-parameter dentro del programa MEGA v 4.0 analizando de manera estadística mediante Bootstrap 1000 réplicas de datos [131].

6.6- Análisis de variabilidad génica del HBV

6.6.1- Análisis de mutaciones en el promotor basal del core y región preCore

Se analizaron las sustituciones nucleotídicas de las secuencias correspondientes al BCP y a la región regulatoria del pC. Dichas secuencias fueron alineadas y comparadas con secuencias de todos los genotipos (y subgenotipos) obtenidas del GenBank mediante la utilización del programa BioEdit [129]. Se prestó especial interés a las sustituciones nucleotídicas 1753, 1762, 1764, 1846, 1896, 1899, asociadas -entre otros eventos- al desarrollo de HCC.

6.6.2-Análisis de secuencias aminoacídicas de la región S, Polimerasa, Core y X

Las secuencias aa deducidas para cada ORF fueron alineadas y comparadas con secuencias de aa del mismo genotipo (y subgenotipo) obtenidas del GenBank mediante la implementación del programa BioEdit [132, 133]. Se prestó especial interés a sustituciones de aa en epítopes para Linfocitos T en el HBcAg asociadas al escape de la respuesta inmune celular.

7- Estudio complementario inmunoserológico: detección de anticuerpos anti-HBs

En las muestras que resultaron reactivas para anti-HBc se les realizó la detección de anticuerpos anti-HBs. La técnica utilizada fue de tipo quimioluminiscencia de la marca Abbott (Alemania) y se procesaron de manera automatizada en los equipos AxSYM (Alemania) y/o Architect System (Alemania), junto a los calibradores y controles de la propia marca. Los datos de los resultados de las muestras luego de su procesamiento fueron transmitidos de manera electrónica on-line al sistema informático del BSTB desde donde finalmente se obtuvieron los mismos.

8- Análisis estadístico

Los datos del sistema informático utilizado en el BSCM se transfirieron a un archivo tipo .txt y posteriormente se analizaron con el programa SPSS Statistics 17.0 y Excel. Para el análisis de los resultados se utilizaron los estadísticos descriptivos de frecuencia e intervalo de confianza del 95% (IC95%), media y desvío estándar y para la comparación entre grupos las prueba de ji-cuadrado (χ^2) y U de Mann Witney (U), con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).

IV- Resultados

1- Características generales de la población de DS que concurrió entre los años 2007 y 2013 al Banco de Sangre Tejidos y Biológicos (BSTB)

Sobre un total de 53247 donantes (repetidos y de primera vez) que concurrieron al BSTB durante el período 2007 – 2013 y considerando los criterios de inclusión y exclusión establecidos en el estudio, se incluyeron para el análisis final 42887 DS. La edad media de los DS fue de 34,7±11,1 años y el 70,4% correspondió al sexo masculino. Se observó un incremento gradual de las donaciones repetidas y de DS femenino, manteniéndose estable el promedio de edad de los DS (**Tabla 2**).

Tabla 2. Distribución por año, sexo y edad de los donantes de sangre que concurrieron al BSTB durante el período 2007 – 2013.

Año	Total				DS Masculino (primera vez)		DS Femenino (primera vez)	
	Muestras DS n (%)	DS repetidos n (%)	DS (primera vez) n (%)	Edad*	n (%)	Edad*	n (%)	Edad*
2007	3865 (7,3)	143 (3,7)	3722 (96,3)	34,7±10,7	2654 (71,3)	34,9±10,6	1068 (28,7)	34,2±10,9
2008	6800 (12,8)	643 (9,5)	6157 (90,5)	34,8±11,1	4421 (71,8)	35,5±11,0	1736 (28,2)	33,1±11,1
2009	6536 (12,3)	1116 (17,1)	5420 (82,9)	34,6±11,1	3929 (72,5)	35,2±11,0	1491 (27,5)	33,7±11,2
2010	7611 (14,3)	1426 (18,7)	6185 (81,3)	34,8±11,1	4612 (74,6)	35,3±10,9	1573 (25,5)	34,0±11,4
2011	9382 (17,6)	2048 (21,8)	7334 (78,2)	34,4±11,3	5189 (70,8)	35,3±11,2	2145 (29,2)	33,5±11,0
2012	9779 (18,4)	2442 (25,0)	7337 (75,0)	34,8±11,2	5088 (69,3)	35,5±11,1	2249 (30,7)	34,3±11,1
2013	9274 (17,4)	2542 (27,4)	6732 (62,6)	34,7±11,2	4310 (64,0)	36,2±11,1	2422 (36,0)	34,0±10,9
Total	53247 (100,0)	10360 (19,5)	42887 (80,5)	34,7±11,1	30203 (70,4)	35,1±11,1	12684 (29,6)	33,7±11,0

*media ± desvío estándar en años

2- Prevalencia y distribución de los marcadores anti-HBc y/o HBsAg.

A partir de 42887 DS de primera vez estudiados en el BSTB entre los años 2007 – 2013, 3622 presentaron marcadores HBsAg y/o anti-HBc, resultando en una prevalencia final de 8,4 % (IC95%= 8,2-8,7%), correspondiendo 7,7% (n=3293) al Ac anti-HBc, 0,1% (n=64) HBsAg y 0,6% (n=265) para ambos (**Figura 11**).

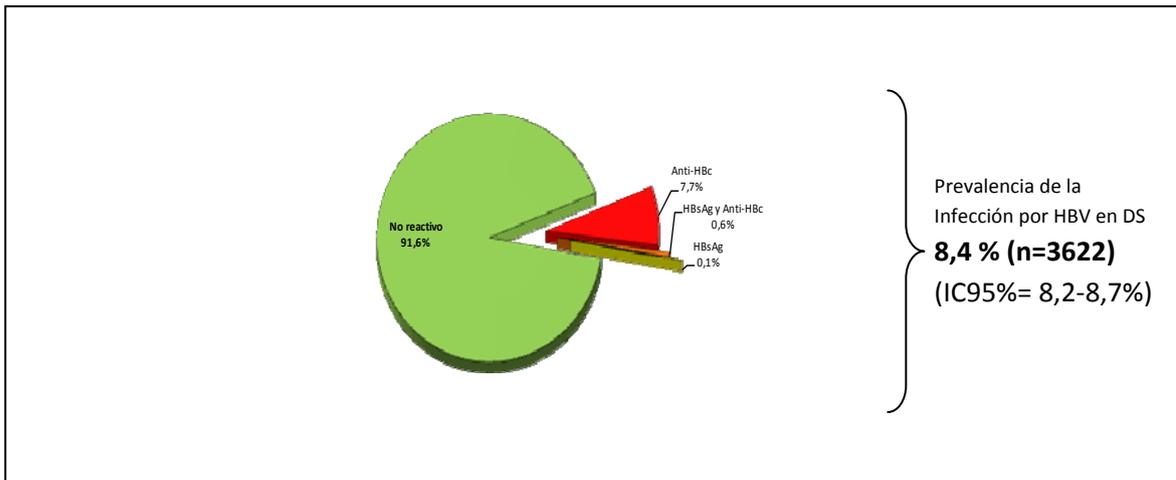


Figura 11. Prevalencia total de infección por el HBV basada en los marcadores HBsAg y/o anti-HBc en 42887 donantes de sangre de primera vez del BSTB durante el período 2007 – 2013.

Las cifras de prevalencia de infección por HBV en DS en el año 2007 fue de 9,3% (n=348) (IC95%=8,4-10,3%) y en el año 2013 la misma disminuye de manera significativa a un valor de 5,8% (n=390) (IC95%=5,2-6,4%) (**Tabla 3**).

Tabla 3. Distribución por año de la prevalencia de infección por HBV basada en los marcadores HBsAg y/o anti-HBc en 42887 donantes de sangre de primera vez del BSTB durante el período 2007 – 2013.

Año	DS (primera vez)	Prevalencia de HBV*		Anti-HBc		Anti-HBc y HBsAg		HBsAg	
	n	n	%	n	%	n	%	n	%
2007	3722	348	9,3	290	7,8	40	1,1	18	0,5
2008	6157	636	10,3	581	9,4	49	0,8	6	0,1
2009	5420	531	9,8	485	8,9	39	0,7	7	0,1
2010	6185	580	9,4	541	8,7	34	0,5	5	0,1
2011	7334	607	8,3	546	7,4	46	0,6	15	0,2
2012	7337	530	7,2	494	6,7	27	0,4	9	0,1
2013	6732	390	5,8	356	5,3	30	0,4	4	0,1
Total	42887	3622	8,4	3293	7,7	265	0,6	64	0,1

*Prevalencia de HBV= prevalencia de infección por HBV basada en los marcadores HBsAg y/o anti-HBc.

Considerando el sexo, en los DS hombres se observó una prevalencia de infección por HBV de 9,2% (HBsAg=reactivo y/o anti-HBc= reactivo), significativamente mayor

con respecto a las mujeres ($\chi^2=72,7$; $p<0,001$) y la edad resultó significativamente mayor en aquellos DS que presentaban infección por HBV ($U=4,7 \times 10^7$; $p<0,001$) (**Tabla 4**).

Tabla 4. Distribución por género y edad de la prevalencia de la infección por HBV basada en los marcadores HBsAg y/o anti-HBc en 42887 donantes de sangre de primera vez del BSTB durante el período 2007 – 2013.

GENERO	Total de Donantes de Sangre			Prevalencia de HBV*			
	n	%	Edad**	n	%	IC95%***	Edad
MUJERES	12684	29,6	33,7±11,0	856	6,7	6,2-6,7	39,5±10,6
HOMBRES	30203	70,4	35,1±11,1	2766	9,2	8,8-9,5	39,6±11,4
TOTAL	42887	100	34,7±11,1	3622	8,4	8,2-8,7	39,6±10,9

*Prevalencia de HBV= prevalencia de infección por HBV basada en los marcadores HBsAg y/o anti-HBc.

**media ± desvío estándar en años.

***IC95%= Intervalo de Confianza del 95%

Los DS provinieron principalmente del departamento Capital (35,2%), seguido por los departamentos de Oberá (11,8%), Eldorado (8,0%) e Iguazú (6,5%) (**Tabla 5**).

La distribución de los casos de DS con marcadores de infección de HBV en relación a los 17 departamentos de la provincia de Misiones, permitió observar como los departamentos de Gral. Manuel Belgrano, Guaraní y San Pedro presentaron prevalencias superiores al doble de la media provincial (**Tabla 5**).

En la **figura 12** se observa la endemidad de la infección por el HBV basada en la prevalencia del HBsAg; con cifras medias que varían entre 2 y 8% para los departamentos del noreste de la provincia (Gral. Manuel Belgrano, Guaraní y San Pedro) limítrofes con Brasil.

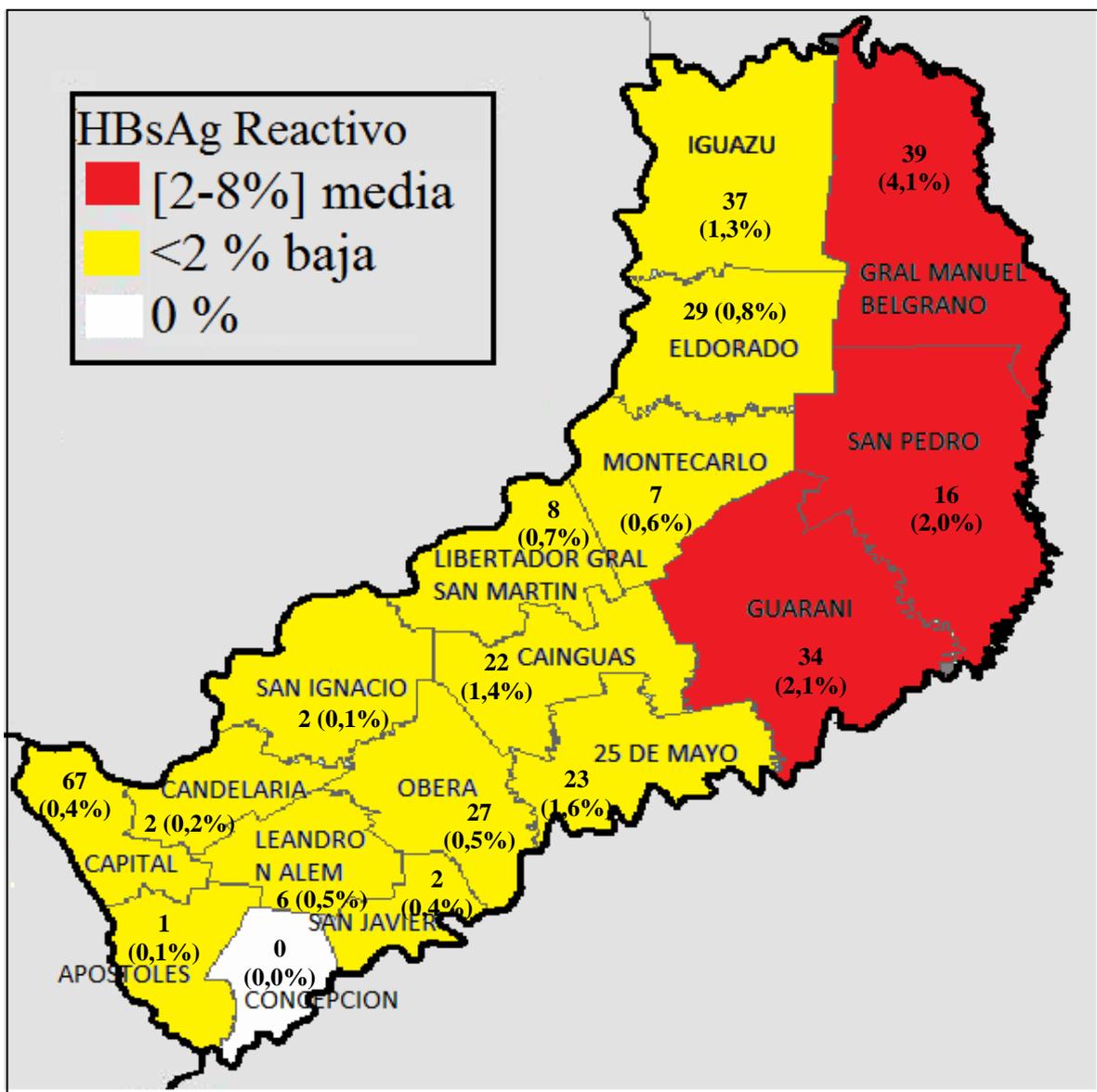
Tabla 5. Distribución geográfica por departamentos provinciales y otras áreas geográficas de la prevalencia de la infección por HBV basada en los marcadores HBsAg y/o anti-HBc en 42887 donantes de sangre de primera vez del BSTB durante el período 2007 – 2013.

