

## Original breve

José Javier Costa  
Javier Rodríguez  
Javier Alba  
Isidro Rivadulla  
María Luisa Pérez-del-  
Molino  
Antonio Aguilera

# Prevalencia y distribución del genotipo D del virus de la hepatitis B en Galicia (noroeste de España): influencia de la edad, el sexo y la procedencia

Servicio de Microbiología del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, A Coruña. España.

## RESUMEN

**Introducción.** El virus de la hepatitis B (VHB) se clasifica filogenéticamente en genotipos y subgenotipos utilizados para estudios epidemiológicos. El objetivo es conocer la distribución de subgenotipos D del VHB en nuestro entorno.

**Pacientes y métodos.** En 401 pacientes con antígeno de superficie del VHB positivo, ADN-VHB positivo, se amplificó y secuenció un fragmento del gen que luego se analizó mediante la aplicación on-line geno2pheno (hbv) del Instituto Max-Planck.

**Resultados.** Se encontraron 259 (64,6%) pacientes con genotipo D: 53 no subgenotipables, 9 (4%) D1, 61 (30%) D2, 15 (7%) D3 y 121 (59%) D4. Los pacientes con VHB de subgenotipo D1 eran, de media, 23 años más jóvenes ( $p=0,0001$ ) y con mayor proporción de mujeres ( $p<0,05$ ).

**Conclusiones.** El subgenotipo D4 del VHB es el mayoritario en nuestro entorno. Los pacientes con subgenotipo D1 procedían del extranjero, eran más jóvenes que los demás subgenotipos y con mayor proporción de mujeres. Estos resultados demuestran el interés de realizar estudios a nivel de subgenotipo de VHB.

**Palabras clave:** virus de la hepatitis B, genotipo, subgenotipo, Galicia, población del noroeste de España, España

## Prevalence and distribution of hepatitis B virus genotype D in Galicia (northwest of Spain): influence of age, sex and origin

### ABSTRACT

**Introduction.** Phylogenetically, hepatitis B virus (HBV) is classified into genotypes and subgenotypes used for epidemiological studies. The aim of this study is to know the distribution of HBV subgenotypes D in our environment.

**Patients and methods.** From 401 patients HBV surface antigen positive, HBV DNA-positive, partial HBV-DNA S gene was amplified, sequenced and analysed using geno2pheno (hbv) (Max-Planck Institute) on line application.

**Results.** We found 259 (64.6%) patients with HBV genotype D: 53 not subgenotypable, 9 (4%) D1, 61 (30%) D2, 15 (7%) D3 and 121 (59%) D4. Patients with D1 subgenotype were, on average, 23 years younger ( $p = 0.0001$ ), with a higher proportion of women ( $p < 0.05$ ).

**Conclusions.** HBV subgenotype D4 was the most prevalent in our area. Patients with D1 subgenotype came from abroad were younger than the other subgenotypes and mostly women. These results show the interest of conducting studies at HBV subgenotype level.

**Kew words:** Hepatitis B virus, genotype, subgenotype, Galicia, Northwest Spain population, Spain

## INTRODUCCIÓN

Se estima que, en el mundo, alrededor de 350 millones de personas permanecen infectadas de manera crónica por el virus de la hepatitis B (VHB)<sup>1</sup>. A causa del VHB cada año mueren más de 780,000 personas por hepatitis crónica activa, cirrosis o hepatocarcinoma<sup>2</sup>.

El VHB presenta un genoma circular de ADN parcialmente

Correspondencia:  
José Javier Costa Alcalde.  
Laboratorio de Microbiología del Hospital Provincial de Conxo (CHUS).  
Rúa de Ramón Baltar s/n. Santiago de Compostela. A Coruña. España. CP: 15704  
Tfno.: 981951704  
Fax: 981951701  
E-mail: xosexabier@gmail.com

bicatenario de unos 3.200 pares de bases<sup>3</sup>. Sobre una divergencia de al menos un 8% en la secuencia completa de su genoma, o en más del 4% de su gen S, el VHB se clasifica filogenéticamente en 9 genotipos, A-I, y un posible décimo genotipo J<sup>3</sup>. Una de las principales características de los genotipos del VHB es que muestran un marcado patrón de distribución geográfica. En Europa la mayor parte de los casos se distribuye entre los genotipos A y D<sup>4</sup>. El genotipo D tiene una distribución mundial pero predomina en el área mediterránea. Además del interés epidemiológico, los genotipos del VHB se asocian con la severidad de la enfermedad, la seroconversión HBeAg, la aparición de mutaciones en el promotor y región precore/core<sup>5</sup> o la respuesta al interferón<sup>6</sup>. Las guías internacionales para el tratamiento de la infección por VHB recomiendan la determinación del genotipo del VHB<sup>7</sup>.

