



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 354 937**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **97921677 .7**

96 Fecha de presentación : **21.04.1997**

97 Número de publicación de la solicitud: **0914472**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.05.1999**

54 Título: **Método para tipar y detectar HBV.**

30 Prioridad: **19.04.1996 EP 96870053**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.03.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.03.2011

73 Titular/es: **INNOGENETICS N.V.**
Industriepark Zwijnaarde 7, Box 4
9052 Ghent, BE

72 Inventor/es: **Stuyver, Lieven;**
Rossau, Rudi y
Maertens, Geert

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

MÉTODO PARA TIPAR Y DETECTAR HBV

La presente invención se refiere al campo del diagnóstico del virus de la hepatitis B (HBV). Más particularmente, la presente invención se refiere al campo del genotipado de HBV y la determinación de la presencia de mutantes de HBV en muestras de ensayo.

La presente invención se refiere particularmente a un método para la detección rápida y fiable de mutantes y genotipos de HBV que aparecen en una muestra de ensayo usando conjuntos específicos de sondas optimizadas para funcionar juntas en un ensayo de hibridación inversa.

El virus de la hepatitis B es un virus de ADN encapsulado pequeño, de una longitud de aproximadamente 3200 pb. Históricamente, se ha caracterizado en base a la reacción inmunológica del HBsAg con conjuntos de anticuerpos monoclonales. Los aislados se describieron como *a*, que indica el determinante común para todos los subtipos diferentes, seguido de las combinaciones específicas de los subtipos: *dw*, *dr*, *yw*, o *yr*. Estos últimos son pares de determinantes mutuamente excluyentes, que cubren los aminoácidos 122 (*d* = lys, *y* = arg) y 160 (*w* = lys, *r* = arg) de HBsAg. Existen varios subdeterminantes para *w*, y se pueden adscribir a la aparición de ciertas variantes de aminoácidos en el codón 127. Más recientemente, se ha propuesto una clasificación genética, basada en el análisis molecular del virus. Este tipo de análisis mostró que en total existen seis genotipos diferentes, indicados desde A a F, con una divergencia genética máxima de 8% cuando se comparan genomas completos (repasado por Magnius y Norder, 1995).

La variabilidad genética de HBV puede ser clínicamente importante. De hecho, la variabilidad genómica puede incluir algunos mecanismos mediante los cuales el HBV evita el aclaramiento inmunitario, y por tanto induce infección crónica. Un marcador proteico importante a la hora de inducir tolerancia inmunitaria, eliminación del virus e infección crónica, es HBeAg. La expresión de esta proteína está estrictamente controlada tanto a nivel transcripcional como traduccional (Li et al., 1993; Okamoto et al., 1990; Yuan et al., 1995; Sato et al., 1995). Por lo tanto, en el transcurso natural de la infección por HBV, una etapa bien caracterizada de la enfermedad se indica como hepatitis B crónica negativa a HBe (repasado por Hadziyannis S.J., 1995). Esta fase es debida principalmente a la aparición de mutaciones de codones de parada traducionales preCore. La variabilidad genética global determina la frecuencia y localización física en el genoma vírico en el que aparecen estas mutaciones de codones de parada traducionales. Se propuso que la regulación transcripcional es el mecanismo para el genotipo A (y posiblemente también F), mientras que el control traduccional era encontrado más probablemente en otros genotipos (Li et al., 1993; Sato et al., 1995). Contradictorio con la regulación traduccional, se encontró que la regulación transcripcional fue incapaz de bloquear completamente la expresión de HBeAg, y por lo tanto se propuso categorizar el fenotipo de este mutante como HBe suprimido, en lugar de negativo a HBe (Takahashi et al., 1995). En cualquier caso, estos mutantes preCore conducirían a una destrucción del balance preexistente entre HBeAg en circulación y los péptidos derivados de HBe presentados por moléculas HLA de clase I sobre la superficie de hepatocitos infectados, disminuyendo de ese modo el efecto supresor de HBeAg en células T, dando finalmente como resultado la liberación parcial de CTL específicos del núcleo y conduciendo a apoptosis de los hepatocitos infectados. En general, tras la aparición de las variantes HBe-, el transcurso de la infección vírica se caracteriza por la progresión de hepatitis crónica, lo que puede conducir al desarrollo de cirrosis y carcinoma hepatocelular (Hadziyannis, 1995).

Otro aspecto para el cual la variabilidad genética o genotipado del virus puede ser de importancia es en el desarrollo de vacunas en las que la respuesta puede estar mediada por el tipo de virus. La protección frente a la infección por HBV de todos los subtipos es conferida por anticuerpos frente al determinante "a" común del antígeno de superficie de la HB (HBsAg). Se ha demostrado que este determinante "a" presenta un número de epítomos, y que esta estructura terciaria es tremendamente importante para su antigenicidad. La región más importante está entre los aminoácidos 124 y 147, pero se puede extender desde el aminoácido 114 a 150. Una respuesta anti-HBs adecuada, formada tras la vacunación, es en principio completamente protectora. La infección con una cepa de HBV que posee mutaciones en la región del determinante "a" puede dar como resultado el fracaso de la vacuna, debido a que la respuesta inmunitaria humoral inducida por la vacuna no reconoce al mutante HBsAg. Los mutantes de escape asociados con la vacuna más comunes son las sustituciones de una glicina en la posición 145 por una arginina (G145R), K141E, y T126N. Pero también se ha encontrado una inserción de 2 aa entre las posiciones de los aa 122 y 123, una inserción de 8 aa entre los aa 123 y 124 (Carman et al., 1990, 1995; Crawford, 1990; Waters et al., 1992).

La lamivudina es un (-)-enantiómero de 3'-tiacitidina, un análogo 2',3'-didesoxinucleosídico, y se sabe que es un potente inhibidor de la replicación de HBV a través de la inhibición de la actividad de transcriptasa inversa (RT) de la HBV polimerasa. El tratamiento con lamivudina puede dar como resultado mejoras histológicas en pacientes con hepatitis crónica, y, cuando se administra antes y después de un trasplante de hígado, puede evitar la reinfección del injerto (Honkoop et al., 1995; Naoumov et al., 1995). Sin embargo, después del tratamiento, se puede observar un rebrote de la hepatitis en la mayoría de los pacientes, con elevaciones de ALT y ADN de HBV que vuelve a ser detectable. Este rebrote del ADN de HBV está asociado con un nuevo cuasi equilibrio de las especies. En unos pocos casos, se observó el avance repentino del virus durante la terapia, debido a la selección de cepas de HBV resistentes a lamivudina. La natu-

raleza exacta de este avance repentino se ha adscrito a la acumulación de mutaciones en la parte de RT de la polimerasa. Se ha encontrado un mecanismo similar en la RT polimerasa del HIV, en el que, al tratar con lamivudina, las mutaciones se acumulan en el motivo YMDD (Gao et al., 1993). Este motivo YMDD también está presente en la parte de RT de la HBV polimerasa, y se han encontrado en esta región mutaciones seleccionadas por lamivudina en HBV (Tipples et al., 1996), así como en otras regiones de la parte de RT de la polimerasa (Ling et al., 1996). Otro fármaco que ha demostrado que inhibe la actividad de transcriptasa inversa de la HBV polimerasa es el penciclovir (Shaw et al., 1996), y también se pueden detectar mutaciones en la HBV polimerasa con el tratamiento con este fármaco.

En la Solicitud de Patente Internacional WO 93/13120, se ha descrito un método para la detección de HBV en una muestra en un ensayo de hibridación en sándwich en fase de disolución. En la Solicitud de Patente Internacional WO 95/02690, se proporciona una composición de sondas de HBV y la determinación del mismo presente en la muestra de ensayo. En la patente EP 229701, se ha descrito un procedimiento de PCR general para detectar la presencia o ausencia de un ácido nucleico en un virus.