	Total de Donantes de Sangre		Prevalencia de HBV*		
	n	%	n	%	IC95%**
DEPARTAMENTO/ AREA GEOGRAFICA					
25 DE MAYO	1458	3,4	212	14,5	12,8-16,5
APOSTOLES	1157	2,7	28	2,4	1,6-3,5
CAINGUAS	1590	3,7	174	10,9	9,5-12,6
CANDELARIA	904	2,1	18	2,0	1,2-3,2
CAPITAL	15105	35,2	622	4,1	3,8-4,5
CONCEPCION	210	0,5	0	0,0	0,0-2,2
ELDORADO	3425	8,0	384	11,2	10,2-12,3
MISIONES					
GRAL MANUEL BELGRANO	959	2,2	324	33,8	30,8-36,9
GUARANI	1587	3,7	430	27,1	24,9-29,4
IGUAZU	2777	6,5	447	16,1	14,8-17,5
LEANDRO N ALEM	1132	2,6	42	3,7	2,7-5,0
LIBERTADOR GRAL SAN MARTIN	1083	2,5	86	7,9	6,4-9,8
MONTECARLO	1200	2,8	116	9,7	8,1-11,5
OBERA	5054	11,8	277	5,5	4,9-6,2
SAN IGNACIO	1437	3,4	80	5,6	4,5-6,9
SAN JAVIER	465	1,1	18	3,9	2,4-6,2
SAN PEDRO	782	1,8	200	25,6	22,6-28,8
PARAGUAY	1591	3,7	106	6,7	5,5-8,0
CORRIENTES	387	0,9	13	3,4	1,9-5,8
BUENOS AIRES y CAPITAL FEDERAL	410	1,0	27	6,6	4,5-9,6
OTROS	174	0,4	18	10,3	6,4-16,1
TOTAL	42887	100	3622	8,4	8,2-8,7

*Prevalencia de HBV= prevalencia de infección por HBV basada en los marcadores HBsAg y/o anti-HBc.

**IC95%= Intervalo de Confianza del 95%

Figura 12. Endemicidad de la infección por HBV basada en el marcador HBsAg en 42887 donantes de sangre de primera vez del BSTB durante el período 2007 – 2013.



3- Detección de infección oculta por HBV (OBI) en DS con anticuerpos anti-HBc reactivos

De un total de 230 muestras de DS de primera vez estudiados en el BSTB en el año 2013 que presentaban como único marcador reactivo los anticuerpos anti-HBc, se hallaron 36 muestras positivas por técnicas moleculares, lo que determinó una prevalencia de casos OBI de 15,6% (IC95%= 11,3-21,2%). Del total, 10 casos amplificaron un fragmento del gen S/P de HBV y 26 la región genómica preCore-Core de HBV; ninguna muestra amplificó ambas regiones en las condiciones utilizadas (**Tabla 6**).

Al comparar la presencia o ausencia de OBI entre grupos de DS con reactividad o no para anticuerpos anti-HBs, no se observó diferencia significativa ($\chi^2=0,06$; $p=0,81$) (**Tabla 7**). Tampoco se encontró asociación estadísticamente significativa de la presencia OBI con respecto al sexo ($\chi^2=0,143$; $p=0,70$), la edad ($U=3294$; $p=0,74$) o el departamento de residencia ($\chi^2=14,935$; $p=0,53$).

Tabla 6. Perfil de la infección oculta por HBV (OBI) basado en datos epidemiológicos, anti-HBs, amplificación por PCR (región S y pC/C), genotipo y subgenotipo de las 36 muestras positivas para ADN del HBV en DS del BSTB de la provincia de Misiones.

Muestra	Sexo	Edad	Departamento	Localidad	Anti-HBs*	PCR S*	PCR pC/C*	Genotipo-Subgenotipo
10021994	H	42,0	Capital	Posadas	R*	Positivo	Negativo	NA*
10022041	H	33,6	Capital	Garupá	R	Negativo	Positivo	NA
10022180	H	38,7	Capital	Posadas	R	Positivo	Negativo	NA
10022373	H	49,1	Capital	Posadas	R	Negativo	Positivo	NA
10022723	H	63,7	25 de Mayo	25 de Mayo	R	Negativo	Positivo	D-3
10022990	H	30,8	Capital	Posadas	R	Positivo	Negativo	NA
10023173	M	30,4	Capital	Posadas	R	Negativo	Positivo	NA
10023373	H	27,9	Apóstoles	Apóstoles	R	Negativo	Positivo	D-3
10023834	H	38,1	Capital	Posadas	R	Positivo	Negativo	NA
10024157	H	48,3	San Ignacio	Santo Pipo	R	Positivo	Negativo	NA
20010831	H	31,3	Eldorado	Delicia	R	Negativo	Positivo	NA
20011124	M	30,6	Eldorado	Eldorado	R	Negativo	Positivo	NA
20011213	H	53,8	Montecarlo	Montecarlo	R	Negativo	Positivo	NA
20011267	H	35,9	25 De Mayo	25 De Mayo	NR*	Negativo	Positivo	D-3
20011269	M	27,1	Montecarlo	Puerto Piray	R	Negativo	Positivo	NA
20011313	H	30,3	Gral. Manuel Belgrano	San Antonio	NR	Negativo	Positivo	NA
20011315	M	52,3	Eldorado	Eldorado	R	Positivo	Negativo	NA
50010313	M	43,0	Iguazú	Puerto Esperanza	R	Positivo	Negativo	NA
50012527	H	33,0	Iguazú	Puerto Iguazú	R	Positivo	Negativo	NA
50012528	M	43,3	Iguazú	Puerto Iguazú	R	Negativo	Positivo	D-3
50012680	H	25,2	Libertador Gral. San Martin	Puerto Leoni	R	Negativo	Positivo	NA
50012762	H	51,3	25 de Mayo	25 de Mayo	R	Negativo	Positivo	NA
50012766	H	57,4	25 de Mayo	25 de Mayo	R	Positivo	Negativo	NA
50012826	M	46,8	Iguazú	Puerto Esperanza	R	Negativo	Positivo	NA
50012872	H	53,0	Leandro N Alem	Leandro N Alem	R	Negativo	Positivo	NA
50012969	M	42,4	San Pedro	San Pedro	R	Negativo	Positivo	D-3
50012971	H	45,7	San Pedro	San Pedro	R	Negativo	Positivo	D-3
50012982	H	31,6	San Pedro	San Pedro	NR	Negativo	Positivo	NA
50013200	H	54,8	Eldorado	Eldorado	R	Negativo	Positivo	NA
50013272	M	43,4	Eldorado	Eldorado	R	Negativo	Positivo	NA
50013385	H	61,4	Iguazú	Puerto Esperanza	R	Negativo	Positivo	NA
60006993	H	48,9	Cainguas	Aristóbulo del Valle	R	Negativo	Positivo	NA
60007341	H	61,3	Guaraní	El Soberbio	NR	Positivo	Negativo	NA
60007612	H	31,3	25 De Mayo	25 De Mayo	R	Negativo	Positivo	D-3
60007848	H	43,1	Oberá	Oberá	R	Negativo	Positivo	NA
60007889	H	33,6	Guaraní	San Vicente	NR	Negativo	Positivo	NA

*Anti-HBs= anticuerpos anti HBsAg *PCR S= Reacción en Cadena de la Polimerasa de la región parcial del gen S/P *PCR pC/C= Reacción en Cadena de la Polimerasa de la región del preCore/Core. *NA= No Amplificado. *R=Reactivo. *NR=No Reactivo.

Tabla 7. Prevalencia de la infección oculta por HBV (OBI) distribuida en base a la presencia de anticuerpos anti-HBs.

Infección oculta por HBV	Anticuerpos anti-HBs REACTIVO			Anticuerpos anti-HBs NO REACTIVO			TOTAL de muestras analizadas		
	n	%	IC95%*	n	%	IC95%	n	%	IC95%
PRESENCIA	31	15,9	11,2-22,0	5	14,3	5,5-31,2	36	15,6	11,3-21,2
AUSENCIA	164	84,1	78,1-88,9	30	85,7	69,9-95,6	194	84,4	78,9-88,7
TOTAL	195	100	NA**	35	100	NA	230	100	NA

*IC95%= Intervalo de Confianza del 95%

**NA= no aplica

4- Identificación de los genotipos de HBV en los casos de OBI detectados.

De los 36 casos de OBI se obtuvo material suficiente de 7 (siete) aislamientos para la secuenciación, pudiéndose realizar el análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas únicamente de la región del pC/C de HBV que fue la que amplificó. Del árbol filogenético obtenido que se muestran en la **figura 13**, se concluye que todas las cepas aisladas correspondieron al genotipo D subgenotipo 3. Las mismas agruparon con aislamientos de DS, HBsAg y anti-HBc reactivo, de Misiones previamente reportadas por nuestro grupo y otras secuencias, reportadas en el GenBank, de otros países del continente europeo, asiático, una del Caribe, una de Sudáfrica y una de la región sur de Brasil.

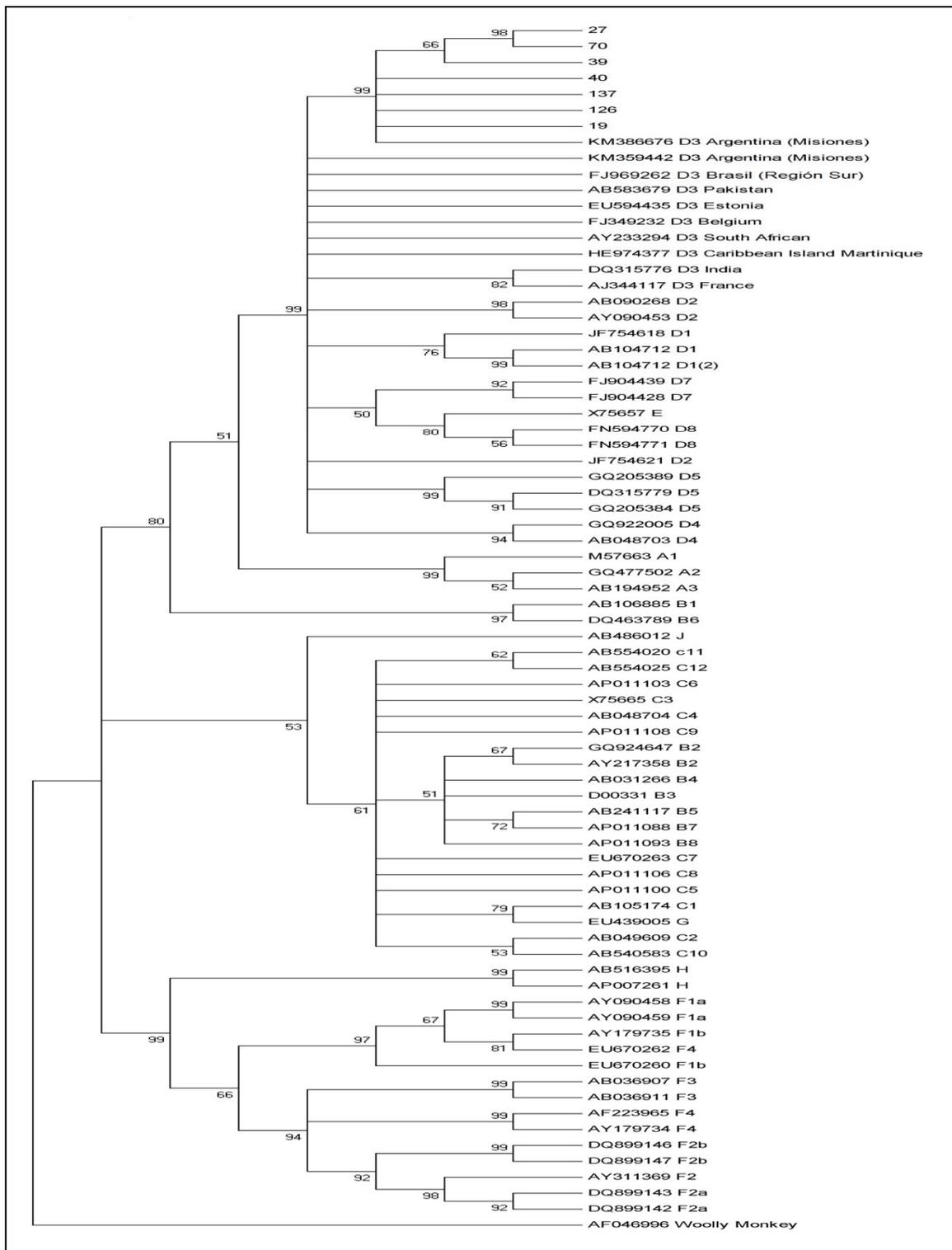


Figura 13. Análisis filogenético de los 7 aislamientos de infección oculta por HBV (OBI) provenientes de una muestra de DS de primera vez anti-HBc reactivos de la provincia de Misiones a principio del año 2013. Las secuencias de la región pC/C (entre los nucleótidos 1847-2418) fueron comparadas con otras obtenidas del GenBank de todos los genotipos y subgenotipos del HBV cuyos números de acceso se observan en el árbol. Las mismas se asociaron con secuencias provenientes de Argentina dentro del subgenotipo D3. El mismo fue construido por medio del

método de NJ. Referencias de Muestras: 19=10022723, 27=10023373, 39=20011267,
40=50012528, 70=50012969, 126=50012971, 137=60007612.