Con diferencias entre un 4 y un 8% en la secuencia nucleotídica completa, los genotipos del VHB se pueden dividir en subgenotipos<sup>3</sup>. Al igual que los genotipos, los subgenotipos también muestran una distribución geográfica característica. El análisis de subgenotipos del VHB se ha usado para investigar movimientos poblacionales y también en estudios étnicos y epidemiológicos<sup>8</sup>.

Los estudios realizados en España sobre la prevalencia de genotipos del VHB son escasos<sup>9-12</sup>. En ellos, el genotipo D es el mayoritario.

El objetivo de este trabajo es conocer la distribución de subgenotipos D del VHB en el Noroeste de España.

## PACIENTES Y MÉTODOS

**Pacientes.** Del área de Santiago de Compostela se estudiaron muestras de suero de 401 pacientes antígeno de superficie del VHB positivo, ADN-VHB positivo que se recibieron entre enero de 2000 y diciembre de 2014.

**Análisis serológico.** La presencia de HBsAg en suero se determinó en un analizador Architect i2000 SR (Abbott<sup>®</sup>) siguiendo las instrucciones del fabricante.

**Determinación del genotipo del VHB.** Del ADN-VHB extraído de las muestras de suero se amplificó y secuenció un fragmento del gen S del VHB tal como se describe<sup>13</sup>.

Las secuencias obtenidas se analizaron mediante la aplicación on-line geno2pheno(hbv) del instituto Max-Planck (<http://hbv.bioinf.mpi-inf.mpg.de/index.php>).

**Análisis estadístico.** El estudio estadístico se realizó con Stata versión 13.1 (StataCorp, USA). Para las variables cualitativas se utilizó la prueba de  $\chi^2$  cuadrado y la prueba exacta bilateral de Fischer. Para las variables cuantitativas se utilizaron las pruebas t de student o ANOVA o las no paramétricas U de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis cuando no se pudieron aplicar las pruebas paramétricas. Se consideraron significativos los valores  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

De las 401 muestras estudiadas, 285 fueron hombres

(71%) y 116 mujeres (29%), con edades comprendidas entre los 7 y los 90 años (mediana = 48 años, rango intercuartílico entre 38 y 60).

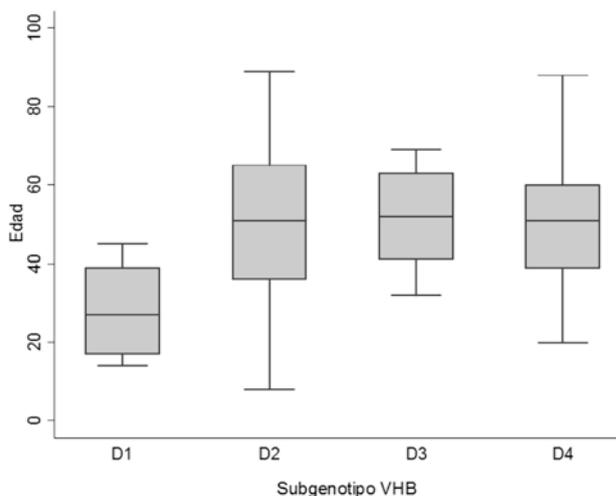
Con respecto a la edad de los pacientes no se observaron diferencias entre hombres y mujeres (49,2 vs 48,6,  $p = 0,78$ ).

Se observaron 259 (64,6%) pacientes infectados con VHB de genotipo D, 171 (66%) hombres y 88 (34%) mujeres. De estos 259 casos, 53 casos no pudieron ser subgenotipados. Los restantes 206 casos se muestran en la tabla 1. Se encontraron diferencias significativas en la relación entre sexo y subgenotipo D ( $p=0.012$ ). Al comparar estos grupos dos a dos, se observó en el subgenotipo D1 un 78% de mujeres con diferencias significativas respecto a los subgenotipos D2 ( $p = 0,001$ ), D3 ( $p=0.003$ ) y D4 ( $p=0,031$ ). Entre los subgenotipos D2, D3 y D4 no se observaron diferencias ( $p=0,139$ ), aunque el porcentaje de hombres en el subgenotipo D3 fue del 87% frente al 69 y 64% de los subgenotipos D2 y D4.