A partir de todo esto, se puede concluir que la información en los siguientes aspectos es esencial para un diagnóstico *in vitro* apropiado, monitorización y seguimiento de infecciones por HBV:

- genotipo;
- mutaciones preCore;
- mutaciones de escape de vacuna;
- mutaciones del gen de RT seleccionadas mediante tratamiento con fármacos tales como lamivudina y penciclovir.

La obtención de toda esta información usando las tecnologías existentes es complicada, consume tiempo, y requiere un personal altamente cualificado y experimentado.

De este modo, es un objeto de la presente invención desarrollar un método de detección rápido y fiable para la determinación de la presencia o ausencia de uno o más genotipos de HBV presentes posiblemente en una muestra biológica.

Más particularmente, es un objeto de la presente invención desarrollar un método de detección rápido y fiable para la determinación de la presencia o ausencia de una o más variaciones en la región de HBsAg que representan uno o más genotipos de HBV presentes posiblemente en una muestra biológica, en un único experimento.

Más particularmente, es un objeto de la presente invención desarrollar un método de detección rápido y fiable para la determinación de la presencia o ausencia de uno o más mutantes de HBV presentes posiblemente en una muestra biológica, en un único experimento.

Más particularmente, es un objeto de la presente invención desarrollar un método de detección rápido y fiable para la determinación de una o más mutaciones en la región de HBsAg de HBV presente posiblemente en una muestra biológica, en un único experimento.

Más particularmente, es un objeto de la presente invención desarrollar un método de detección rápido y fiable para la determinación de una o más mutaciones en la región del gen de la polimerasa (pol) de HBV posiblemente presente en una muestra biológica, en un único experimento.

Más particularmente, es un objeto de la presente invención desarrollar un método de detección rápido y fiable para la determinación simultánea de uno o varios genotipos de HBV en combinación con uno o varios mutantes de HBV posiblemente presentes en una muestra biológica, en un único experimento.

Es también un objeto de la presente invención proporcionar un ensayo o método de genotipado, que permite inferir la secuencia nucleotídica en codones de interés y los mutantes de HBV de interés, e inferir el genotipo de HBV presente posiblemente en una muestra biológica.

Es el objeto de la presente invención proporcionar un ensayo de genotipado que permita la detección de los diferentes mutantes y genotipos de HBV en un único montaje experimental.

Es otro objeto de la presente invención seleccionar sondas particulares capaces de discriminar una o más mutaciones de HBV en una de las regiones mencionadas anteriormente del genoma de HBV, y discriminar uno o más genotipos de HBV.

Más particularmente, es un objeto de la presente invención seleccionar sondas particulares capaces de discriminar secuencias de HBV de tipo salvaje de las secuencias de HBV mutantes.

Es también un objeto de la presente invención seleccionar sondas particulares capaces de discriminar variantes de tipo salvaje y polimórficas de HBV de las secuencias de HBV mutantes.

Es también un objeto de la presente invención seleccionar sondas particulares capaces de discriminar secuencias de genotipos de HBV.

Además, es un objeto de la presente invención combinar un conjunto de sondas seleccionadas capaces de genotipar HBV y discriminar diferentes mutantes de HBV posiblemente presentes en una muestra biológica, con lo que todas las sondas se pueden usar bajo las mismas condiciones de hibridación y de lavado.

Es también un objeto de la presente invención seleccionar cebadores que permitan la amplificación del fragmento o fragmentos génicos que determinan las mutaciones o variaciones genómicas de HBV de interés como se explica anteriormente.

La presente invención también se refiere a kits de diagnóstico que comprenden dichas sondas útiles para desarrollar tal ensayo de genotipado, y ensayos para detectar, monitorizar o hacer el seguimiento de la infección por HBV, y ensayos para detectar mutaciones de HBV.

Todos los objetos de la presente invención se han satisfecho mediante las siguientes realizaciones específicas.

Como una solución al problema mencionado anteriormente de que es esencial, para un diagnóstico apropiado, monitorización y seguimiento de la infección por HBV, tener información sobre el genotipo de HBV presente, la presente invención proporciona una forma elegante de abordar tal complejidad, que implica descansar en un enfoque de hibridación inversa (particularmente en tiras de Ensayo de Sondas en Líneas, como se describe por Stuyver et al., 1993). Usando esta tecnología, es posible obtener convenientemente todos los datos esenciales en un experimento de ensayo. Para lograr esta meta, es necesario diseñar y ensamblar un conjunto de sondas, que pueden detectar todos los polimorfismos relevantes en las regiones génicas de HBV de interés.

La presente invención se refiere así particularmente a un método para la detección de tanto genotipos de cepas de HBV como de mutantes de HBV resistentes a fármacos, en una muestra biológica, que comprende:

- (i) si es necesario, liberar, aislar o concentrar los ácidos polinucleicos presentes en dicha muestra;
- (ii) si es necesario, amplificar la parte relevante de un gen de HBV adecuado presente en dicha muestra con al menos un par de cebadores adecuados;
- (iii) hibridar los ácidos polinucleicos de la etapa (i) o (ii) con una combinación de al menos una sonda procedente de cada uno de los siguientes grupos:
 - SEC ID 77, 81, 139-141, 190-194
 - SEC ID 78, 142-147, 149
 - SEC ID 79, 150-161, 204
 - SEC ID 82, 162-169, 208
 - SEC ID 170-176, 213
 - SEC ID 178-189, 214-219,
 - opcionalmente una o más de SEC ID 80, 148 y 177, y al menos una sonda procedente de cada uno de los siguientes grupos:
 - SEC ID 114, 115, 127-129, 227-234, 243, 249, 250, 261
 - SEC ID 116, 117, 130-133, 244-248, 251-260, 262-266, y/o al menos una sonda procedente de:
 - SEC ID 267 y 269, cada una junto con SEC ID 268,
- (iv) detectar los híbridos formados en la etapa (iii);
- (v) inferir los genotipos de HBV y los mutantes de HBV resistentes a fármacos presentes en dicha muestra a partir de la señal o señales de hibridación diferenciales obtenidas en la etapa (iv).

Las secuencias dianas específicas de los genotipos pueden ser cualquier variación nucleotídica que aparezca al alinear los diferentes genomas de HBV que permite la clasificación de un cierto aislado de HBV como un cierto genotipo (véase la Figura 1).

La expresión "parte relevante de un gen de HBV adecuado" se refiere a la parte del gen de HBV que engloba la secuencia diana específica del genotipo de HBV escogida a partir de la Figura 1 a detectar.

Según una realización preferida de la presente invención, la etapa (iii) se lleva a cabo usando sondas diseñadas todas ellas meticulosamente de manera que muestran los resultados de hibridación deseados, cuando se usan en un formato de ensayo de hibridación inversa, más particularmente en las mismas condiciones de hibridación y de lavado

que implican que cada una de dichas sondas es capaz de formar un complejo al hibridarse con su secuencia diana presente en los ácidos polinucleicos de la muestra según se obtiene después de la etapa (i) o (ii).

La numeración de los aminoácidos y nucleótidos codificados por el gen de HBV es según se acepta generalmente en la bibliografía.

Se describe aquí un conjunto de sondas que permiten la detección de una variación específica del genotipo, incluyendo sondas que permiten la detección de una secuencia de tipo salvaje, una secuencia polimórfica o una secuencia mutada en una cualquiera de las posiciones nucleotídicas que muestran una diversidad de secuencia al alinearla con todas las secuencias de HBV conocidas o aún por descubrir según se representa en la Figura 1 para todos los genomas de HBV completos encontrados en EMBL/NCBI/DDBJ/Genbank.

Los conjuntos de sondas según la presente invención tienen como característica común que todas las sondas en dicho conjunto se diseñan de manera que se pueden usar juntas en un ensayo de hibridación inversa, más particularmente en condiciones de hibridación y de lavado similares o idénticas como se indica anteriormente y más abajo.