5- Variabilidad génica de las cepas de HBV aisladas productoras de OBI.

Debido a que los 7 aislamientos correspondieron únicamente a material obtenido de las secuencias nucleotídicas de la región del pC/C de HBV, no se pudo realizar el análisis de las variantes en los aminoácidos de las proteínas X, S y P.

5.1. Presencia de variaciones génicas en el BCP y la región de preCore

En las 7 (siete) muestras que se pudieron aislar y que habían resultado positivas para la PCR pC/C, se detectaron mutaciones en las posiciones 1762 y 1764 de la región regulatoria del BCP y en las posiciones 1846 y 1899 de la región preCore. (Tabla 8)

Tabla 8. Mutaciones detectadas en el Promotor Basal del Core (BCP) y en la región preCore de secuencias HBV de los 7 aislamientos obtenidos de casos OBI en DS del BSTB de la provincia de Misiones.

Muestras	BCP (1742-1814)	PreCore (1814-1901)	Genotipo
TODOS LOS AISLAMIENTOS	A1762T, G1764A	A1846T, G1899A	D3

5.2 Presencia de variantes en los aminoácidos de la proteína Core

Se analizaron las secuencias de aminoácidos deducidas de la proteína de Core, en particular en los epítopes para Linfocitos T ubicados entre las posiciones aa 18-27, 50-85 y 120-160 de las muestras que resultaron positivas para la PCR-C (Tabla 9). Se halló una única mutación en la región del epítope 50-85. Se identificaron otras mutaciones por fuera de estas 3 regiones mencionadas.

Tabla 9. Mutaciones identificadas en los epítopes para Linfocitos T de la proteína del Core en los 7 aislamientos obtenidos de casos OBI en DS del BSTB de la provincia de Misiones.

Muestras	Región 18-27	Región 50-85	Región 120-160	Resto de las regiones
TODOS LOS AISLAMIENTOS	-----	V74A	-----	D40E, S49T, S87T, I105T I116L

V- Discusión

En este estudio, hemos caracterizado la infección por el HBV, incluyendo particularmente el análisis de casos de infección oculta (OBI), en la población de donantes de sangre que concurrió al BSTB de la provincia de Misiones entre los años 2007 y 2013.

Las prevalencias de infección por HBV en función del HBsAg presentan un amplio rango en distintas partes del mundo, con áreas de baja prevalencia (0,1-2%) al oeste de Europa, en los Estados Unidos, Canadá, Australia y Nueva Zelanda, prevalencias intermedias (2-8%) en los países del Mediterráneo, Japón, Asia central y partes de Sudamérica, y elevada prevalencia (>8%) en el sudeste de Asia, China y África sub-Sahariana [72].

La prevalencia de infección por HBV mediante el marcador inmunoserológico Anti-HBc está relacionada con la estimada en función del HBsAg y ambos son típicamente proporcionales entre sí. Reportándose prevalencias de anti-HBc en DS en los Estados Unidos de 0,23%; Reino Unido 0,56%; Dinamarca 0,70%; Japón 1,1%; Alemania 1,88%; Italia 4,85%; India 10,82%; Corea del Sur 13,5%; Egipto 14,2%; Grecia 14,9% y Pakistán 17,28% [82,87,94,96,134-140].

La infección por el HBV en Sudamérica también tiene una distribución heterogénea, cuando se estima la prevalencia en base al HBsAg. Existen regiones donde se observa una endemidad alta, mayor al 8%, como sucede en Perú, sur de Colombia, norte de Bolivia y norte de Brasil. El resto de los países presentan una baja endemidad (menor al 2%), a excepción de Ecuador, Venezuela y el sur de Brasil donde se han registrado valores intermedios (2-8%) [141]. Algunos países que presentan una baja endemidad pueden tener una mayor prevalencia cuando se estima en función de los anticuerpos anti-HBc. Si consideramos que este marcador se encuentra en las infecciones pasadas o en curso, si se trata de una infección oculta por HBV (OBI), esta situación sugiere que la exposición a HBV sería mayor que la estimada en base a HBsAg [74,141].

Por otro lado, hay que considerar que las cifras de prevalencia para la infección por el HBV también varían según la población estudiada. Algunos grupos de Amerindios de la Cuenca Amazónica registran altas prevalencias para el HBsAg [142,143]. Esto también se observa en trabajadores sexuales y usuarios de drogas inyectables de diferentes países de Latinoamérica, debido a que estas conductas de riesgo favorecen la transmisión del virus [71,79,143].

En Argentina, las prevalencias de HBV varían dependiendo de la población y la región analizada. Es así que se fueron reportando en diferentes años elevadas prevalencias en algunos grupos de riesgo, entre ellos pacientes infectados con HIV-1 y usuarios de drogas inyectables [73-80, 144]. En la provincia de Misiones, en la comunidad aborigen Mbyá-Guaraní, localizada en la ciudad de Iguazú, se han documentado cifras de HBsAg y anti-HBc (1,7% y 14,1%, respectivamente) superiores a la media nacional [81] y similares a las observadas en aborígenes *Kaingang* del sur de Brasil (anti-HBc 15,42%), con quienes se ha documentado una estrecha interacción antes de la llegada de las misiones jesuíticas a esta provincia [144].

Por otro lado, la mayoría de los estudios en DS demuestran una baja endemicidad para la infección por el HBV aunque presentan variaciones. Tal es así, que la prevalencia de HBV en la región del noroeste para los marcadores HBsAg y anti-HBc para el año 2011 fueron de 0,45 % y 5,22%, respectivamente; superiores a los valores promedios reportados en el estudio de Flichman y col. para la Argentina en el mismo año. En este mismo estudio, para la región del noreste, la prevalencia de HBV, en base a los marcadores HBsAg y anti-HBc, fue de 0,29% y 3,16% respectivamente, con valores más elevados en la provincia de Misiones (0,65% HBsAg y 7,03% anti-HBc) similares a los reportados en el año 2009 en esta misma provincia por nuestro grupo (0,73% HBsAg y 8,55% anti-HBc) [73-75].

En esta tesis, la población se caracterizó por una mayor proporción de donantes de sexo masculino, la edad promedio se encontraba alrededor de los 34 años y el porcentaje de repetición de las donaciones fue cercano al 20%.

Además, se observó una prevalencia para la infección por HBV, en base al marcador HBsAg, superior a la media nacional en DS del año 2011 [75], que fue de todos modos baja de acuerdo a los criterios de la OMS. Sin embargo, se detectaron valores de prevalencias que fueron superiores al 2% en tres departamentos lo que implica una endemicidad intermedia y que la infección por el HBV no se encuentra distribuida de manera uniforme en toda la provincia (**Figura 11**).

Si bien debemos mencionar que no se incluyeron los donantes del sector privado, podemos resaltar que actualmente estos representan menos del 30% de las donaciones que se realizan en la provincia. Por otro lado, podría existir sobre-estimaciones en las prevalencias de los marcadores HBsAg y anti-HBc, como en la mayoría de los estudios realizados en bancos de sangre donde las pruebas de detección presentan una alta sensibilidad, con un variable porcentaje de falsos positivos (no estimado en el presente estudio).

Nuestros datos indican que la prevalencia de HBV en los DS de primera vez ha disminuido entre el 2007 y el 2013 (**Tabla 3**). Esto podría deberse a diferentes factores, entre ellos, la implementación de estrategias para la mejora en la selección de este tipo de donantes y el incremento del porcentaje de DS del sexo femenino (28,7% en 2007: vs 36,0% en 2013) (**Tabla 2**). Teniendo en cuenta que la prevalencia de HBV en las mujeres fue significativamente menor que la hallada en los hombres (**Tabla 4**).

También, se observó que en el total de DS de primera vez la prevalencia de infección por HBV fue más elevada en individuos de mayor edad (**Tabla 4**), similar a lo reportado recientemente en DS de Argentina y Corea, donde el incremento de la edad estuvo asociado a la presencia de infección por HBV. Esta asociación se podría explicar si consideramos que la transmisión horizontal (sexual) es una de las principales vías de contagio para este virus [75,94].

Es importante destacar que el BSCM, como parte de la atención integral de los donantes, realiza las citaciones de aquellos donantes en que se detecta algún marcador de ITT para informar respecto de la misma y derivar a la atención médica correspondiente dentro del sistema de salud.

Como ya se ha mencionado, la endemicidad de la infección por HBV en Misiones no es uniforme, mayores prevalencias para el HBsAg se destacan en la región Noreste, en los departamentos de San Pedro, Guaraní y Gral. Manuel Belgrano (**Figura 12**). Esta región se caracteriza por presentar pasos fronterizos no limitados por ríos con la región Sur del Brasil, donde también se han reportado prevalencias categorizadas como intermedias [146,147], que podrían tener una asociación con migraciones europeas de la zona del mediterráneo que se radicaron en esa zona del Brasil. [147,148].

Cabe aclarar, que las prevalencias de HBV en DS no son extrapolables a la población general, debido principalmente a las características particulares de la población de DS estudiada – en su mayoría hombres jóvenes – y a la selección previa que se le realiza a los individuos que reportan factores de riesgo para las ITT.

Actualmente, el HBV sigue siendo un riesgo importante de infección viral transmitida por transfusión y la presencia de OBI constituye una de las principales causales, a pesar del proceso de mejora continua en las técnicas de tamizaje para los bancos de sangre [61,149].

La prevalencia de OBI en DS es variable dependiendo de la endemicidad del HBV en la población que se estudia, tipo de donantes (es decir, donantes de primera o repetidos,

donantes voluntarios o de reposición), los ensayos de rutina empleados en inmunoserología y la sensibilidad de los ensayos utilizados para la detección por NAT.

Los estudios de prevalencia de OBI en América del Norte informan valores entre 0,1% y 1,0% en DS anti-HBc reactivos (con o sin anti-HBs) y de 2,0% a 3,25% en DS que solo presentaban anti-HBc (sin anti-HBs) [84, 86,150-152].

En el continente europeo, se observan cifras de prevalencia para OBI que varían de 0% a 4,86% en DS que eran anti-HBc reactivos (con o sin anti-HBs) con frecuencias más altas entre los anti-HBs negativos que entre los anti-HBs positivos. Sin embargo, algunos estudios no consiguieron detectar el ADN del HBV, en los DS que presentaban como marcador al anti- HBc sin anti-HBs [87,89,99,100,134,153-156].

En Oriente Medio y Asia, las prevalencias de OBI fueron de 0,016% a 38% en los DS que presentaban anti-HBc-positivos (con o sin anti-HBs) y entre 8,1 % a 27,1% en los que presentaban anti-HBc reactivo sin anti-HBs [67,82,90,91,94,97,135,157]

Moresco y col. en 2014, en la región del Amazonas (Brasil), que presentaba una prevalencia de anti-HBc en DS del 22,2%, hallaron 8 casos de OBI (2,7%) sobre un total de 291 muestras de DS anti-HBc reactivos (con y sin anti-HBs) [101].

En Argentina son escasos los datos publicados sobre OBI en DS. Un estudio realizado entre 2009-2014 y presentado recientemente en el Congreso Argentino de Medicina Transfusional del año 2015, demostró la presencia de 6 casos de OBI en DS de la región Central de nuestro país, donde se utilizó para la detección de ADN una técnica comercial (COBAS TaqScreen MPX test y MPX v2.0 test de Roche). De estos 6 casos, tres fueron OBI negativos (anti-HBc no reactivo), se encontraban en período de ventana y los restantes fueron OBI positivos, con cargas virales muy bajas. [158]

En la presente tesis, hemos hallado los primeros casos de OBI en DS de la provincia de Misiones. Se encontró una prevalencia de 15,6%, esto es 36 casos de 230 DS que concurren al BSTB a principios del año 2013, distribuidos en 14 de los 17 departamentos de nuestra provincia (**Tabla 6**). Estos valores de prevalencia de OBI son elevados y se encuentran dentro del rango de lo reportado para el Oriente medio y Asia. Debemos considerar que no se utilizó una técnica comercial para la detección de ADN, la cual probablemente sea más sensible que las amplificaciones realizadas *in house* y puestas a punto por nuestro grupo de trabajo.

En un estudio previo, en una población de aborígenes (Mbya-guaraní) de la provincia de Misiones, se detectó la presencia de OBI [81,159]. Sin embargo, no se hallaron casos en otros estudios realizados en muestras de DS de Porto Alegre, ciudad

localizada al sur de Brasil limítrofe con la provincia de Misiones [88,95]. Es importante destacar, que a diferencia del grupo de Brasil, los cuales utilizaron una sola técnica de PCR para la región S, nosotros hemos realizado dos técnicas de PCR para dos regiones diferentes y ninguna de las muestras resultó conjuntamente positiva para ambas regiones. Por lo tanto, consideramos indispensable, para una mayor eficiencia en la detección de OBI, la utilización conjunta de ambas técnicas de PCR para mejorar la performance de la detección y evitar resultados falsos negativos.