La mediana de edad de los pacientes de genotipo D fue de 51 años (rango intercuartílico entre 39 y 62 años) sin diferencias entre hombres y mujeres.

**Tabla 1** Distribución de subgenotipos D del VHB.

GENOTIPO	SEXO		Total
	Hombre	Mujer	
D1	2 (22%)	7 (78%)	9 (4%)
D2	42 (69%)	19 (31%)	61 (30%)
D3	13 (87%)	2 (13%)	15 (7%)
D4	75 (62%)	46 (38%)	121 (59%)
Total	132 (64%)	74 (36%)	206



**Figura 1** Edad de los pacientes con subgenotipos D del VHB.

La distribución de edades en los distintos subgenotipos se muestra en la figura 1, observándose diferencias significativas entre ellos ( $p=0,0018$ ). No se observaron diferencias significativas entre los subgenotipos D2, D3 y D4 ( $p=0,35$ ). Al agrupar D2, D3 y D4 y comparar la media de edad frente a D1, la diferencia media fue de 23 años ( $p=0,0001$ ; IC 95% entre 11 y 34 años). Dentro de los subgenotipos D no se encontraron diferencias entre la edad de hombres y mujeres. Al revisar la historia clínica de los pacientes con subgenotipo D1 se vio que 2 eran de nacionalidad rumana. De los demás no constaba la procedencia sin embargo los nombres eran todos de origen eslavo o árabe.

## DISCUSIÓN

Los subgenotipos del VHB presentan una distribución geográfica característica. Así, el subgenotipo D1 se ha descrito en Bulgaria, China, Egipto, Norte de la India, Turquía, Irán, Marruecos, Pakistán, Túnez y Brasil. El subgenotipo D2 se ha descrito en Albania, Turquía, Brasil, Oeste de India, Líbano y Serbia. El subgenotipo D3 se ha descrito en todo el mundo. El subgenotipo D4, relativamente raro, se ha descrito en Haití, Rusia y los Balcanes, Brasil, Kenia, Marruecos, Ruanda, aborígenes de Papúa Nueva Guinea y Australia, y un pequeño porcentaje de la población Inuit de Canadá<sup>3, 8</sup>. En España no hay datos de la distribución de subgenotipos del VHB.

En el estudio de Rodríguez-Frías et al<sup>10</sup> realizado en Cataluña la proporción de hombres/mujeres fue similar a la de nuestro estudio. En cuanto a la edad de los pacientes, los resultados también fueron similares. En nuestro entorno se observó un 65% de casos de genotipo D mientras que en Cataluña un 48%. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Echevarría et al<sup>11</sup>, 66.2% de genotipo D. En este estudio no se incluyeron muestras procedentes de Cataluña, pero sí de 11 de las 17 comunidades autónomas de España, incluida Galicia.

En nuestro estudio el subgenotipo más frecuente fue D4. Sorprende la elevada presencia de este subgenotipo. El subgenotipo D4 podría ser un subgenotipo temprano de las primeras migraciones intercontinentales humanas. El subgenotipo D4 probablemente se originó en África pero ha ido viéndose reemplazado posteriormente por otros subgenotipos D<sup>3</sup>. Estudios recientes en Cuba y Brasil<sup>14-15</sup> indican la presencia del subgenotipo D4 como segundo más frecuente en la infección por VHB. Estos autores señalan a un posible origen africano de este subgenotipo D4 introducido durante el tráfico de esclavos. En el estudio realizado en Cuba refieren que los subgenotipos más frecuentes en España son el D2 y el A2 pero sólo dispusieron de 14 secuencias completas de VHB en el GeneBank. Sería interesante realizar un estudio filogenético entre las secuencias de subgenotipo D4 obtenidas en nuestro estudio y compararlas con las obtenidas por estos autores, sin embargo una de las limitaciones de nuestro estudio es el pequeño tamaño del fragmento amplificado que nos impide realizar este estudio de una manera robusta.