Los conjuntos seleccionados de sondas incluyen sondas que permiten diferenciar cualquiera de los cambios nucleotídicos específicos del genotipo de HBV según se representan en la Figura 1, preferiblemente en la región de HBsAg de HBV. Dichas sondas se caracterizan porque pueden funcionar en un método como se expone anteriormente.

A fin de resolver el problema mencionado anteriormente de obtener información sobre la posible presencia de mutantes de HBV en una muestra dada, la presente invención proporciona una manera elegante de abordar este problema, que implica basarse en un enfoque de hibridación inversa (particularmente en tiras de Ensayo de Sondas en Líneas, como se describe por Stuyver et al., 1993). Usando esta tecnología, es posible obtener de forma conveniente todos los datos esenciales en un experimento de ensayo. Para lograr esta meta, es necesario diseñar y ensamblar un conjunto de sondas que pueden detectar todas las mutaciones relevantes y posiblemente también secuencias de tipo salvaje o polimorfismos en las regiones de interés del gen de HBV.

También se describe aquí un método para determinar la presencia o ausencia de uno o más mutantes de HBV en una muestra biológica, que comprende:

- (i) si es necesario, liberar, aislar o concentrar los ácidos polinucleicos presentes en la muestra;
- (ii) si es necesario, amplificar la parte relevante de un gen de HBV adecuado presente en dicha muestra con al menos un par de cebadores adecuados;
- (iii) hibridar los ácidos polinucleicos de la etapa (i) o (ii) con al menos dos sondas nucleotídicas que se hibridan específicamente a una secuencia diana mutante de HBV, escogida del gen pol de RT de HBV a partir de la Figura 1, aplicándose dichas sondas a localizaciones conocidas sobre un soporte sólido, y siendo capaces dichas sondas de hibridarse a los ácidos polinucleicos de la etapa (i) o (ii) en las mismas condiciones de hibridación y de lavado, o hibridándose dichas sondas específicamente con una secuencia complementaria a cualquiera de dichas secuencias diana, o una secuencia en la que T de dicha secuencia diana se sustituye por U, y comprendiendo posiblemente también dicho conjunto de sondas una o más sondas de HBV de tipo salvaje que se corresponden con la secuencia diana de HBV mutado respectiva;
- (iv) detectar los híbridos formados en la etapa (iii);
- (v) inferir el mutante o mutantes de HBV presentes en dicha muestra a partir de la señal o señales de hibridación diferenciales obtenidas en la etapa (iv).

Se entenderá que la expresión "secuencia diana mutante" no sólo cubre la secuencia que contiene una mutación, sino también la secuencia de tipo salvaje correspondiente. La secuencia diana mutante de HBV descrita aquí puede ser cualquier secuencia que incluye un codón mutado de HBV conocido en la técnica, o aún por descubrir. Más abajo se exponen regiones diana mutantes de HBV particularmente preferidas.

A fin de resolver el problema citado anteriormente de la obtención de información sobre los aspectos esenciales para el diagnóstico apropiado de HBV (a saber, genotipo y diferentes mutaciones, mutaciones de escape de vacuna y mutaciones del gen de RT seleccionadas mediante tratamiento con fármacos tales como lamivudina y penciclovir), la presente invención proporciona una forma particularmente elegante de obtener tal información compleja.

Además, el análisis cuidadoso de los datos obtenidos mediante los presentes inventores reveló claramente que la combinación de la información referente a los mutantes de escape con los datos sobre el genotipo es esencial para permitir la interpretación adecuada de los resultados. Por tanto, es altamente ventajoso ser capaces de producir simultáneamente todos los datos relevantes.

En este método para diagnosticar mutantes de HBV en combinación con el genotipado de HBV, se puede usar un conjunto de sondas seleccionadas como se define anteriormente, en el que dicho conjunto de sondas se caracteriza por elegirlas de forma que, para una mutación de HBV dada, se incluyen las siguientes sondas en dicho conjunto:

- al menos una sonda para detectar la presencia del nucleótido o nucleótidos mutados en dicha posición;
- al menos una sonda para detectar la presencia del nucleótido o nucleótidos de tipo salvaje en dicha posición;
- posiblemente también una sonda o sondas adicionales para detectar polimorfismos de tipo salvaje en posiciones que rodean a la posición de la mutación.

5 La inclusión de estos dos últimos tipos de sondas contribuye enormemente a incrementar la sensibilidad de dichos ensayos, según se demuestra en la sección de ejemplos.

10 Adicionalmente, se describe aquí al menos una sonda, preferiblemente al menos dos sondas, que caracterizan la presencia de una mutación en la región del gen pol de RT de HBV, que da lugar a resistencia a fármacos tales como lamivudina y penciclovir, por ejemplo la mutación de M a V o a I en la posición 552 (en el motivo YMDD), la mutación de V a I en la posición 555, la mutación de F a L en la posición 514, la mutación de V a L en la posición 521, la mutación de P a L en la posición 525, y la mutación de L a M en la posición 528 (véase la Figura 1).

Se describe además una combinación de al menos dos sondas oligonucleotídicas, y dicha combinación de sondas se hibrida específicamente a al menos dos de los siguientes grupos de secuencias diana:

- una secuencia diana mutante escogida de la región del gen pol de RT de HBV,
- 15 una secuencia diana mutante escogida de la región de HBsAg de HBV,
- una secuencia diana específica de un genotipo de HBV a partir de la secuencia del gen pol de RT de HBV.

Por ejemplo, se describe aquí la hibridación con al menos una sonda nucleotídica que se hibrida específicamente a una secuencia diana específica de un genotipo escogida de la Figura 1, y al menos una sonda nucleotídica que se hibrida específicamente a una secuencia diana mutante de HBV escogida de la Figura 1.

20 Se describe aquí además la hibridación con al menos una sonda nucleotídica que se hibrida específicamente a una secuencia diana específica de un genotipo escogida de la Figura 1, y al menos una sonda nucleotídica que se hibrida específicamente a una secuencia diana mutante de HBV escogida de la región del gen pol de RT como se representa en la Figura 1.

25 Se describe aquí además la hibridación con al menos una sonda nucleotídica que se hibrida específicamente a una secuencia diana específica de un genotipo escogida de la Figura 1, y al menos una sonda nucleotídica que se hibrida específicamente a una secuencia diana mutante de escape de vacuna de HBV en la región de HBsAg según se representa en la Figura 1.

30 Por ejemplo, se describe además la hibridación con al menos una sonda que se hibrida específicamente a una secuencia diana mutante procedente de la región del gen pol de RT de HBV, y al menos una sonda que se hibrida específicamente a una secuencia diana mutante procedente de la región de HBsAg de HBV, y al menos una sonda que se hibrida específicamente a una secuencia diana específica de un genotipo a partir de la región de HBsAg de HBV. Según esta realización, la parte relevante del genoma de HBV se puede amplificar mediante uso de un par de cebadores, por ejemplo HBPr 75 y HBPr 94.

35 Se describe aquí además un conjunto de sondas como se expone anteriormente, que comprende al menos una, preferiblemente al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o más sondas para seleccionar como dianas uno, preferiblemente dos, tres o más cambios nucleotídicos que aparecen en el alineamiento de los genomas de HBV según se escogen a partir del gen pol de RT de HBV y se representan en la Figura 1.

40 Los conjuntos seleccionados de sondas incluyen sondas derivadas de dos de las mismas regiones o diferentes regiones de HBV que contienen nucleótidos mutados de HBV, o además también una tercera (un tercer conjunto de) sonda(s) que caracteriza la presencia de una tercera mutación de HBV en cualquiera de las posiciones mostradas en la Figura 1, o sus combinaciones particulares.

45 Se describe además un conjunto de sondas que permiten la detección simultánea de mutaciones de HBV en los codones 15, 28 y 29 en la región de preCore, en combinación con mutaciones en las regiones promotoras de preCore, en combinación con mutaciones en los codones 122, 126, 141, 143, 144, 145 en la región de HBsAg, posiblemente también en combinación con mutaciones en el gen pol de HBV en los codones 514, 521, 525, 528, 552 ó 555.