Cabe aclarar que, la prevalencia de OBI podría estar subestimada, debido a la sensibilidad de la técnica utilizada, a la intermitencia viral en plasma de los casos OBI y por estar demostrado que la mayor sensibilidad de detección de ADN de HBV se obtiene a partir de la utilización muestras de tejido hepático [45], lo cual no es factible realizarlo en los DS. También existiría la posibilidad de que algunas muestras positivas para ADN de HBV, podrían haber sido no reactivas para HBsAg debido a mutaciones. Es por esto que para la detección del marcador HBsAg se ha utilizado marcas comerciales que en su inserto aclaran que detectan determinadas cepas mutantes de HBsAg.

Si bien se repitieron los ensayos, en el presente estudio no se pudo amplificar la región S para su posterior secuenciación y análisis. Esta limitación implicó que no se hayan podido observar posibles variantes en los dominios funcionales de los genes S, Polimerasa y X.

Debemos destacar que algunos de los casos de OBI hallados en Misiones, no presentaban reactividad para los anticuerpos anti-HBs (**Tabla 7**), al igual que lo reportado en otros estudios y marca la importancia de continuar con la utilización del anti-HBc como marcador de infección en el tamizaje de las muestras de DS [82,84,91,96,102,134,155]. También, cuestiona la seguridad de los hemocomponentes anti-HBc reactivo/anti-HBs reactivo considerando que se ha demostrado su potencial infectividad [67,68,160]. Es así, que los casos de DS en que el HBsAg es no detectable (OBI) pero presentan anticuerpos anti-HBc pueden llegar a transmitir la infección [65,66,69].

El genotipo D del HBV se encuentra ampliamente distribuido, la presencia del subgenotipo D3 en los DS de Misiones guarda relación con los hallazgos realizados en la región sur de Brasil (**Figura 13**), los cuales atribuyen la presencia del mismo a las oleadas migratorias provenientes de países europeos como Italia y Francia, entre otros, que se asentaron en la región; como se podría inferir en este estudio [148].

El mismo subgenotipo fue reportado en DS de Misiones que presentaban marcadores inmunoserológicos reactivos para el HBsAg y el anti-HBc (**Figura 13**), lo cual

aporta mayor evidencia en el sentido de que no se puede asociar únicamente al tipo de genotipo/subgenotipo con el establecimiento de OBI [6,74], como lo ha reportado un estudio en la India [117]. De todos modos, el genotipo D se encuentra descrito en Argentina y Brasil asociado principalmente a infecciones crónicas, por lo cual nuestros datos marcan la necesidad de seguir y controlar la evolución de estos pacientes, a fin de evitar o posponer la enfermedad.[161-163].

Al realizar el análisis genómico varias mutaciones fueron identificadas en estos aislamientos de casos OBI.

Las mutaciones en las regiones BCP y preCore han sido directamente asociadas con la severidad de la enfermedad hepática y el desarrollo del HCC. Si bien varios reportes han asociado a las mutaciones G1613A, C1653T, T1753V, A1762T, G1764A, A1846T, G1896A y G1899A con el desarrollo del HCC; las mutaciones en las posiciones 1753, 1762 y 1764 son las que se han observado con mayor frecuencia en pacientes infectados con HBV que presentan esta patología [7].

En Argentina, cepas mutantes del BCP y preCore/Core han sido detectadas en DS, en pacientes crónicamente infectados con HBV y en pacientes coinfectados con HIV-1 [79,107,164].

Cualquier mutación puede inducir algún tipo de cambio que afecta en la sangre la carga viral y los niveles de HBeAg y en los hepatocitos al HBcAg y la proteína X. Estos cambios, posteriormente, pueden modular la respuesta inmune a los antígenos virales y aumentar los efectos cancerígenos de las proteínas alteradas X [165]. En todos los aislamientos de este trabajo, se detectó la doble mutación A1762T/G1764A en la región del BCP (**Tabla 8**), junto a otras dos mutaciones en la región preCore, la G1899A y la A1846T. Estas mutaciones también fueron identificadas en estudios previos realizados en diferentes comunidades aborígenes y DS no OBI.[74,81,107].

La presencia de la doble mutación A1762T/G1764A, es un hallazgo de importancia, debido a que la misma está asociada con los niveles de HBeAg y ADN del HBV en suero y se la relaciona con alteraciones en la proteína X que podría causar cambios de aminoácidos 130 y 131 y otras alteraciones, que están asociados con un mayor riesgo de HCC. Sin embargo, estas cepas mutantes también se hallaron en DS asintomáticos, al igual que en este estudio [7,165-171].

La mutación A1846T se encuentra asociada a la descompensación de la hepatitis crónica en estudios realizados por Yan y col. [172]. Por otro lado, la mutación G1899A, se ha reportado asociada frecuentemente a la mutación G1896A (esta última no fue detectada

en este estudio), y cuando se encuentra combinada con la doble mutación (A1762T/G1764A), fue asociada al desarrollo de HCC en Tailandia y Túnez, aunque este vínculo entre las mutaciones fue menos claro en Corea del Sur [7,172-176]

Además, se hallaron mutaciones en las secuencias de aminoácidos deducidas de la proteína de Core en particular en los epítopes para Linfocitos T analizados (**Tabla 9**), que podrían tener una acción de escape a la respuesta inmune por los LT CD8+. La presencia de estas mutaciones completan el complejo escenario hallado en los DS de la provincia de Misiones, debido que los pacientes infectados crónicamente con HBV presentan una respuesta de LT CD4+ y CD8+ específicos para epítopes virales significativamente disminuida y esto se observa más acentuado en la población de LT CD8+ específicos contra epítopes del HBcAg, donde no sólo dicha estirpe celular se torna indetectable, sino que inclusive se ve disminuida su habilidad para producir IFN- γ [177].

Debido a que no se pudieron amplificar secuencias en la región parcial del gen S/P, quedan abiertos nuevos interrogantes respecto de los casos OBI de la población estudiada, como ser: a) ¿Cuáles mutaciones en el HBsAg impiden el reconocimiento de éste por los equipos de EIA comerciales? b) La mutación G145R que produce el escape a la acción de la vacuna ¿Estaría presente? c) Las mutaciones en pre-S1/S2, las cuales producen una disminución considerable en la síntesis y liberación de las proteínas de envoltura ¿Serían un factor implicado en la producción de OBI en las cepas aisladas? y otros interrogantes [103,178-181].

VI- Conclusiones

Esta tesis de maestría, realizada en una población de donantes de sangre que concurrió al BSTB de la provincia de Misiones entre los años 2007 y 2013, permitió observar que:

- La población estudiada presentó predominio del sexo masculino, edad promedio 34,7 años y 19,5 % de repetición de las donaciones.
- La prevalencia de infección por HBV fue superior a la media nacional para donantes de sangre, con cifras correspondientes a baja endemicidad en la mayor parte de la provincia.
- Se determinó que en la zona Noreste que limita con Brasil, tres departamentos (San Pedro, Guaraní y Gral. Manuel Belgrano) presentaban endemicidad intermedia (HBsAg de 2 a 8%) según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud.
- El sexo masculino y el incremento de la edad presentaron asociación significativa con la infección por HBV.
- La prevalencia de casos de OBI fue el 15,6 % en muestras con anti-HBc reactivo, sin diferencia estadística para la presencia anti-HBs, demostrando que la infección oculta puede desarrollarse independientemente de la presencia de estos anticuerpos.
- Se detectó la circulación del genotipo HBV D3 en todos los casos OBI analizados que pudieron detectarse mediante amplificación de la región precore/Core.
- Se identificaron las mutaciones A1762T y G1764A en región promotor basal de Core y A1846T y G1899A en la región preCore, así como también mutaciones en diferentes regiones de los epítopes para linfocitos T de la proteína del Core (V74A, D40E, S49T, S87T y I105T, I116L).

Los resultados del estudio brindan información con base científica respecto a las características epidemiológicas de la infección por HBV en DS de la provincia de Misiones, los cuales destacan la necesidad de establecer al HBV como una prioridad en salud, con una estrategia principal basada en la vacunación de toda la población y especialmente en las comunidades cerradas o de mayor prevalencia. A su vez, estos resultados plantean la importancia de afianzar el modelo de donación de sangre voluntaria y repetida en adultos jóvenes. Además, la presencia de OBI asociada al genotipo HBV D3 y sus mutaciones, implican un gran desafío para el diagnóstico, seguimiento y control. Esto seguramente necesitará de capacitación, investigación, inversión y articulación de todo el

sistema de salud pública.

VII- Bibliografía

- 1- Gust ID, Burrell CJ, Coulepis AG, Robinson WS, Zuckerman AJ. Taxonomic classification of human hepatitis B virus. *Intervirology*. 1986;25(1):14-26.
- 2- Mathet VL, Cuestas ML, Trinks J, Minassian ML, Ruiz V, Rivero CW, Andreetta AM, Weissenbacher MC, Oubiña JR. Genetic diversity and variability of Hepatitis B virus (HBV) in Latin America and the Caribbean region: Implications in epidemiological, clinical, diagnostic, prophylactic and therapeutic approaches. Capítulo X, pp. 277-351, Libro - Progress in Hepatitis B Research. Editor: Dorothy V. Denyer. 2007.
- 3- Liu Q, Song Y, Zhou Y, Qiao L. A useful agent for chemoprevention of hepatocellular carcinoma? *Cancer Biol Ther*. 2006;5(12):1674-6.
- 4- Jammeh S, Tavner F, Watson R, Thomas HC, Karayiannis P. Effect of basal core promoter and pre-core mutations on hepatitis B virus replication. *J Gen Virol*. 2008;89(4):901-9.
- 5- Chotiyaputta W, Lok AS. Hepatitis B virus variants. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2009;6(8):453-62.
- 6- Delfino CM, Berini C, Pedrozo W, Malan R, Blejer J, Oubiña JR, Biglione MM, Mathet VL. First hepatitis B virus full-length genomic study among blood donors from Argentina: unexpected mutations in the circulating subgenotypes proteins. *Virus Genes*. 2015;50(2):286-91.
- 7- Jang JW, Chun JY, Park YM, Shin SK, Yoo W, Kim SO, Hong SP. Mutational complex genotype of the hepatitis B virus X/precore regions as a novel predictive marker for hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci*. 2012;103(2):296-304.
- 8- Locarnini S, Zoulim F. Molecular genetics of HBV infection. *Antiviral Therapy*. 2010;15(3):3-14.
- 9- Antoni BA, Rodríguez-Crespo I, Gómez-Gutiérrez J, Nieto M, Peterson D, Gavilanes F. Site-directed mutagenesis of cysteine residues of hepatitis B surface antigen. Analysis of two single mutants and double mutants. *Eur J Biochem*. 1994;222(1):121-127.
- 10- Prange R, Streeck RE. Novel transmembrane topology of the hepatitis B virus envelope proteins. *EMBO J*. 1995;14(2):247-256.

- 11- Le Seyec J, Chouteau P, Cannie I, Guguen-Guillouzo C, Gripon P. Infection process of the hepatitis B virus depends on the presence of a defined sequence in the Pre-S1 domain. *J Virol.* 1999;73(3):2052-2057.
- 12- Paran N, Geiger B, Shaul Y. HBV infection of cell culture: evidence for multivalent and cooperative attachment. *EMBO J.* 2001;20(16):4443-53.
- 13- Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, Huang Y, Qi Y, Peng B, Wang H, Fu L, Mei Song M, Chen P, Gao W, Ren B, Sun Y, Cai T, Feng X, Sui J, Li W. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide acts as a receptor for hepatitis B and d virus. *eLife.* 2012;1:e00049.
- 14- Chen BF, Liu CJ, Jow GM, Chen PJ, Kao JH, Chen DS. High prevalence and mapping of pre-S deletion in hepatitis B virus carriers with progressive liver diseases. *Gastroenterology.* 2006;130(4):1153-68.
- 15- Wang HC, Huang W, Lai MD, Su IJ. Hepatitis B virus pre-S mutants, endoplasmic reticulum stress and hepatocarcinogenesis. *Cancer Sci.* 2006;97(8):683-688.
- 16- Choi MS, Kim DY, Lee DH, Lee JH, Koh KC, Paik SW, Rhee JC, Yoo BC. Clinical significance of pre-S mutations in patients with genotype C hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat.* 2007;14(3):161-68.
- 17- Fang ZL, Sabin CA, Dong BQ, Wei SC, Chen QY, Fang KX, Yang JY, Huang J, Wang XY, Harrison TJ. Hepatitis B virus pre-S deletion mutations are a risk factor for hepatocellular carcinoma: a matched nested case-control study. *J Gen Virol.* 2008;89(11):2882-90.
- 18- Pollicino T, Amaddeo G, Restuccia A, Raffa G, Alibrandi A, Cutroneo G, Favaloro A, Maimone S, Squadrito G, Raimondo G. Impact of Hepatitis B Virus (HBV) PreS/S Genomic Variability on HBV Surface Antigen and HBV DNA Serum Levels. *Hepatology.* 2012;56(2):434-4.
- 19- Mangold CMT, Unckell F, Werr M, Streeck RE. Analysis of intermolecular disulfide bonds and free sulfhydryl groups in hepatitis B surface particles. *Arch Virol.* 1997;142(11):2257-67.