En cuanto al subgenotipo D2, en nuestro estudio este subgenotipo es el segundo más frecuente.

El subgenotipo D1 es el más prevalente en Grecia, Turquía y norte de África. En nuestra población, aunque sólo son 9 casos, todas las personas con subgenotipo D1 procedían del extranjero y son más jóvenes que en los otros subgenotipos D. Dos eran de nacionalidad rumana, los demás tenían nombres eslavos o árabes. Sorprende que en el subgenotipo D1 sean más mujeres que hombres. Se podría pensar que es así debido a que estas mujeres son diagnosticadas de infección por VHB cuando acuden al hospital durante el embarazo. Es decir, que los subgenotipo D1 en nuestro entorno se asocian a personas emigradas que, en general, son más jóvenes que los pacientes con otros subgenotipos D.

En cuanto al subgenotipo D3 varios estudios asocian este subgenotipo a personas usuarias de drogas por vía parenteral (UDVP)<sup>8</sup>. En nuestro grupo de pacientes encontramos que 6 de los 15 pacientes eran UDVP. De los 9 restantes, 4 no eran UDVP y de los otros 5 no obtuvimos información. Los pacientes de nuestro grupo no eran extranjeros.

Los resultados obtenidos demuestran el interés de realizar estudios a nivel de subgenotipo de VHB en nuestro entorno. Los análisis filogenéticos necesarios para establecer unos resultados más robustos necesitarían secuenciar un fragmento de mayor tamaño que el realizado en este estudio.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Lee WM. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1997; 337 (24):1733-45
2. Lai CL, Ratzliff V, Yuen MF, Poynard T. Viral hepatitis B. *Lancet* 2003;362(9401):2089-94
3. Kramvis A. Genotypes and genetic variability of hepatitis B virus. *Intervirology* 2014; 57(3-4):141-50.
4. Schaefer S. Hepatitis B virus genotypes in Europe. *Hepatol Res* 2007;37(s1):S20-6.
5. Locarnini S, Littlejohn M, Aziz MN, Yuen L. Possible origins and evolution of the hepatitis B virus (HBV). *Semin Cancer Biol* 2013; 23(6 Pt B):561-75.
6. Buster EH1, Hansen BE, Lau GK, Piratvisuth T, Zeuzem S, Steyerberg EW, et al. Factors that predict response of patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B to peginterferon-alfa. *Gastroenterology* 2009 ;137(6):2002-9.
7. European Association For The Study Of The Liver. EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2012;57(1):167-85.
8. Ozaras R, Inanc Balkan I, Yemisen M, Tabak F. Epidemiology of HBV subgenotypes D. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2015;39(1):28-37.
9. Sánchez-Tapias JM, Costa J, Mas A, Bruguera M, Rodés J. Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outco-

- me of chronic hepatitis B in western patients. *Gastroenterology* 2002;123(6):1848-56.
10. Rodríguez-Frias F, Jardi R, Buti M, Schaper M, Hermsilla E, Valdes A, et al. Hepatitis B virus genotypes and G1896A precore mutation in 486 Spanish patients with acute and chronic HBV infection. *J Viral Hepat* 2006;13(5):343-50.
  11. Echevarría JM, Avellón A, Magnius LO. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Spain: identification of viral genotypes and prediction of antigenic subtypes by limited sequencing. *J Med Virol* 2005;76(2):176-84.
  12. Rodríguez-Nóvoa S, Gómez-Tato A, Aguilera-Guirao A, Castroagudín J, González-Quintela A, García-Riestra C, et al. Hepatitis B virus genotyping based on cluster analysis of the region involved in lamivudine resistance. *J Virol Methods* 2004;115(1):9-17
  13. Sloan RD1, Strang AL, Ramsay ME, Teo CG. Genotyping of acute HBV isolates from England, 1997-2001. *J Clin Virol* 2009;44(2):157-60.
  14. Loureiro CL, Aguilar JC, Aguiar J, Muzio V, Pentón E, García D, et al. HBV genotypic variability in Cuba. *PLoS One* 2015;10(3):e0118959.
  15. Barros LM, Gomes-Gouvêa MS, Kramvis A, Mendes-Corrêa MC, dos Santos A, Souza LA, et al. High prevalence of hepatitis B virus subgenotypes A1 and D4 in Maranhão state, Northeast Brazil. *Infect Genet Evol* 2014;24:68-75.