En los casos en los que se cita aquí el alineamiento de genomas de HBV de la Figura 1, se debería de interpretar referido a un alineamiento de todos los genomas de HBV existentes y futuros. Las secuencias genómicas de HBV existentes se pueden deducir a partir de cualquier base de datos, tales como la base de datos EMBL/NCBI/DBJ/GENBANK.

50 Un conjunto de sondas de preCore, preS1, HBsAg y del gen pol de RT son las sondas con SEC ID NO 1 a 278 de la Tabla 1 (véase también la Figura 1).

En la Figura 2 y en la Figura 4 se muestran conjuntos específicos de sondas a este respecto. Las sondas en la Figura 2 y en la Figura 4 se conservaron después de una primera selección en busca de sondas preCore, preS1, HBsAg y RT pol.

Las sondas de la invención se diseñan para obtener un comportamiento óptimo bajo las mismas condiciones de hibridación, de forma que se pueden usar en conjuntos de al menos dos sondas para la hibridación simultánea. Esto incrementa enormemente la utilidad de estas sondas, y da como resultado una ganancia significativa de tiempo y trabajo. Evidentemente, cuando se prefirieran otras condiciones de hibridación, todas las sondas se deberían de adaptar en consecuencia añadiendo o suprimiendo un número de nucleótidos en sus extremidades. Se entendería que estas adaptaciones concomitantes deberían de dar lugar a esencialmente el mismo resultado, a saber, que las sondas respectivas todavía se hibridan específicamente a la diana definida. Tales adaptaciones también pueden ser necesarias si el material amplificado debiera ser de naturaleza de ARN y no ADN, como en el caso para el sistema NASBA.

La selección de las sondas preferidas de la presente invención se basa en un formato de ensayo de hibridación inversa que usa sondas oligonucleotídicas inmovilizadas presentes en distintas localizaciones sobre un soporte sólido. Más particularmente, la selección de sondas preferidas de la presente invención se basa en el uso del principio del Ensayo de Sondas en Líneas (LiPA), que es un ensayo de hibridación inversa que usa sondas oligonucleotídicas inmovilizadas como líneas paralelas sobre una tira de soporte sólido (Stuyver et al. 1993; Solicitud Internacional WO 94/12670). Este enfoque es particularmente ventajoso puesto que es rápido y simple de hacer. El formato de hibridación inversa, y más particularmente el enfoque de LiPA, tiene muchas ventajas prácticas en comparación con otras técnicas de ADN o formatos de hibridación, especialmente cuando el uso de una combinación de sondas es preferible o inevitable para obtener la información relevante buscada.

Se entenderá, sin embargo, que cualquier otro tipo de ensayo o formato de hibridación que use cualquiera de las sondas seleccionadas como se describe posteriormente en la invención también está cubierto por la presente invención.

El enfoque de hibridación inversa implica que las sondas se inmovilizan a ciertas localizaciones sobre un soporte sólido, y que el ADN diana se marca a fin de permitir la detección de los híbridos formados.

Las siguientes definiciones sirven para ilustrar los términos y expresiones usados en la presente invención.

La expresión "análisis genético" se refiere al estudio de la secuencia nucleotídica del genoma de HBV mediante cualquier técnica apropiada.

La expresión "mutante de HBV" se refiere a cualquier cepa de HBV que posee variaciones genómicas con consecuencias serológicas, genéticas o clínicas.

La expresión "mutante de escape de vacuna" se repasa en la sección de introducción y en el Ejemplo 7. La región más importante cae entre los aminoácidos 124 y 147 de la región de HBsAg, pero se puede extender desde el aminoácido 114 hasta el 150.

La expresión "mutante resistente a fármacos tales como lamivudina y penciclovir" se repasa en la sección de introducción y en el Ejemplo 8.

La expresión "genotipo de HBV" se refiere a cepas de HBV con una variación intergenotípica de 8% o más, basado en la comparación de genomas completos.

El material diana en las muestras a analizar puede ser ADN o ARN, por ejemplo ADN genómico, ARN mensajero, ARN vírico o sus versiones amplificadas. Estas moléculas también se denominan ácidos polinucleicos.

Es posible usar moléculas de ADN genómico o de ARN a partir de muestras susceptibles de contener HBV en los métodos según la presente invención.

Existen procedimientos de extracción y purificación bien conocidos para el aislamiento de ARN o ADN procedente de una muestra (véase en Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989)).

El término "sonda" se refiere a oligonucleótidos específicos de una secuencia monocatenarios que tienen una secuencia que es complementaria a la secuencia diana a detectar.

La expresión "secuencia diana", como se cita en la presente invención, describe la secuencia nucleotídica de una parte de una secuencia génica de HBV de tipo salvaje, polimórfica o mutante a detectar específicamente mediante una sonda según la presente invención. La secuencia polimórfica puede englobar uno o más nucleótidos polimórficos; la secuencia mutante puede englobar uno o más nucleótidos que son diferentes de la secuencia de tipo salvaje. Se entenderá que la expresión "secuencia diana mutante" no sólo cubre la secuencia que contiene una mutación, sino también la secuencia de tipo salvaje correspondiente. Las secuencias diana se pueden referir generalmente a posiciones nucleotídicas individuales, posiciones de codón, nucleótidos que codifican aminoácidos, o a secuencias que se expanden a

cualquiera de las posiciones anteriores. En la presente invención, dicha secuencia diana incluye a menudo una, dos o más posiciones nucleotídicas variables. En la presente invención, los ácidos polinucleicos detectados por las sondas de la invención comprenderán la secuencia diana frente a la cual se detecta la sonda.

Se entenderá que el complemento de dicha secuencia diana es también una secuencia diana adecuada en algunos casos. Las secuencias diana como se definen en la presente invención proporcionan secuencias que deberían ser al menos complementarias a la parte central de la sonda que se diseña para hibridarse específicamente a dicha región diana. En la mayoría de los casos, la secuencia diana es completamente complementaria a la secuencia de la sonda.

El término “complementaria”, como se usa aquí, significa que la secuencia de la sonda monocatenaria es exactamente el complemento (inverso) de la secuencia de la diana monocatenaria, definiéndose además la diana como la secuencia en la que está localizada la mutación a detectar.

Puesto que la aplicación actual requiere la detección de desemparejamientos de pares de bases individuales, se requieren condiciones restrictivas para la hibridación, permitiendo sólo en principio la hibridación de secuencias exactamente complementarias. Sin embargo, son posibles variaciones en la longitud de las sondas (véase más abajo). También se debería observar que, puesto que la parte central de la sonda es esencial para sus características de hibridación, se pueden permitir desviaciones posibles de la secuencia de la sonda frente a la secuencia diana hacia la cabeza y la cola de la sonda cuando se usan secuencias de sondas más largas. Estas variaciones, que se pueden concebir a partir del conocimiento normal en la técnica, sin embargo siempre se deberían de evaluar experimentalmente, a fin de comprobar si dan como resultado características de hibridación equivalentes como las sondas exactamente complementarias.

Preferiblemente, las sondas de la invención tienen una longitud de alrededor de 5 a 50 nucleótidos, más preferiblemente de alrededor de 10 a 25 nucleótidos. Las longitudes particularmente preferidas de las sondas incluyen 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ó 25 nucleótidos. Los nucleótidos como se usan en la presente invención pueden ser ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos y nucleótidos modificados tales como inosina o nucleótidos que contienen grupos modificados que no alteran esencialmente sus características de hibridación.

Las secuencias de sondas se representan a lo largo de la memoria descriptiva como oligonucleótidos de ADN monocatenarios a partir del extremo 5' hacia el extremo 3'. Es obvio para la persona experta en la técnica que cualquiera de las sondas especificadas anteriormente se puede usar como tal, o en su forma complementaria, o en su forma de ARN (en la que T se sustituye por U).