- 20- Torresi J, Earnest-Silveira L, Deliyannis G, Edgtton K, Zhuang H, Locarnini SA, Fyfe J, Sozzi T, Jackson DC. Reduced antigenicity of the hepatitis B virus HBsAg protein arising as a consequence of sequence changes in the overlapping polymerase gene that are selected by lamivudine therapy. *Virology*. 2002;293(2):305-313.
- 21- Pawlotsky JM. The concept of hepatitis B virus mutant escape. *J Clin Virol*. 2005;34(1):S125-9.
- 22- Warner N y Locarnini N. The antiviral drug selected hepatitis B virus rtA181T/sW172* mutant has a dominant negative secretion defect and alters the typical profile of viral rebound. *Hepatology*. 2008;48(1):88-98.
- 23- Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G, Tanzi E, Zuckerman AJ, Thomas HC. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B due to envelope protein mutant that escape detection by monoclonal HBsAg ELISA. *Lancet*. 1990;345:1406-1407.
- 24- Mathet VL, López JL, Campos RH, Ruiz V, Oubiña JR. Hepatitis B virus (HBV) quasispecies evolution in a chronically infected patient despite the presence of anti-HBs antibodies (Ab). *Biocell*. 2004;(28):95.
- 25- Weber, B. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. *J Clin Virol*. 2005; 32(2):102-12.
- 26- Asahina Y, Enomoto N, Ogura Y, Kurosaki M, Sakuma I, Izumi N, Marumo F, Sato C. Sequential changes in full-length genomes of hepatitis B virus accompanying acute exacerbation of chronic hepatitis B. *J Hepatol*. 1996;25:787-94.
- 27- Melegari M, Scaglioni PP, Wands JR. Cloning and characterization of a novel hepatitis B virus x binding protein that inhibits viral replication. *J Virol*. 1998 Mar;72(3):1737-43.
- 28- Das K, Xiong X, Yang H, Westland CE, Gibbs CS, Sarafianos SG, Arnold E. Molecular modeling and biochemical characterization reveal the mechanism of hepatitis B virus polymerase resistance to lamivudine (3TC) and emtricitabine (FTC). *J Virol*. 2001; 75(10):4771-9.
- 29- Shaw T, Bartholomeusz A, Locarnini S. HBV drug resistance: mechanisms, detection and interpretation. *J Hepatol*. 2006;44(3):593-606.

- 30- Zöllner B, Sterneck M, Wursthorn K, Petersen J, Schröter M, Laufs R, Feucht HH. Prevalence, incidence, and clinical relevance of the reverse transcriptase V207I mutation outside the YMDD motif of the hepatitis B virus polymerase during lamivudine therapy. *J Clin Microbiol.* 2005;43(5):2503-5.
- 31- Verena Schildgen, Susanne Ziegler, Ramona L Tillmann y Oliver Schildgen. Novel mutation in YMDD motif and direct neighbourhood in a child with chronic HBV-infection and clinical lamivudine and adefovir resistance – a scholarly case. *Viol J.* 2010;21(7):167.
- 32- Liu BM, Li T, Xu J, Li XG, Dong JP, Yan P, Yang JX, Yan L, Gao ZY, Li WP, Sun XW, Wang YH, Jiao XJ, Hou CS, Zhuang H. Characterization of potential antiviral resistance mutations in hepatitis B virus reverse transcriptase sequences in treatment-naïve Chinese patients. *Antiviral Res.* 2010;85(3):512-519.
- 33- Angus P, Vaughan R, Xiong S, Yang H, Delaney W, Gibbs C, Brosgart C, Colledge D, Edwards R, Ayres A, Bartholomeusz A, Locarnini S. Resistance to adefovir dipivoxil therapy associated with the selection of a novel mutation in the HBV polymerase. *Gastroenterology.* 2003;125(2):292-297.
- 34- Bartholomeusz A, Locarnini S. Hepatitis B virus mutations associated with antiviral therapy. *J Med Virol.* 2006;78(1):S52-5.
- 35- Durantel D, Brunelle MN, Gros E, Carrouée-Durantel S, Pichoud C, Villet S, Trepo C, Zoulim F. Resistance of human hepatitis B virus to reverse transcriptase inhibitors: from genotypic to phenotypic testing. *J Clin Virol.* 2005;34(1):S34-43.
- 36- Kay A, Zoulim F. Hepatitis B virus genetic variability and evolution. *Virus Res.* 2007;127(2):164-76.
- 37- Sheldon J, Camino N, Rodés B, Bartholomeusz A, Kuiper M, Tacke F, Núñez M, Mauss S, Lutz T, Klausen G, Locarnini S, Soriano V. Selection of hepatitis B virus polymerase mutations in HIV coinfecting patients treated with tenofovir. *Antivir Ther.* 2005;10(6):727-34.
- 38- Bouchard MJ, Schneider RJ. The enigmatic X gene of hepatitis B virus. *J Virol.* 2004;78(23):12725-34.

- 39- Li J, Xu Z, Zheng Y, Johnson DL, Ou J . Regulation of hepatocyte nuclear factor 1 activity by wild-type and mutant hepatitis B virus X proteins. *J Virol.* 2002;76(12):5875-81.
- 40- Neurath AR, Strick N. The putative cell receptors for hepatitis B virus (HBV), annexin V, and apolipoprotein H, bind to lipid components of HBV. *Virology.* 1994;204(1):475-7.
- 41- Kondo Y, Ueno Y, Shimosegawa T. Toll-like receptors signaling contributes to immunopathogenesis of HBV infection. *Gastroenterol Res Pract.* 2011;810939.
- 42- Glebe D, Urban S. Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *World J Gastroenterol.* 2007;13(1):22-38.
- 43- Moraleda G, Saputelli J, Aldrich CE, Averett D, Condreay L, Mason WS. Lack of effect of antiviral therapy in nondividing hepatocyte cultures on the closed circular DNA of woodchuck hepatitis virus. *J Virol.* 1997;71(12):9392-9.
- 44- Beck J, Nassal M. Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol.* 2007;13(1):48-64.
- 45- Raimondo G, Pollicino T, Cacciola I, Squadrito G. Occult hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology.* 2007;46(1):160-70.
- 46- Hu KQ. Occult hepatitis B virus infection and its clinical implications. *Journal of Viral Hepatitis.* 2002;9(4):243-257.
- 47- Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology.* Lippincott Williams & Wilkins (5th Edition). 2007.
- 48- Chisari F, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopatogénesis. *Ann Rev Immunol.* 1995;13:29-60.
- 49- Asociación Argentina para el Estudio de las Enfermedades del Hígado. Consenso Argentino de Hepatitis B 2011. Acceso el 30-3-2016. http://www.aeeh.org.ar/img-noticias-portada/aeeh_consenso_hb.pdf
- 50- European Association for the Study Of The Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B. *J Hepatol.* 2009;50(2):227-42.

- 51- Cacciola I, Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, Orlando ME, Raimondo G. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease. *N Engl J Med.* 1999; 341(1):22-6.
- 52- Levrero M, Pollicino T, Petersen J, Belloni L, Raimondo G, Dandri M. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 2009;51(3):581-92.
- 53- Torbenson M, Thomas DL. Occult hepatitis B. *Lancet Infect Dis.* 2002; 2:479-486.
- 54- Mulrooney-Cousins PM, Michalak TI. Persistent occult hepatitis B virus infection: experimental findings and clinical implications. *World J Gastroenterol.* 2007;13(43):5682-86.
- 55- Raimondo G, Navarra G, Mondello S, Costantino L, Colloredo G, Cucinotta E, Di Vita G, Scisca C, Squadrito G, Pollicino T. Occult hepatitis B virus in liver tissue of individuals without hepatic disease. *J Hepatol.* 2008;48(5):743-6.
- 56- El Chaar M, Candotti D, Crowther RA, Allain JP. Impact of hepatitis B virus surface protein mutations on the diagnosis of occult hepatitis B virus infection. *Hepatology.* 2010;52(5):1600-10.
- 57- Pollicino T, Raffa G, Costantino L, Lisa A, Campello C, Squadrito G, Levrero M, Raimondo G. Molecular and functional analysis of occult hepatitis B virus isolates from patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2007;45(2):277-85.
- 58- Schmeltzer P, Sherman KE. Occult hepatitis B: clinical implications and treatment decisions. *Dig Dis Sci.* 2010;55(12):3328-35.
- 59- Lieberman PM. Chromatin organization and virus gene expression. *J Cell Physiol.* 2008;216(2):295-302.
- 60- Raimondo G, Caccamo G, Filomia R, Pollicino T. Occult HBV infection. *Semin Immunopathol.* 2013;35(1):39-52.
- 61- Bes M, Vargas V, Piron M, Casamitjana N, Esteban JI, Vilanova N, Pinacho A, Quer J, Puig L, Guardia J, Sauleda S. T cell responses and viral variability in blood donation candidates with occult hepatitis B infection. *J Hepatol.* 2012;56(4):765-74.

- 62- Guidotti LG, Chisari FV. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:65-91.
- 63- Raimondo G, Allain JP, Brunetto MR, Buendia MA, Chen DS, Colombo M, Craxi A, Donato F, Ferrari C, Gaeta GB, Gerlich WH, Levrero M, Locarnini S, Michalak T, Mondelli MU, Pawlotsky JM, Pollicino T, Prati D, Puoti M, Samuel D, Shouval D, Smedile A, Squadrito G, Trepo C, Villa E, Will H, Zanetti AR, Zoulim F. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. *J Hepatol*. 2008;49(4):652-657.
- 64- Raimondo G, Pollicino T, Romanò L, Zanetti A. A 2010 update on occult hepatitis B infection. *Pathol Biol (Paris)*. 2010;58(4):254-7.
- 65- Cheung CK, Lo CM, Man K, Lau GK. Occult hepatitis B virus infection of donor and recipient origin after liver transplantation despite nucleoside analogue prophylaxis. *Liver Transpl*. 2010;16(11):1314-23.
- 66- Yuen MF, Wong DK, Lee CK, Tanaka Y, Allain JP, Fung J, Leung J, Lin CK, Sugiyama M, Sugauchi F, Mizokami M, Lai CL. Transmissibility of hepatitis B virus (HBV) infection through blood transfusion from blood donors with occult HBV infection. *Clin Infect Dis*. 2011;52(5):624-32.
- 67- Satake M, Taira R, Yugi H, Hino S, Kanemitsu K, Ikeda H, Tadokoro K. Infectivity of blood components with low hepatitis B virus DNA levels identified in a lookback program. *Transfusion*. 2007;47(7):1197-1205.
- 68- Allain JP, Mihaljevic I, Gonzalez-Fraile MI, Gubbe K, Holm-Harrithøj L, Garcia JM, Brojer E, Erikstrup C, Saniewski M, Wernish L, Bianco L, Ullum H, Candotti D, Lelie N, Gerlich WH, Chudy M. Infectivity of blood products from donors with occult hepatitis B virus infection. *Transfusion*. 2013;53(7):1405-15.
- 69- Levicnik-Stezinar S, Rahne-Potokar U, Candotti D, Lelie N, Allain JP. Anti-HBs positive occult hepatitis B virus carrier blood infectious in two transfusion recipients. *J Hepatol*. 2008;48(6):1022-5.
- 70- WHO 2015. Hepatitis B: World Health Organization Fact Sheet 204 [online]. Accessed el 30-3-2016. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/es/>

- 71- Franco E, Bagnato B, Marino MG, Meleleo C, Serino L, Zaratti L. Hepatitis B: Epidemiology and prevention in developing countries. *World J Hepat.* 2012;4(3):74-80.
- 72- Kurbanov F, Tanaka Y, Mizokami M. Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus. *Hepato Res.* 2010;40(1):14-30.
- 73- Proyecto Programa Nacional de Control de Hepatitis Virales. Epidemiología Informe N°6-9. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI). Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS) “Dr. Carlos Gregorio Malbrán”. Acceso el 30-3-2016. <http://www.hepatitisviral.com.ar/ppnhv.htm>.
- 74- Delfino CM, Gentile EA, Castillo AI, Cuestas ML, Pataccini G, Cánepa C, Malan R, Blejer J, Berini C, Eirin ME, Pedrozo W, Oubiña JR, Biglione MM, Mathet VL. Hepatitis B virus and hepatitis D virus in blood donors from Argentina: circulation of HBsAg and reverse transcriptase mutants. *Arch Virol.* 2014;159(5):1109-17.
- 75- Flichman DM, Blejer JL, Livellara BI, Re VE, Bartoli S, Bustos JA, Ansola CP, Hidalgo S, Cerda ME, Levin AE, Huenul A, Riboldi V, Treviño EM, Salamone HJ, Nuñez FA, Fernández RJ, Reybaud JF, Campos RH. Prevalence and trends of markers of hepatitis B virus, hepatitis C virus and human Immunodeficiency virus in Argentine blood donors. *BMC Infectious Diseases.* 2014;14:218. Acceso el 30-5-2014. <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/14/218>
- 76- Fainboim H, González J, Fassio E, Martínez A, Otegui L, Eposto M, Cahn P, Marino R, Landeira G, Suaya G, Gancedo E, Castro R, Brajterman L, Laplumé H. Prevalence of hepatitis viruses in an anti-human immunodeficiency virus-positive population from Argentina. A multicentre study. *J Viral Hepat.* 1999;6(1):53-7.
- 77- Weissenbacher M, Rossi D, Radulich G, Sosa-Estáni S, Vila M, Vivas E, Avila MM, Cuchi P, Rey J, Peralta LM. High seroprevalence of bloodborne viruses among street-recruited injection drug users from Buenos Aires, Argentina. *Clin Infect Dis.* 2003;37(5):S348-352.