Las sondas según la invención se pueden preparar clonando plásmidos recombinantes que contienen insertos, que incluyen las secuencias nucleotídicas correspondientes, si es necesario escindiendo estas últimas de los plásmidos clonados al usar nucleasas adecuadas y recuperándolos, por ejemplo mediante fraccionamiento según el peso molecular. Las sondas según la presente invención también se pueden sintetizar químicamente, por ejemplo mediante el método de fosfotriéster convencional.

La expresión “soporte sólido” se puede referir a cualquier sustrato al que se puede acoplar una sonda oligonucleotídica, con la condición de que retenga sus características de hibridación, y con la condición de que el nivel de fondo de la hibridación siga siendo bajo. Habitualmente, el sustrato sólido será una placa de microtitulación, una membrana (por ejemplo nailon o nitrocelulosa) o una microesfera (perla) o un chip. Antes de la aplicación a la membrana o fijación, puede ser conveniente modificar la sonda de ácido nucleico a fin de facilitar la fijación o mejorar la eficacia de la hibridación. Tales modificaciones pueden englobar la terminación mediante homopolímeros, el acoplamiento con diferentes grupos reactivos tales como grupos alifáticos, grupos NH₂, grupos SH, grupos carboxílicos, o el acoplamiento con biotina, haptenos o proteínas.

El término “marcado” se refiere al uso de ácidos nucleicos marcados. El marcaje se puede llevar a cabo mediante el uso de nucleótidos marcados incorporados durante la etapa de polimerasa de la amplificación tal como se ilustra por Saiki et al. (1988) o Bej et al. (1990), o cebadores marcados, o mediante cualquier otro método conocido por la persona experta en la técnica. La naturaleza del marcador puede ser isotópica (³²P, ³⁵S, etc.) o no isotópica (biotina, digoxigenina, etc.).

El término “cebador” se refiere a una secuencia nucleotídica monocatenaria capaz de actuar como punto de iniciación para la síntesis de un producto de extensión de cebador que es complementario a la hebra de ácido nucleico a copiar. La longitud y la secuencia de tal cebador debe ser tal que permitan al cebador sintetizar productos de extensión. Preferiblemente, el cebador tiene una longitud de alrededor de 5-50 nucleótidos. La longitud y secuencia específicas dependerán de la complejidad de las dianas de ADN o ARN requeridas, así como de las condiciones de uso del cebador, tales como temperatura y fuerza iónica.

La expresión “par de cebadores adecuado” se refiere en esta invención a un par de cebadores que permiten la amplificación de parte o todo el gen de HBV para el que se inmovilizan las sondas.

El hecho de que los cebadores de la amplificación no tienen que emparejarse exactamente con la secuencia molde correspondiente para garantizar la amplificación apropiada se documenta ampliamente en la bibliografía (Kwok et al., 1990).

El método de amplificación usado puede ser la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; Saiki et al., 1988), la reacción en cadena de ligasa (LCR; Landgren et al., 1988; Wu y Wallace, 1989; Barany, 1991), la amplificación a base de secuencias de ácidos nucleicos (NASBA; Guatelli et al., 1990; Compton, 1991), el sistema amplificación a base transcripción (TAS; Kwok et al., 1989), la amplificación por desplazamiento de hebra (SDA; Duck, 1990; Walker et al., 1992), o la amplificación por medio de QB replicasa (Lizardi et al., 1988; Lomeli et al., 1989), o cualquier otro método adecuado para amplificar moléculas de ácido nucleico conocido en la técnica.

Los oligonucleótidos usados como cebadores o sondas también pueden comprender análogos nucleotídicos tales como fosforotiatos (Matsukura et al., 1987), alquilfosforotiatos (Miller et al., 1979) o ácidos nucleicos peptídicos (Nielsen et al., 1991; Nielsen et al., 1993), o pueden contener agentes intercalantes (Asseline et al., 1984).

Como la mayoría de otras variaciones o modificaciones introducidas en las secuencias de ADN originales de la invención, estas variaciones necesitarán adaptaciones con respecto a las condiciones bajo las cuales se debería usar el oligonucleótido para obtener la especificidad y sensibilidad requeridas. Sin embargo, los resultados eventuales de la hibridación serán esencialmente los mismos que los obtenidos con los oligonucleótidos sin modificar.

La introducción de estas modificaciones puede ser ventajosa a fin de influir positivamente en las características tales como la cinética de hibridación, la reversibilidad de la formación de híbridos, la estabilidad biológica de las moléculas oligonucleotídicas, etc.

La "muestra" puede ser cualquier material biológico tomado directamente del ser humano (o animal) infectado, o después de cultivarlo (enriquecimiento). El material biológico puede ser, por ejemplo, expectoraciones de cualquier tipo, broncolavados, sangre, tejido de piel, biopsias, esperma, material de cultivo de sangre linfocítica, colonias, cultivos líquidos, muestras fecales, orina, etc.

Los conjuntos de sondas incluirán al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o más sondas. Dichas sondas se pueden aplicar en dos o más (posiblemente tantas como sondas haya) posiciones distintas y conocidas sobre un sustrato sólido. A menudo, es preferible aplicar dos o más sondas juntas en una y la misma posición de dicho soporte sólido.

Para diseñar sondas con las características deseadas, se pueden aplicar las siguientes guías útiles conocidas por la persona experta en la técnica.

Debido a que la extensión y especificidad de las reacciones de hibridación tales como las descritas aquí se ven afectadas por un número de factores, la manipulación de uno o más de esos factores determinará la sensibilidad y especificidad exactas de una sonda particular, ya sea perfectamente complementaria a su diana o no. La importancia y efecto de diversas condiciones de ensayo, explicadas posteriormente aquí, son conocidos por los expertos en la técnica.

La estabilidad del híbrido de ácido nucleico [sonda:diana] se debería de elegir para que sea compatible con las condiciones del ensayo. Esto se puede lograr evitando largas secuencias ricas en AT, terminando los híbridos con pares de bases G:C, y diseñando la sonda con una T_m apropiada. Los puntos de comienzo y final de la sonda se deberían de elegir de forma que la longitud y % de GC den como resultado una T_m de alrededor de 2-10°C mayor que la temperatura a la que se llevará a cabo el ensayo final. La composición de bases de la sonda es significativa, debido a que los pares de bases G-C muestran una mayor estabilidad térmica en comparación con los pares de bases A-T, debido a enlace de hidrógeno adicional. De este modo, la hibridación que implica ácidos nucleicos complementarios de mayor contenido de G-C será estable a mayores temperaturas.

Cuando se diseña una sonda, también se deberían tener en cuenta las condiciones tales como la fuerza iónica y la temperatura de incubación en las que se usará una sonda. Se sabe que la hibridación aumentará a medida que aumenta la fuerza iónica de la mezcla de reacción, y que la estabilidad térmica de los híbridos aumentará al aumentar la fuerza iónica. Por otro lado, los reactivos químicos tales como formamida, urea, DMSO y alcoholes, que destruyen los enlaces de hidrógeno, aumentarán la restricción de la hibridación. La desestabilización de los enlaces de hidrógeno por tales reactivos puede reducir enormemente la T_m. En general, la hibridación óptima para sondas oligonucleotídicas sintéticas de alrededor de 10-50 bases de longitud se produce aproximadamente 5°C por debajo de la temperatura de fusión para un dúplex dado. La incubación a temperaturas por debajo de la óptima puede permitir que secuencias de bases desemparejadas se hibriden, y por lo tanto puede dar como resultado una especificidad reducida.

Es deseable tener sondas que se hibridan solo en condiciones de elevada restricción. En condiciones de elevada restricción, sólo se formarán híbridos de ácidos nucleicos altamente complementarios; los híbridos sin un grado suficiente de complementariedad no se formarán. En consecuencia, la restricción de las condiciones de ensayo determina la cantidad de complementariedad necesaria entre dos hebras de ácido nucleico que forman un híbrido. El grado de restricción se elige para maximizar la diferencia de estabilidad entre el híbrido formado con el ácido nucleico diana y

el ácido nucleico que no es la diana. En el presente caso, es necesario detectar cambios de pares de bases individuales, lo que requiere condiciones de restricción muy elevada.

También puede ser importante la longitud de la secuencia de ácido nucleico diana, y, en consecuencia, la longitud de la secuencia de la sonda. En algunos casos, puede haber varias secuencias procedentes de una región particular, que varían en localización y longitud, que producirán sondas con las características de hibridación deseadas. En otros casos, una secuencia puede ser significativamente mejor que otra que difiere simplemente en una única base. Aunque es posible que los ácidos nucleicos que no son perfectamente complementarios se hibriden, el tramo más largo de la secuencia de bases perfectamente complementaria normalmente determinará principalmente la estabilidad del híbrido. Aunque se pueden usar sondas oligonucleotídicas de diferentes longitudes y composición de bases, las sondas oligonucleotídicas preferidas de esta invención tienen una longitud de alrededor de 5 a 50 (más particularmente 10-25) bases, y tienen un tramo suficiente en la secuencia que es perfectamente complementaria a la secuencia de ácido nucleico diana.

Se prefieren menos las regiones en el ADN o ARN diana que se sabe que forman estructuras internas fuertes inhibitoras de la hibridación. Igualmente, se deberían evitar las sondas con una autocomplementariedad amplia. Como se explica anteriormente, la hibridación es la asociación de dos hebras sencillas de ácidos nucleicos complementarios para formar una hebra doble enlazada por hidrógeno. Es implícito que si una de las dos hebras está completa o parcialmente implicada en un híbrido que será menos capaz de participar en la formación de un nuevo híbrido. Pueden existir híbridos intramoleculares e intermoleculares formados en la molécula de un tipo de sonda si hay suficiente autocomplementariedad. Tales estructuras se pueden evitar a través de un diseño cuidadoso de las sondas. Diseñando una sonda para que una porción sustancial de la secuencia de interés sea monocatenaria, se puede incrementar enormemente la velocidad y grado de hibridación. Hay disponibles programas de ordenador para buscar este tipo de interacción. Sin embargo, en ciertos casos, puede no ser posible evitar este tipo de interacción.

Las condiciones de hibridación y de lavado estándar se describen en la sección de Materiales y Métodos de los Ejemplos. Otras condiciones son, por ejemplo, 3X SSC (citrato salino sódico), 20% de FA (formamida) desionizada a 50°C.

También se pueden usar otras disoluciones (SSPE (EDTA con fosfato salino sódico), TMACI (cloruro de tetrametilamonio), etc.) y temperaturas, con la condición de que se mantengan la especificidad y sensibilidad de las sondas. Si es necesario, se han de llevar a cabo ligeras modificaciones de las sondas en longitud o en secuencia para mantener la especificidad y sensibilidad requeridas en las circunstancias dadas.

En una realización más preferente, los ácidos polinucleicos mencionados anteriormente procedentes de la etapa (i) o (ii) se hibridan con al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte, o más de las sondas específicas de la región diana mencionadas anteriormente, preferiblemente con 5 ó 6 sondas, que, tomadas en conjunto, cubren la "región de mutación" del gen de HBV relevante.

La expresión "región de mutación" significa la región en la secuencia génica de HBV relevante en la que está localizada al menos una mutación que codifica un mutante de HBV en una parte preferida de esta región de mutación, representada en la figura 1.

Además de las regiones de mutación como se definen anteriormente, los genomas de tipo salvaje o mutantes de HBV también pueden mostrar variaciones nucleotídicas polimórficas en posiciones distintas de las citadas como posiciones variadas específicas de genotipo o específicas de mutante como se muestra en la Figura 1.

Puesto que algunas mutaciones pueden aparecer de forma más frecuente que otras, por ejemplo en ciertas áreas geográficas o en circunstancias específicas (por ejemplo, comunidades más bien cerradas), puede ser apropiado seleccionar sólo mutaciones específicas, usando un conjunto seleccionado de sondas como se indica anteriormente. Esto daría como resultado un ensayo más simple, que cubriría las necesidades en ciertas circunstancias.

A fin de detectar genotipos de HBV y mutantes de HBV con el conjunto seleccionado de sondas oligonucleotídicas, se puede usar cualquier método de hibridación conocido en la técnica (transferencia de punto convencional, transferencia Southern, sándwich, etc.).

Sin embargo, a fin de obtener resultados rápidos y fáciles si está implicada una multitud de sondas, puede ser más conveniente un formato de hibridación inversa.

En una realización preferida, el conjunto seleccionado de sondas se inmoviliza a un soporte sólido en localizaciones distintas conocidas (puntos, líneas, u otras figuras). En otra realización preferida, el conjunto seleccionado de sondas se inmoviliza a una tira de membrana en forma de línea. Dichas sondas se pueden inmovilizar individualmente o como mezclas para delinear localizaciones sobre el soporte sólido.

Una realización específica y muy fácil de usar del método preferente mencionado anteriormente es el método de LiPA, en el que el conjunto de sondas mencionado anteriormente se inmoviliza en líneas paralelas sobre una membrana, como se describe posteriormente en los ejemplos.

La invención también proporciona un conjunto de cebadores que permiten la amplificación de la región del gen de HBV respectivo a detectar por medio de sondas. En la Tabla 1 y en la Figura 1 se dan ejemplos de tales cebadores de la invención.

Los cebadores se pueden marcar con un marcador de elección (por ejemplo biotina). Se pueden usar diferentes sistemas de amplificación diana a base de cebadores, y preferiblemente amplificación mediante PCR, como se expone en los ejemplos. Se puede usar PCR de una sola ronda o anidada.

La invención también proporciona un kit de ensayo según la reivindicación 3.

La expresión "tampón de hibridación" significa un tampón que permite que se produzca una reacción de hibridación entre las sondas y los ácidos polinucleicos presentes en la muestra, o los productos amplificados, en las condiciones de restricción apropiadas.

La expresión "disolución de lavado" significa una disolución que permite lavar los híbridos formados en las condiciones de restricción apropiadas.

Como se ilustra en la sección de Ejemplos, se diseñó un ensayo de sondas en líneas (LiPA) para identificar genotipos de HBV y/o mutantes de HBV. El principio del ensayo se basa en una hibridación inversa de un fragmento de ácido polinucleico amplificado, tal como un fragmento de PCR biotinilado del gen de HBV sobre oligonucleótidos cortos. Este último híbrido se puede detectar entonces, vía un acoplamiento de biotina-estreptavidina, con un sistema de desarrollo del color no radioactivo.

Los siguientes ejemplos sólo sirven para ilustrar la presente invención. Estos ejemplos no pretenden limitar de ningún modo el alcance de la presente invención.