- 78- Pando MA, Bautista CT, Maulen S, Duranti R, Marone R, Rey J, Vignoles M, Eirin ME, Biglione MM, Griemberg G, Montano SM, Carr JK, Sanchez JL, Avila MM. Epidemiology of human immunodeficiency virus, viral hepatitis (B and C), treponema pallidum, and human T-cell lymphotropic I/II virus among men who have sex with men in Buenos Aires, Argentina. *Sex Transm. Dis.* 2006;33(5),307-313.
- 79- Trinks J, Cuestas ML, Tanaka Y, Mathet VL, Minassian ML, Rivero CW, Benetucci JA, Gimenez ED, Segura M, Bobillo MC, Corach D, Ghiringhelli PD, Sanchez DO, Avila MM, Peralta LAM, Kurabnov F, Weissenbacher MC, Simmonds P, Mizokami M, Oubiña. Two simultaneous hepatitis B virus (HBV) epidemics among injecting drug users (IDUS) and men who have sex with men (MSM) in Buenos Aires, Argentina: Characterization of the first D/A recombinant from the American continent. *J Viral Hepat.* 2008; 15: 827-838.
- 80- Dos Ramos Faría, Garcia MN, Reynaga E, Romero M, Vaulet ML, Fermepín MR, Toscano MF, Rey J, Marone R, Squiquera L, González JV, Basiletti J, Picconi MA, Pando MA, Avila MM. First report on sexually transmitted infections among trans (male to female transvestites, transsexuals, or transgender) and male sex workers in Argentina: high HIV, HPV, HBV, and syphilis prevalence. *Intern J of Inf Dis.* 2011;15(9):e635-e640.
- 81- Delfino CM, Berini C, Eirin ME, Malan R, Pedrozo W, Krupp R, Blejer J, Espejo R, Fierro L, Puca A, Oubiña JR, Mathet VL, Biglione MM. New natural variants of hepatitis B virus among Amerindians from Argentina with mainly occult infections. *J Clin Virol.* 2012;54(2):174-179.
- 82- Yotsuyanagi H, Yasuda K, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Tsutsumi T, Nojiri N, Juji T, Hoshino H, Shimoda K, Hino K, Kimura S, Iino S, Koike K. Frequent presence of HBV in the sera of HBsAg-negative, anti-HBc-positive blood donors. *Transfusion.* 2001;41(9):1093-1099.
- 83- García-Montalvo BM, Farfán-Ale JA, Acosta-Viana KY, Puerto-Manzano FI. Hepatitis B virus DNA in blood donors with anti-HBc as a possible indicator of active hepatitis B virus infection in Yucatan, Mexico. *Transfus Med.* 2005;15(5):371-8.

- 84- Chevrier MC, St-Louis M, Perreault J, Caron B, Castilloux C, Laroche J, Delage G. Detection and characterization of hepatitis B virus of anti-hepatitis B core antigen-reactive blood donors in Quebec with an in-house nucleic acid testing assay. *Transfusion*. 2007;47(10):1794-1802.
- 85- Brojer E, Grabarczyk P, Liszewski G, Mikulska M, Allain JP, Letowska M. Characterization of HBV DNA/HBsAg Blood Donors in Poland Identified by Triplex NAT. *Hepatology*. 2006;44(6):1666-1674.
- 86- O'Brien SF, Fearon MA, Yi QL, Fan W, Scalia V, Muntz IR, Vamvakas EC. Hepatitis B virus DNA-positive, hepatitis B surface antigen-negative blood donations intercepted by anti-hepatitis B core antigen testing: the Canadian Blood Services experience. *Transfusion*. 2007; 47(10):1809-1815.
- 87- Manzini P, Giroto M, Borsotti R, Giachino O, Guaschino R, Lanteri M, Testa D, Ghiazza P, Vacchini M, Danielle F, Pizzi A, Valpreda C, Castagno F, Curti F, Magistroni P, Abate ML, Smedile A, Rizzetto M. Italian blood donors with anti-HBc and occult hepatitis B virus infection. *Haematologica*. 2007;92:1664-1670.
- 88- Kupski C, Träsel FR, Mazzoleni F, Winckler MA, Bender AL, Machado DC, Schmitt VM. Serologic and molecular profile of anti-HBc-positive blood bank donors in an area of low endemicity for HBV. *Dig Dis Sci*. 2008;53(5):1370-4.
- 89- Bal SH, Heper Y, Kumaş LT, Mistik R, Töre O. Investigation of the presence of HBV-DNA in isolated anti-HBc positive cases and their importance in blood banking. *Mikrobiyol Bul*. 2009;43(2):243-50.
- 90- Asim M, Ali R, Khan LA, Husain SA, Singla R, Kar P. Significance of anti-HBc screening of blood donors and its association with occult hepatitis B virus infection: Implications for blood transfusion. *Indian J Med Res*. 2010;132:312-7.
- 91- Panigrahi R, Avik Biswas A, Datta S, Banerjee A, Chandra PK, Mahapatra PK, Patnaik B, Chakrabarti S, Chakravarty R. Anti-hepatitis B core antigen testing with detection and characterization of occult hepatitis B virus by an in-house nucleic acid testing among blood donors in Behrampur, Ganjam, Orissa in southeastern India: implications for transfusion. *Virol J*. 2010;7:204.

- 92- Liu Y, Li P, Li C, Zhou J, Wu C, Zhou YH. Detection of hepatitis B virus DNA among accepted blood donors in Nanjing, China. *Virol J.* 2010;7:193.
- 93- García-Montalvo BM, Ventura-Zapata LP. Molecular and serological characterization of occult hepatitis B infection in blood donors from Mexico. *Ann Hepatol.* 2011;10(2):133-41.
- 94- Seo DH, Whang DH, Song EY, Kim HS, Park Q. Prevalence of antibodies to hepatitis B core antigen and occult hepatitis B virus infections in Korean blood donors. *Transfusion.* 2011;51(8):1840-1846.
- 95- Wolff HF, Costa Fuchs S, Brandão AMM. Absence of occult hepatitis B among blood donors in southern Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2011;15(2):159-62.
- 96- Stramer SL, Zou S, Notari EP, Foster GA, Krysztof DE, Musavi F, Dodd RY. Blood donation screening for hepatitis B virus markers in the era of nucleic acid testing: are all tests of value? *Transfusion.* 2012;52(2):440-446.
- 97- Ks M, R A, P A. The prevalence of the hepatitis B core antibody and the occult hepatitis B infection among voluntary blood donors in Chennai, India. *J Clin Diagn Res.* 2012;6(10):1710-2.
- 98- Dong J, Wu Y, Zhu H, Li G, Lv M, Wu D¹, Li X, Zhu F, Lv H. A pilot study on screening blood donors with individual-donation nucleic acid testing in China. *Blood Transfus.* 2014;12(2):172-9.
- 99- Romanò L, Velati C, Cambiè G, Fomiatti L, Galli C, Remo Zanetti AR. Hepatitis B virus infection among first-time blood donors in Italy: prevalence and correlates between serological patterns and occult infection. *Blood Transfus.* 2013;11(2):281-8.
- 100- Stolz M, Tinguely C, Fontana S, Niederhauser C. Hepatitis B virus DNA viral load determination in hepatitis B surface antigen-negative Swiss blood donors. *Transfusion.* 2014;54(11):2961-7.
- 101- Moresco MN, Virgolino Hde A, de Moraes MP, da Motta-Passos I, Gomes-Gouvêa MS, de Assis LM, Aguiar KR, Lombardi SC, Malheiro A, Cavalheiro Nde P, Levi JE, Torres KL. Occult hepatitis B virus infection among blood donors from the Brazilian Amazon: implications for transfusion policy. *Vox Sang.* 2014;107(1):19-25.

- 102- Kiely P, Margaritis AR, Seed CR, Yang H. Hepatitis B virus nucleic acid amplification testing of Australian blood donors highlights the complexity of confirming occult hepatitis B virus infection. *Transfusion*. 2014;54(8):2084-91.
- 103- Lieshout-Krikke RW, Molenaar-de Backer MW, van Swieten P, Zaaijer HL. Surface antigen-negative hepatitis B virus infection in Dutch blood donors. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;33(1):69-77.
- 104- Quarleri J, Moretti F, Bouzas MB, Laufer N, Carrillo MG, Giuliano SF, Pérez H, Cahn P, Salomon H. 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.
- 105- Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, Sugauchi F, Mano S, Maeshiro T, Nakayoshi T, Wakuta M, Miyakawa Y, Mizokami M. 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.
- 106- Shi W, Zhang Z, Ling C, Zheng W, Zhu C, Carr MJ, Higgins DG. Hepatitis B virus subgenotyping: History, effects of recombination, misclassifications, and corrections. *Infect Genet Evol*. 2013;16:355-361
- 107- Franca PH, González JE, Munne MS, Brandao LH, Gouvea VS, Sablon E, Vanderborcht BO. Strong association between genotype F and hepatitis B virus (HBV) e antigen-negative variants among HBV-infected Argentinean blood donors. *J Clin Microbiol*. 2004;42(11):5015-21.
- 108- Mathet VL, Cuestas ML, Ruiz V, Minassian ML, Rivero C, Trinks J, Daleoso G, León LM, Sala A, Libellara B, Corach D, Oubiña JR. Detection of hepatitis B virus (HBV) genotype E carried – even in the presence of high titers of anti-HBs antibodies – by an Argentinean patient of African descent who had received vaccination against HBV. *J Clin Microbiol*. 2006;44(9):3435-9.
- 109- Piñeiro Y, Leone FG, Pezzano SC, Torres C, Rodríguez CE, Garay EM, Fainboim HA, Remondegui C, Sorrentino AP, Mbayed VA, Campos RH. Hepatitis B virus genetic diversity in Argentina: dissimilar genotype distribution in two different geographical regions; description of hepatitis B surface antigen variants. *J Clin Virol*. 2008;42(4):381-8.

- 110- Flichman D, Galdame O, Livellara B, Viaut M, Gadano A, Campos R. Full-length genome characterization of hepatitis B virus genotype H strain isolated from serum samples collected from two chronically infected patients in Argentina. *J Clin Microbiol.* 2009;47:4191-3.
- 111- Orito E, Mizokami M, Sakugawa H, Michitaka K, Ishikawa K, Ichida T, Okanoue T, Yotsuyanagi H, Iino S. 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.
- 112- Sugauchi F, Chutaputti A, Orito E, Kato H, Suzuki S, Ueda R, Mizokami M. Hepatitis B virus genotypes and clinical manifestation among hepatitis B carriers in Thailand. *J Gastroenterol Hepatol.* 2002;17(6):671-676.
- 113- 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.
- 114- Akuta N, Suzuki F, Kobayashi M, Tsubota A, Suzuki Y, Hosaka T, Someya T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. The influence of hepatitis B virus genotype on the development of lamivudine resistance during long-term treatment. *J Hepatol.* 2003;38(3):315-321.
- 115- Schaefer S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J Gastroenterol.* 2007;13(1):14-21.
- 116- Cao GW. Clinical relevance and public health significance of hepatitis B virus genomic variations. *World J Gastroenterol.* 2009;15:5761-69.
- 117- Chandra PK, Biswas A, Datta S, Banerjee A, Panigrahi R, Chakrabarti S, De BK, Chakravarty R. Subgenotypes of hepatitis B virus genotype D (D1, D2, D3 and D5) in India: differential pattern of mutations, liver injury and occult HBV infection. *Journal of Viral Hepatitis.* 2009;16(10):749-756.
- 118- 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.

- 119- Sánchez-Tapias JM, Costa J, Mas A, Bruguera M, Rodés J. Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. *Gastroenterology*. 2002;123(6):1848-1856.
- 120- Livingston SE, Simonetti JP, McMahon BJ, Bulkow LR, Hurlburt KJ, Homan CE, Snowball MM, Cagle HH, Williams JL, Chulanov VP. Hepatitis B virus genotypes in Alaska native people with hepatocellular carcinoma. Preponderance of genotype F. *J Infect Dis*. 2007;195(1):5-11.
- 121- Erhardt A, Reineke U, Blondin D, Gerlich WH, Adams O, Heintges T, Niederau C, Häussinger D. Mutations of the core promoter and response to interferon treatment in chronic replicative hepatitis B. *Hepatology*. 2000;31(3):716-725.
- 122- Bottecchia M, Madejón A, Sheldon J, García-Samaniego J, Barreiro P, Soriano V. Hepatitis B virus genotype A2 harbours an L217R polymorphism which may account for a lower response to adefovir. *J Antimicrob Chemother*. 2008;62(3):626-7.
- 123- Ley Nacional de Sangre N°22.990 de la República Argentina. Buenos Aires, 28 de noviembre de 1983. Acceso el 30-3-2016. <http://infoleg.mecon.gov.ar/infolegInternet/anexos/45000-49999/49103/norma.htm>.
- 124- Normas técnicas y administrativas de servicios de hemoterapia. Ministerio de Salud y Ambiente. Resolución 865/2006. Buenos Aires, 13 de junio de 2006. Acceso el 30-3-2016. http://www.aahi.org.ar/wp-content/uploads/2013/01/norma_publicada2006.pdf.
- 125- Minuk GY, Sun DF, Uhanova J, Zhang M, Caouette S, Nicolle LE, Gutkin A, Doucette K, Marti B, Giulivi A. Occult hepatitis B virus infection in a North American community-based population. *J Hepatol*. 2005;42(4):480-485.
- 126- 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.
- 127- Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature*. 1989;339(6221):237-8.
- 128- Birkenmeyer LG, Mushahwar IK. Detection of hepatitis A, B and D virus by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods*. 1994;49(2):101-12.