LEYENDAS DE LAS FIGURAS Y DE LAS TABLAS

Figura 1: Alineamiento de 35 genomas de HBV completos. Los aislados que pertenecen al genotipo A son: HBVXCPS, HBVADW, HVHEPB, S50225, HPBADWZCG; genotipo B: HPBADW3, HPBADWZ, HPBADW1, HPBADW2; genotipo C: HPBCGADR, HBVADRM, HPBADRA, HPBCG, HEHBVAYR, HBVADR, HBVADR4, HPBADR1C, HPBADRC, HBVPREX, HPBETNC, HHVBC, HHVCCHA; genotipo D: HBVAYWMCG, HBVAYWC, HBVAYWCI, HBVAYWE, HBVDNA, HPBHBVAA, XXHEPAV, HBVORFS; genotipo E: HHVBE4, HHVBBAS; y genotipo F: HHBF, HHVBFFOU, HBVADW4A. Para conservar el alineamiento, se crearon varios saltos en el alineamiento, y se indican con /. Se indican las posiciones del comienzo y final de los diferentes genes codificados de HBV: HBsAg: antígeno de superficie de la hepatitis B (antígeno de superficie pequeño); HBx: proteína X de la hepatitis B; HB Pol: proteína polimerasa de la hepatitis B, que codifica una proteína terminal, un espaciador, una región de RT/ADN polimerasa, y una actividad de ARNasa H; HBcAg: antígeno del núcleo de la hepatitis B; HBpreS1Ag: antígeno preS1 de la hepatitis B (antígeno de superficie grande); HBpreS2Ag: antígeno preS2 de la hepatitis B (antígeno de superficie medio). La posición de los cebadores de la PCR se indica con una gran caja a lo largo de las 35 secuencias. La polaridad del cebador de la PCR se puede deducir a partir de la posición del nombre encima de estas cajas: izquierda = cebador antisentido; derecha = cebador sentido. Las sondas de LiPA se indican con cajas pequeñas; los números de las sondas se indican próximos a las sondas o a la derecha del alineamiento, y corresponden a los números de sondas en la Tabla 1.

Figura 2: Diseño de LiPA para HBV. Se detalla el contenido de una tira de LiPA para HBV. Para cada número de línea, se indica la región en el genoma vírico, junto con el genotipo que se detecta, el número de sonda que corresponde con las cajas del alineamiento en la Figura 1, y la secuencia de la sonda.

Figura 3: Resultado combinado de la determinación genotípica en el barrido de la región de preS1 y de preCore en 24 muestras. La interpretación de cada muestra se da bajo cada tira. Las reactividades de las sondas en las líneas 3 a 14 se obtienen a partir del fragmento de PCR de preS1; la reactividad de las sondas en las líneas 15 a 27 son debidas al fragmento de PCR de preCore. Los genotipos se indican de A a F. La interpretación para la región de preCore es la siguiente: W = tipo salvaje; M = mutante; I = indeterminada, queriendo decir que no se observa reactividad, lo que es debido a mutaciones que todavía no se pudieron detectar con las sondas seleccionadas; mix = mezcla de tipo salvaje y mutante; la interpretación del codón 15 es sólo relevante para el genotipo A, la ausencia de reactividad en HBPr 45 para los genotipos B a F no es útil según se indica con – (no aplicable). Puesto que la presencia o ausencia de mutaciones de preCore tiene efecto sobre el estado serológico de HBeAg, esto también se indica.

Figura 4: Sondas usadas en LiPA para HBV. Las sondas se diseñaron para genotipar en la región de HBsAg, y para la detección de mutaciones resistentes a fármacos en el motivo YMDD (véase también la Figura 5), así como para la detección de mutaciones en la región de preCore (véase también la Figura 6).

Figura 5: Ejemplo de un ensayo de LiPA que combina el genotipado de HBV en la región de HBsAg y la detección de mutaciones resistentes a fármacos en el motivo YMDD. Los genotipos se indican de A a F. El diseño de la tira se muestra a la derecha, correspondiendo los números de las sondas a los números en la Tabla 1 y en la Figura 4. Los genotipos y los motivos mutantes a los que se hibrida cada sonda se escriben en la parte derecha más externa. La combinación de sondas reactivas permite la determinación de un genotipo único.

Figura 6: Ejemplo de la determinación de mutaciones de preCore mediante la técnica de LiPA. El diseño de la tira se muestra a la derecha, correspondiendo los números de las sondas a los números en la Tabla 1. Las secuencias diana mutantes a las que se hibridan las sondas se indican en la parte derecha más externa. El motivo M2 corresponde a una mutación en el codón 28, M4 corresponde a una mutación en el codón 29. M2/M4 tiene mutaciones tanto en 28 como en 29.

Figura 7: Detección de una mutación en el motivo YMDD de pol de HBV al tratar con lamivudina. La gráfica muestra el paso del tiempo de la carga viral durante el tratamiento con lamivudina. A la derecha se muestran tiras de LiPA, que corresponden a ensayos al comienzo del tratamiento (5/95), 10 meses de tratamiento (2/96) y 14 meses de tratamiento (6/96). El ensayo muestra que durante el tratamiento el motivo YMDD muta a YVDD.

Tabla 1: Repaso de todos los cebadores y sondas citados en las Figuras con una indicación de sus SEC ID NO respectivas y la región del genoma de HBV para la que se diseñan. Los cebadores de la región de PreS1 incluyen 1, 106, 2 (cebadores sentido) y 4, 107 y 3 (cebadores antisentido). Los cebadores procedentes de la región de HBsAg incluyen 75 y 104 (cebadores sentido) y 76, 94 y 105 (cebadores antisentido). Los cebadores procedentes de la región de preCore incluyen 5, 6, 69, 70, 84, 86, 87 y 108 (cebadores sentido) y 7, 8, 85 y 109 (cebadores antisentido). Los oligonucleótidos que quedan son sondas procedentes de las regiones de PreCore, PreS1, HBsAg y del gen pol RT de HBV, como se indica. El motivo YMDDV y sus mutantes consisten en aminoácidos 551 a 555 de la proteína RT pol; la secuencia MGVGL y su mutante consiste en aminoácidos 519 a 523 de la proteína RT pol; la secuencia SPFL y sus mutantes y variantes genotípicas consisten en aminoácidos 524 a 528 de la proteína RT pol.

Tabla 1: Diseño de sondas y cebadores de HBV

Nombre	Secuencia	SEC ID nº	Región
HBPr1	GGGTCACCATATTCTTGGG	1	Cebador de preS1 sentido
HBPr2	GAACAAGAGCTACAGCATGGG	2	Cebador de preS1 sentido
HBPr3	CCACTGCATGGCCTGAGGATG	3	Cebador de preS1 anti-sentido
HBPr4	GTTCTT/GGAACAGGGCGCCACCAG	4	Cebador de preS1 anti-sentido
HBPr5	TCTTTGTATTAGGAGGCTGTAG	5	Cebador de pre-Core sentido
HBPr6	GCTGTAGGCATAAATTGGTCTG	6	Cebador de pre-Core sentido
HBPr7	CTCCACAGT/AAGCTCCAAATTC	7	Cebador de preCore anti-sentido
HBPr8	GAAGGAAAGAAGTCAGAAGGC	8	Cebador de preCore anti-sentido
HBPr9	TGGCTTTGGGGCATGG	9	preCore
HBPr10	TGGCTTTAGGGCATGG	10	preCore
HBPr11	TGGCTTTAGGACATGG	11	preCore
HBPr12	AAGTTGCATGGTGCTG	12	preCore
HBPr13	CACCTCTGCCTAATCAT	13	preCore