- 129- Hall T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl Acids Symp Ser. 1999;41:95-98.
- 130- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 1997;25(24):4876-82.
- 131- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol. 2007;24:1596-9.
- 132- Norder H, Couroucé AM, Coursaget P, Echevarria JM, Lee SD, Mushahwar IK, Robertson BH, Locarnini S, Magnius LO. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. Intervirology. 2004;47(6):289-99.
- 133- Warner N, Locarnini S, Kuiper M, Bartholomeusz A, Ayres A, Yuen L, Shaw T. The L80I substitution in the reverse transcriptase domain of the hepatitis B virus polymerase is associated with lamivudine resistance and enhanced viral replication in vitro. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51(7):2285-92.
- 134- Allain JP, Hewitt PE, Tedder RS, Williamson LM. Evidence that anti-HBc but not HBV DNA testing may prevent some HBV transmission by transfusion. Br J Haematol. 1999;107(1):186-195.
- 135- Bhatti FA, Ullah Z, Salamat N, Ayub M, Ghani E. Anti-hepatitis B core antigen testing, viral markers, and occult hepatitis B virus infection in Pakistani blood donors: implications for transfusion practice. Transfusion. 2007;47(1): 74-79.
- 136- Chaudhuri V, Nanu A, Panda SK, Chand P. Evaluation of serologic screening of blood donors in India reveals a lack of correlation between anti-HBc titer and PCR-amplified HBV DNA. Transfusion. 2003;43(10):1442-1448.
- 137- Christensen PB, Titlestad IL, Homburg KM, Georgsen J, Kristensen T. Hepatitis B core antibodies in Danish blood donors: a surrogate marker of risk behaviour. Vox Sang. 2001;81(4):222-227.

- 138- Said ZN, Sayed MH, Salama II, Aboel-Magd EK, Mahmoud MH, Setouhy ME, Mouftah F, Azzab MB, Goubran H, Bassili A, Esmat GE. Occult hepatitis B virus infection among Egyptian blood donors. *World J Hepatol.* 2013;5(2):64-73.
- 139- Schmidt M, Nübling CM, Scheiblauer H, Chudy M, Walch LA, Seifried E, Roth WK, Hourfar MK. Anti-HBc screening of blood donors: a comparison of nine anti-HBc tests. *Vox Sang.* 2006;91(3):237-243.
- 140- Zervou EK, Dalekos GN, Boumba DS, Tsianos EV. Value of antiHBc screening of blood donors for prevention of HBV infection: results of a 3-year prospective study in Northwestern Greece. *Transfusion.* 2001;41(5):652-658.
- 141- Roman S, Jose-Abrego A, Fierro NA, Escobedo-Melendez G, Ojeda-Granados C, Martinez-Lopez E, Panduro A. Hepatitis B virus infection in Latin America: a genomic medicine approach. *World J Gastroenterol.* 2014;20(23):7181-96.
- 142- Cabezas SC, Magna Suárez JM, Romero CG, Carlos Carrillo PC, García MP, Reátegui SJ, Vallenás GF, Torres TL. Hiperendemicidad de hepatitis viral B y Delta en pueblos indígenas de la Amazonía Peruana. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 2006;23(2):114-22.
- 143- Monsalve-Castillo F, Echevarría JM, Atencio R, Anais Suárez A, Jesús Estévez J, Costa-León L, Montiel P, Molero T, Zambrano M. High prevalence of hepatitis B infection in Amerindians in Japreira, Zulia State. *Venezuela Cad Saúde Pública.* 2008;24:1183-6.
- 144- Remondegui C, Echenique G, Ceballos S, Severich A, Roman R, Yave J. Prevalencia de Hepatitis B y C en bancos de sangre. *Acta Gastroenterol Latinoam.* 2006;36(3):S100.
- 145- Ferreira A, Greca D, Tavares E, Moriya Y, Spelling F, Boeira M, Dos Santos S, de Messias-Reason I. Seroepidemiology of hepatitis B and C Kaingang Indians in the south of Brazil. *Rev Panam Salud Pública.* 2006;20(4):230-5.
- 146- Maresch C, Schluter PJ, Wilson AD, Sleight A. Residual infectious disease risk in screened blood transfusion from a high-prevalence population: Santa Catarina, Brazil. *Transfusion.* 2008;48(2):273-281.

- 147- da Nova Maria Luiza. Estudo epidemiológico, clínico e molecular do vírus da hepatite B na cidade de Chapecó, Oeste de Santa Catarina. Centro de Informática de São Carlos Digital Library of Theses and Dissertations of Universidade de São Paulo. 2010. Acesso el 30-5-2014. <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5147/tde-22062010-120502/en.php>
- 148- Bertolini DA, Gomes-Gouvêa MS, Guedes de Carvalho-Mello IM, Saraceni CP, Sitnik R, Grazziotin FG, Laurino JP, Fagundes NJ, Carrilho FJ, Pinho JR. Hepatitis B virus genotypes from European origin explains the high endemicity found in some areas from southern Brazil. *Infect Genet Evol.* 2012;12(6):1295-304.
- 149- Seo DH, Whang DH, Song EY, Han KS. Occult hepatitis B virus infection and blood transfusion. *World J Hepatol.* 2015;7(3):600-606.
- 150- Kleinman SH, Kuhns MC, Todd DS, Glynn SA, McNamara A, DiMarco A, Busch MP. Frequency of HBV DNA detection in US blood donors testing positive for the presence of anti-HBc: implications for transfusion transmission and donor screening. *Transfusion.* 2003;43(6):696-704.
- 151- Kleinman SH, Strong DM, Tegtmeier GG, Holland PV, Gorlin JB, Cousins C, Chiacchierini RP, Pietrelli LA. Hepatitis B virus (HBV) DNA screening of blood donations in minipools with the COBAS AmpliScreen HBV test. *Transfusion.* 2005;45(8):1247-1257.
- 152- Linauts S, Saldanha J, Strong DM. PRISM hepatitis B surface antigen detection of hepatitis B virus minipool nucleic acid testing yield samples. *Transfusion.* 2008;48(7):1376-1382.
- 153- Brojer E, Grabarczyk P, Liszewski G, Mikulska M, Allain JP, Letowska M. Characterization of HBV DNA+/HBsAg- blood donors in Poland identified by triplex NAT. *Hepatology.* 2006;44(6):1666-1674.
- 154- Dreier J, Kroger M, Diekmann C, Gotting C, Kleesiek K. Low-level viremia of hepatitis B virus in an anti-HBc- and anti-HBs-positive blood donor. *Transfus Med.* 2004;14(2):97-103.

- 155- Hennig H, Puchta I, Luhm J, Schlenke P, Goerg S, Kirchner H. Frequency and load of hepatitis B virus DNA in first-time blood donors with antibodies to hepatitis B core antigen. *Blood*. 2002;100(7):2637-2641.
- 156- Hourfar MK, Jork C, Schottstedt V, Weber-Schehl M, Brixner V, Busch MP, Geusendam G, Gubbe K, Mahnhardt C, Mayr-Wohlfart U, Pichl L, Roth WK, Schmidt M, Seifried E, Wright DJ. Experience of German Red Cross blood donor services with nucleic acid testing: results of screening more than 30 million blood donations for human immunodeficiency virus-1, hepatitis C virus, and hepatitis B virus. *Transfusion*. 2008;48(8):1558-1566.
- 157- Nantachit N, Thaikruea L, Thongsawat S, Leetrakool N, Fongsatikul L, Sompan P, Fong YL, Nichols D, Ziermann R, Ness P, Nelson KE. Evaluation of a multiplex human immunodeficiency virus-1, hepatitis C virus, and hepatitis B virus nucleic acid testing assay to detect viremic blood donors in northern Thailand. *Transfusion*. 2007;47(10):1803-1808.
- 158- Blanco S, Balangero M, Valle M, Montini O, Carrizo H, Gallego S. Detección de infecciones ocultas por el Virus de la Hepatitis B (HBV) en donantes de sangre. *Rev Arg de Transfusion*. 2015;41(3):221-222.
- 159- Delfino CM, Eirin ME, Berini C, Malan R, Gentile E, Castillo A, Pedrozo W, Krupp R, Blejer J, Oubiña JR, Mathet VL, Biglione MM. HDAg-L variants in covert hepatitis D and HBV occult infection among Amerindians of Argentina: new insights. *J Clin Virol*. 2012;54(3):223-228.
- 160- Seed CR, Maloney R, Kiely P, Bell B, Keller AJ, Pink J. Infectivity of blood components from donors with occult hepatitis B infection - results from an Australian lookback programme. *Vox Sang*. 2015;108(2):113-22.
- 161- Pezzano SC, Torres C, Fainboim HA, Bouzas MB, Schroder T, Giuliano SF, Paz S, Alvarez E, Campos RH, Mbayed VA. Hepatitis B virus in Buenos Aires, Argentina: genotypes, virological characteristics and clinical outcomes. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(2):223-31.

- 162- Becker CE, Kretzmann NA, Mattos AA, Veiga AB. Melting curve analysis for the screening of hepatitis B virus genotypes A, D and F in patients from a general hospital in southern Brazil. *Arq Gastroenterol.* 2013;50(3):219-25.
- 163- Mello FM, Kuniyoshi AS, Lopes AF, Gomes-Gouvêa MS, Bertolini DA. Hepatitis B virus genotypes and mutations in the basal core promoter and pre-core/core in chronically infected patients in southern Brazil: a cross-sectional study of HBV genotypes and mutations in chronic carriers. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014;47(6):701-8.
- 164- López JL, Mbayed VA, Telenta PF, González JE, Campos RH. 'Hbe minus' mutants of hepatitis B virus. Molecular characterization and its relation to viral genotypes. *Virus Res.* 2002;87(1):41-49.
- 165- Lee JH, Han KH, Lee JM, Park JH, Kim HS. Impact of hepatitis B virus (HBV) x gene mutations on hepatocellular carcinoma development in chronic HBV infection. *Clin Vaccine Immunol.* 2011;18(6):914-921.
- 166- Buckwold VE, Xu Z, Yen TS, Ou JH. Effects of a frequent double-nucleotide basal core promoter mutation and its putative single-nucleotide precursor mutations on hepatitis B virus gene expression and replication. *J Gen Virol.* 1997;78(8):2055-2065.
- 167- Li J, Buckwold VE, Hon MW, Ou JH. Mechanism of suppression of hepatitis B virus precore RNA transcription by a frequent double mutation. *J Virol.* 1999;73(2):1239-1244.
- 168- Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Basal core promoter mutations of hepatitis B virus increase the risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers. *Gastroenterology.* 2003;124(2):327-334.
- 169- Kuang SY, Jackson PE, Wang JB, Lu PX, Muñoz A, Qian GS, Kensler TW, Groopman JD. Specific mutations of hepatitis B virus in plasma predict liver cancer development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101(10):3575-3580.
- 170- Yang HI, Yeh SH, Chen PJ, Iloeje UH, Jen CL, Su J, Wang LY, Lu SN, You SL, Chen DS, Liaw YF, Chen CJ; Associations between hepatitis B virus genotype and mutants and the risk of hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100(16):1134-1143.

- 171- Yin J, Xie J, Liu S, Zhang H, Han L, Lu W, Shen Q, Xu G, Dong H, Shen J, et al. Association between the various mutations in viral core promoter region to different stages of hepatitis B, ranging of asymptomatic carrier state to hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol.* 2011;106(1):81-92.
- 172- Chen CH, Lee CM, Lu SN, Changchien CS, Eng HL, Huang CM, Wang JH, Hung CH, Hu TH. Clinical significance of hepatitis B virus (HBV) genotypes and precore and core promoter mutations affecting HBV e antigen expression in Taiwan. *J Clin Microbiol.* 2005;43(12):6000-06.
- 173- Tangkijvanich P, Sa-Nguanmoo P, Mahachai V, Theamboonlers A, Poovorawan Y. A case-control study on sequence variations in the enhancer II/core promoter/precore and X genes of hepatitis B virus in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatol Int.* 2010;4(3):577-584.
- 174- Yan T, Li K, Li F, Su H, Mu J, Tong S, Patel M, Xia J, Wands JR, Wang H. T1846 and A/G1913 are associated with acute on chronic liver failure in patients infected with hepatitis B virus genotypes B and C. *J Med Virol.* 2011;83(6):996-1004.
- 175- Ouneissa R, Bahri O, Alaya-Bouafif NB, Chouaieb S, Ben Yahia A, Sadraoui A, Hammami W, Filali N, Azzouz MM, Mami NB, Triki H. Frequency and clinical significance of core promoter and precore region mutations in Tunisian patients infected chronically with hepatitis B. *J Med Virol.* 2012;84:1719-1726.
- 176- Park YM, Jang JW, Yoo SH, Kim SH, Oh IM, Park SJ, Jang YS, Lee SJ. Combinations of eight key mutations in the X/preC region and genomic activity of hepatitis B virus are associated with hepatocellular carcinoma. *J Viral Hepat.* 2014;21(9):171-177.
- 177- Chang J., Wightman F., Bartholomeusz A., Ayres A., Kent S., Sasadeusz J [Lewin SR](#). Reduced hepatitis B virus (HBV)-Specific CD4⁺ T-cell responses in human immunodeficiency virus type 1-HBV-coinfected individuals receiving HBV-active antiretroviral therapy. *J. Virol.* 2005;79(5),3038-3051.
- 178- Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G, Tanzi E, Zuckerman AJ, Thomas HC. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet.* 1990;336(8711):325-329.

179- Zuckerman JN, Zuckerman AJ. Mutations of the surface protein of hepatitis B virus. *Antiviral Res.* 2003;60(2):75-78.

180- Ma Q, Wang Y. Comprehensive analysis of the prevalence of hepatitis B virus escape mutations in the major hydrophilic region of surface antigen. *J Med Virol.* 2012;84:198-206.

181- Larralde O, Dow B, Jarvis L, Davidson F, Petrik J. Hepatitis B escape mutants in Scottish blood donors. *Med Microbiol Immunol.* 2013;202:207-214.

VIII- Anexos

1- Anexo I: Consentimiento Informado

Consentimiento Libre e Informado del Donante

(Leer Atentamente previo a su firma)

Hoy he concurrido a donar sangre u otro hemocomponente por mi libre y propia voluntad. Estoy en conocimiento que la donación de sangre es un acto solidario y altruista, por lo tanto, no he recibido ningún tipo de remuneración o incentivo (la compra o venta de sangre constituye un delito federal). Al hacerlo entiendo que mi sangre será sometida a análisis de laboratorio para detectar la exposición a infecciones que pueden ser transmitidas por sangre: Sífilis, Enfermedad de Chagas, Brucelosis, Hepatitis B y C, HIV / SIDA y HTLV 1 y 2 y eventualmente ser utilizada en estudios posteriores por los cuales tampoco he recibido remuneración alguna, como por ejemplo, determinar si existe asociación entre determinados genes (HLA) y la posibilidad de adquirir alguna de las infecciones o la detección de otros agentes infecciosos. Sé que todo el material utilizado es descartables y la información que sobre mi se obtenga como producto de la donación podrá ser empleada en ámbitos científicos para favorecer el adelanto de las Ciencias Biomédicas, bajo la condición de que se preservará el carácter de confidencialidad de mi persona y de cualquier dato vinculante a la identidad de la misma. Tengo conocimiento que los investigadores y profesionales están en un todo de acuerdo y adoptan los principios éticos, legales y jurídicos para las investigaciones médicas en seres humanos descritas en las normas bioéticas nacionales (*Disp. ANMAT 5330/10*) e internacionales (*Código de Nüremberg, Declaración de Helsinski de la Asociación Médica Mundial y sus modificaciones Humanos de la UNESCO 11/11/97*) y de la Ley Nacional de Sangre 22.990 y las normas técnicas y administrativas vigentes.

Voluntariamente autorizo que en caso de detección de cualquier hecho que esta institución considere relevante en relación a mi sangre se me notifique, al domicilio que he declarado. También entiendo que al existir el riesgo de transmitir enfermedades por mi sangre se registrará esta situación, y no debo donar en ningún establecimiento hasta tanto no exista una nueva autorización profesional especializada y que puedo ser transmisor de enfermedades aunque los análisis sean negativos.

He sido informado y he comprendido que durante o después de la donación, eventualmente, puedo sufrir una reacción inesperada y fortuita, como por ejemplo, un hematoma alrededor del sitio de entrada de la aguja, la punción de una arteria, desmayos o

pérdida temporaria del conocimiento. Hoy también he leído la información pre y post-donación que se me ha brindado; he entendido todas las preguntas que se me han formulado en la entrevista médica personalizada sobre mi salud, mis hábitos sexuales y mis posibles adicciones a drogas; he tenido la oportunidad de consultar todo lo que he necesitado saber y me han respondido satisfactoriamente con términos comprensibles para mí. Dejo constancia que respondí a todas las preguntas con la verdad y con lo mejor de mi conocimiento. Es por ello que considero que estoy en condiciones de donar sangre u otro hemocomponente.

Fecha: ____/____/____

Firma del Donante _____

DNI/Cedula N°: _____

Aclaración: _____

Firma del Padre o Tutor: _____

Aclaración: _____

DNI/Cedula N°: _____

2- Anexo II: Anverso de la Ficha de Hemodonación utilizada para la entrevista clínica al donante de sangre en el BSTB de la provincia de Misiones



FICHA DE HEMODONACION

FECHA DE EXTRACCION: _____ / _____ / _____

1.- Datos del Donante

Apellidos/Nombres: _____
 DNI/CI/LE/LC/Pasaporte: _____ Fecha Nac.: _____ Edad: _____
 Lugar de Nacimiento: _____
 Domicilio Actual: _____ Localidad: _____
 Código postal: _____ Sexo: _____
 Teléfono: _____ E-Mail: _____
 Estado Civil: _____ Ocupación: _____
 Dona para el Hospital: _____ Paciente: _____
 Operador (Nombre y Apellido): _____

Donación de Reposición:

(Adherir Etiqueta **No Transfundir**
al Paciente)

Donación Autóloga:

(Adherir Etiqueta **Autóloga**)

2.- Consentimiento Libre e Informado del Donante (Leer Atentamente previo a su firma)

Hoy he concurrido a donar sangre u otro hemocomponente por mi libre y propia voluntad. Estoy en conocimiento que la donación de sangre es un acto solidario y altruista, por lo tanto, no he recibido ningún tipo de remuneración o incentivo (la compra o venta de sangre constituye un delito federal). Al hacerlo entiendo que mi sangre será sometida a análisis de laboratorio para detectar la exposición a infecciones que pueden ser transmitidas por sangre: Sífilis, Enfermedad de Chagas, Brucelosis, Hepatitis B y C, HIV / SIDA y HTLV I y II.

Voluntariamente autorizo que en caso de detección de cualquier hecho que esta institución considere relevante en relación a mi sangre se me notifique, al domicilio que he declarado. También entiendo que al existir el riesgo de transmitir enfermedades por mi sangre se registrará esta situación, y no debo donar en ningún establecimiento hasta tanto no exista una nueva autorización profesional especializada y que puedo ser transmisor de enfermedades aunque los análisis sean negativos.

He sido informado y he comprendido que durante o después de la donación, eventualmente, puedo sufrir una reacción inesperada y fortuita, como por ejemplo, un hematoma alrededor del sitio de entrada de la aguja, la punción de una arteria, desmayos o pérdida temporal del conocimiento. Hoy también he leído la información pre y post- donación que se me ha brindado; he entendido todas las preguntas que se me han formulado en la entrevista médica personalizada sobre mi salud, mis hábitos sexuales y mis posibles adicciones a drogas; he tenido la oportunidad de consultar todo lo que he necesitado saber y me han respondido satisfactoriamente con términos comprensibles para mí. Dejo constancia que respondí a todas las preguntas con la verdad y con lo mejor de mi conocimiento. Es por ello que considero que estoy en condiciones de donar sangre u otro hemocomponente.

Firma del Donante _____ Firma del Padre o Tutor: _____ Fecha: _____ / _____ / _____
 Aclaración: _____ DNI / Cedula N°: _____

3.- Cuestionario a completar por el personal que realiza la entrevista

- A-1- ¿Leyó atentamente y comprendió la hoja de información que se le entregó en la sala de espera? Si -No
 A-2 ¿Ha donado sangre en las últimas 8 semanas? (Sufrió algún inconveniente con posterioridad a la donación?) Si -No
 A-3 ¿Sufrió algún inconveniente con posterioridad a la donación? Si -No
 A-4 ¿Lo han rechazado como donante de sangre o le dijeron que no puede donar? Si -No
 A-5 ¿Se siente bien y "sano" hoy? (Desayuno, almorzó, merendó, ceno, se encuentra descansado?) Si -No
 A-6 ¿Está tomando alguna medicación habitualmente? Si -No En caso de Si, indicar cual:
 A-7 ¿Ha padecido o padece enfermedades del corazón (infarto, angina de pecho, etc.)? Si -No
 A-8 ¿Ha tenido enfermedad en los pulmones, tuberculosis o asma bronquial, está medicado? Si -No
 A-9 ¿Ha tenido convulsiones, desmayos, ausencias o pérdidas de conocimiento? ¿Padeció alguna vez de epilepsia, está medicado? Si -No
 A-10 ¿Alguna vez le diagnosticaron cáncer (tumor)? Si -No En caso de Si, indicar cual:
 A-11 ¿Recibió quimioterapia y/o radiaciones? Si -No
 A-12 ¿Ha recibido tratamiento con hormonas de crecimiento o hipofisarias? Si -No
 A-13 ¿Ha tenido hemorragias y/o problemas de coagulación (sangrados)? Si -No
 A-14 ¿Tiene Sida o pruebas positivas para VIH (Tiene SIDA)? Si -No
 A-15 ¿Ha tenido fatiga, sudoración nocturna o pérdida de peso inexplicable? Si -No
 A-16 ¿Ha tenido ganglios, lesiones en la piel o mucosas? Si -No
 A-17 ¿Padece de Enfermedad de Chagas conoce la vinchuca (Chinche Guazú, Barbeiro)? Si -No
 A-18 ¿Tiene antecedentes de hipertensión arterial (presión alta)? Si -No
 A-19 ¿Tomó medicación para el Acné, Soriasis o para la próstata (Accutane, Proscar, Tengison o similar)? Si -No
 A-20 ¿Ha recibido tratamiento contra la rabia? Si -No
 A-21 ¿Ha recibido vacunas? ¿Cuáles? ¿Cuándo? Si -No
 A-22 ¿Presenta o presentó alguna enfermedad no preguntada? ¿Cuál? Si -No

SI ES MUJER

- A-23 ¿Está embarazada? Si -No
 ¿Esta dando de mamar (Fecha fin de lactancia)?
 ¿Cuántas gestas, partos (Fecha de ultimo parto) y abortos ha tenido (Fecha de ultimo aborto)? Si -No
 A-24 ¿Ha tenido alguna vez relación sexual con un hombre que haya tenido contacto sexual con otro hombre? Si -No

(Adherir Etiqueta
Plasma destinado para Planta
hemoderivados)

3- Anexo III: Reverso de la Ficha de Hemodonación utilizada para la entrevista clínica al donante de sangre en el BSTB de la provincia de Misiones

HA TENIDO ALGUNA VEZ

- A-25 ¿Ictericia, color amarillo de piel, hepatitis o pruebas positivas para Hepatitis o enfermedad del hígado? Si –No
 A-26 ¿Usó alguna droga ilegal inyectable, aunque sea una sola vez? Si –No

EN LOS ÚLTIMOS 12 MESES

- A-27 ¿Aspiró Cocaína? Si –No
 A-28 ¿Ha tenido contacto sexual con alguien que haya estado expuesto al virus del Sida o que esté infectado con el virus del Sida, Hepatitis B o C? Si –No
 A-29 ¿Ha sido tratado por sífilis, gonorrea u otra enfermedad venérea? Si –No
 A-30 ¿Ha tenido Malaria o Paludismo, recibió tratamiento o viajó a zonas endémicas? Si –No
 A-31 ¿Ha recibido Inmunoglobulina hiperinmune anti-hepatitis B? Si –No
 A-32 ¿Se ha realizado tatuajes, perforaciones en orejas, en la piel ó tratamiento con acupuntura? Si –No
 A-33 ¿Ha recibido transfusiones de sangre o transplante de órganos o tejidos? Si –No

(Adherir Etiqueta
 Plasma destinado para Planta
 hemoderivados)

- A-34 ¿Ha tenido contacto accidental con sangre humana, secreciones o realiza tareas que lo exponen a las mismas? Si –No
 A-35 ¿Le han realizado algún procedimiento de cirugía mayor, menor, laparoscopia o endoscopia? Si –No
 A-36 ¿Ha tenido contacto sexual o de riesgo o con un enfermo en plan de diálisis o personas que reciben frecuentes transfusiones de sangre o componentes sanguíneos, o con serología reactiva para HIV, HVB, HCV o HTLV? Si –No
 A-37 ¿Ha estado detenido en instituciones carcelarias o policiales por más de 72 horas? Si –No

ESTA USTED INCLUIDO EN LAS SIGUIENTES PREGUNTAS

- A-38 ¿Ha tenido relaciones sexuales, con varias parejas (hombres / mujeres)? ¿con drogadictos/as o ha tenido sexo por dinero o por drogas? Si –No
 A-39 Si es hombre ¿Ha tenido contacto sexual con otros hombres? Si –No
 A-40 ¿Ha sido violado/a o sufrido de abuso sexual? Si –No

EN LOS ÚLTIMOS 7 DIAS

- A-41 ¿Ha tomado aspirinas o analgésicos? Si –No

(Adherir Etiqueta
 Plasma destinado para Planta
 hemoderivados y AAS)

- A-42 ¿Ha recibido tratamiento odontológico? Si –No
 A-43 ¿Ha tenido diarrea y/ o fiebre y/o dolor de cabeza? Si –No

POR FAVOR RESPONDA CON SINCERIDAD

- A-44 ¿Está donando para que le hagan la prueba del SIDA? Si –No
 A-45 ¿Recibió dinero o algún tipo de compensación para donar? Si –No
 A-46 ¿Entendió todas las preguntas que se le formularon? Si –No

Usted puede ser donante voluntario Si No
 En caso de necesidad autorizo a ser llamado para donar sangre u otro hemocomponente: _____

4.- Entrevista Clínica:

Admitido SI <input type="checkbox"/> Admitido Difiere Temporal <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> Permanente <input type="checkbox"/> Motivos: (relativa a las preguntas de la entrevista clínica)	Nombre y Firma de Persona que realice la entrevista Clínica
--	---

5.- Examen Físico:

Peso: _____ Pulso: _____ Temp.: _____ TA: _____
 HTO / HB _____ ¿Sulfato de cobre? < 15 seg. SI NO
 (*): _____
 Factor Rh: _____ Grupo ABO: _____

Admitido SI <input type="checkbox"/> Admitido Difiere Temporal <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> Permanente <input type="checkbox"/> Motivos: (relativo al examen física)	Nombre y Firma de Persona que realice el examen Físico.
--	---

6.- Extracción:

Tipo de Bolsa: _____ N° de Lote: _____ Anticoagulante: CFDA – Otro: _____
 Brazo Usado: Derecho / Izquierdo _____ Peso de la Bolsa: _____
 Hora de INICIO de la extracción: _____ Hora de FIN de la extracción: _____
 Dificultad en la Extracción: SI NO Cuales: 1.-Se retira sin donar 2.-Red venosa 3.-Tubuladura 4.-Bolsa
 Ocurrencia de Reacciones Adversas SI NO Cuales: 1.-Pérdida del conocimiento 3.-Formación de hematomas. 5.-Convulsiones
 2.-Nauseas y Vómitos 4.- Calambres y Espasmos Musculares 6.- Problemas Cardiacos
 7.- Otras

Muestras para Inmunoserología / Inmunohematología : SI NO

Nombre y Firma de Persona que realice la extracción

FIRMA Y SELLO DEL MÉDICO
 RESPONSABLE DEL PROCESO