Nombre	Secuencia	SEC ID nº	Región
HBPr14	TGGGGTGGAGCCCTCAG	14	preS1
HBPr15	CCCACCAGCCAACCAG	15	preS1
HBPr16	CCCATGGGGGACTGT	16	preS1
HBPr17	AACCCCAACAAGGATG	17	preS1
HBPr18	TCCACCAGCAATCCT	18	preS1
HBPr19	TGGGGGAAGAATATTT	19	preS1
HBPr20	AAATTCCAGCAGTCCC	20	preS1
HBPr21	GTTCCCMCCCTCTGG	21	preS1
HBPr22	MCCTCGCMAGGCAT	22	preS1
HBPr23	TGCATTCAAAGCCAAC	23	preS1
HBPr24	TACTCACAACGTGCC	24	preS1
HBPr25	ACCCTCCGTTCCGAGC	25	preS1
HBPr26	CACGAAGACAGCCTAC	26	preS1
HBPr27	GATCCAGCCTTCAGAG	27	preS1
HBPr28	ATGCTCCAGCTCCTAC	28	preS1
HBPr29	GCTTTCTTGGACGGTC	29	preS1
HBPr30	CTACCCCAATCACTCC	30	preS1
HBPr31	AGCACCTCTCTCAACG	31	preS1
HBPr32	CCAATGGCAAACAAGG	32	preS1
HBPr33	CTGACGGCTCCACCCCA	33	preS1
HBPr34	ATGCMCTTTTTACCC	34	preCore
HBPr35	ATCTCTTGATCATGTC	35	preCore
HBPr36	ATCTCATGTTTATGTC	36	preCore
HBPr37	CAGTGGGACATGTACA	37	preCore
HBPr38	CAGTAGGACATGAACA	38	preCore
HBPr39	CTGTTCAAGCCTCCAA	39	preCore
HBPr40	AGCCTCCAAGCTGTGC	40	preCore
HBPr41	AAAGCCACCCAAGGCA	41	preCore
HBPr42	TGGCTTTAGGACATGGA	42	preCore
HBPr43	GACATGTACAAGAGATGA	43	preCore
HBPr44	GACATGAACATGAGATCA	44	preCore
HBPr45	TGTACATGTCCCACTGTT	45	preCore
HBPr46	TGTTTATGTCCTACTGTT	46	preCore
HBPr47	ACTGTTCAAGCCTCCAAG	47	preCore
HBPr48	GGCACAGGCTTGGAGGCIT	48	preCore
HBPr49	AAAGCCACCCAAGGCACA	49	Precore
HBPr50	CCCACACGGTTGGGAAC	50	preS1
HBPr51	CAGCATGGGGCAGAATCT	51	preS1

Nombre	Secuencia	SEC ID nº	Región
HBPr52	TCCACCAGCAATCCTCTG	52	preS1
HBPr53	GGATCCAGCCTTCACAGC	53	preS1
HBPr54	TCAGGAAGACAGCCTAC	54	preS1
MBPr55	TTCAACCCCAACAAGGATC	55	preS1
HBPr56	AATGCTCCAGCTCCTAC	56	preS1
HBPr57	CTGCATTCAAAGCCAACT	57	preS1
HBPr58	CCCCATGGGGGACTGTTG	58	preS1
HBPr59	CATACTCACAAGTGTGCCA	59	preS1
HBPr60	GGGCTTTCTTGACGGTCC	60	preS1
HBPr61	CTCTCGAATGGGGGAAGA	61	preS1
HBPr62	CCTACCCCAATCACTCCA	62	preS1
HBPr63	ACCACCTCTCTCAACGACA	63	preS1
HBPr64	GCAAATTCCAGCAGTCCCG	64	preS1
HBPr65	GCCAATCGCAAACAAGGTA	65	preS1
HBPr66	GACATGAACATGACATG	66	preCore
HBPr67	GGACATCAACAAGAGAT	67	preCore
HBPr68	GACATGTACAAGAGATG	68	preCore
HBPr69	ACATAAGAGGACTCTTGAC	69	Cebador de pre-Core sentido
HBPr70	TACTTCAAAGACTGTGTGTTA	70	Cebador de preCore sentido
HBPr71	ACAAAGACCTTTAAC/TCT	71	Promotor de pre-Core
HBPr72	ACAAAGATCATTAAAC/TCT	72	Promotor de pre-Core
HBPr73	TTCCACCAGCAATCCTC	73	preS1
HBPr74	GATCCAGCCTTCAGAGC	74	preS1
HBPr75	CAAGGTAGTTGCCCGTTTGTCC	75	Cebador de HBsAg sentido
HBPr76	CCAAACAGTGGGGGAAGCCC	76	Cebador de HBsAg anti-sentido
HBPr77	CTACGGATGGAATTTGC	77	codón 115 de HBsAg de tipo salvaje
HBPr78	TACGGACGGAAACTGC	78	codón 145 de HBsAg de tipo salvaje
HBPr79	TTCGGACGGAAACTGC	79	codón 145 de

Nombre	Secuencia	SEC ID nº	Región
			HBsAg de tipo salvaje
HBPr80	CTTCGGACGGAAATTGC	80	codón 145 de HBsAg de tipo salvaje
HBPr81	CTACGGATAGAAATTGC	81	codón 145 de HBsAg mutante
HBPr82	CTTCGGACAGAAATTGC	82	codón 145 de HBsAg mutante
HBPr83	CTATGGGAGTGGGCCTCAGT/CC	83	Pol de HB
HBPr84	GCTGTAGGCATAAATTGGTCTG	84	Cebador de pre-Core sentido
HBPr85	CTCCACAGT/AAGCTCCAAATTC	85	Cebador de preCore anti-sentido
HBPr86	ACATAAGAGGACTCTTGGAC	86	Cebador de pre-Core sentido
HBPr87	TACTTCAAGGACTGTGTGTTTA	87	Cebador de pre-Core sentido
HBPr88	TAGGTAAAGGTCTTTGT	88	Promotor de pre-Core
HBPr89	TAGGTAAATCATCTTTGT	89	Promotor de pre-Core
HBPr90	CATGTCCCACTGTTCAA	90	preCore
HBPr91	CATGTCCTACTGTTCAA	91	preCore
HBPr92	TTCTGCCCCATGCTGTA	92	preS1
HBPr93	TTCTCCCCCATGCTGTAC	93	preS1
HBPr94	GGTAA/TAAAGGGACTCAC/AGATG	94	Cebador de HBsAg anti-sentido
HBPr95	TCACCTATATGGATGAT	95	Pol de HB
HBPr96	CAGCTATATGGATGAT	96	Pol de HB
HBPr97	TTCAGCTATATGGATG	97	Pol de HB
HBPr98	TCAGTTATATGGATGAT	98	Pol de HB
HBPr99	TTTCAGTTATATGGATG	99	Pol de HB
HBPr100	TTTAGTTATATGGATGA	100	Pol de HB
HBPr101	TCAGCTATGTGGATGAT	101	Pol de HB
HBPr102	TCAGTTATGTGGATCAT	102	Pol de HB
HBPr103	TTTCAGCTATGTGGATG	103	Pol de HB
HBPr104	CAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCC	104	Cebador de HBsAg

Nombre	Secuencia	SEC ID nº	Región
			sentido
HBPr105	GGT/CAA/TAAACGGACTCAC/AGATG	105	Cebador de HBsAg anti-sentido
HBPr106	GGGTCACCATATTCTTGGG	106	Cebador de preS1 sentido
HBPr107	GTTCTT/GGAACTGGAGCCACCAG	107	Cebador de preS1 anti-sentido
HBPr108	CCGGAAAGCTTGAGCTCTTCTTTTTCACCTCTGCCTAATC	108	Cebador de pre-Core sentido
HBPr109	CCGGAAAGCTTGAGCTCTTCAAATGTTGCATGGTGCTGG	109	Cebador de preCore anti-sentido
HBPr110	CCTCTGCCGATCCATACTGCGGAAC	110	Cebador de preX sentido
HBPr111	CTGCGAGGCGAGGGAGTTCTTCTTC	111	Cebador de Core de HB anti-sentido
HBPr112	TGCCATTTGTTCAAGTGGTTCGTAGGGC	112	Cebador de HBPsAg sentido
HBPr113	CCGGCAGATGAGAAGGCACAGACGG	113	Cebador de HBX antisentido
HBPr114	TTCAGCTATATGGATGAT	114	Motivo YMDD
HBPr115	TCAGCTATATGCATGATG	115	Motivo YMDD
HBPr116	TTCAGCTATGTGGATGAT	116	Motivo YMDD
HBPr117	TCAGCTATGTGGATGATG	117	Motivo YMDD
HBPr118	GGCTTTGGGGCATGG	118	codón 28 de preCore de tipo salvaje
HBPr119	TGGCTTTGGGGCATG	119	codón 28 de preCore de tipo salvaje
HBPr120	GTGGCTTTGGGGCATG	120	codón 28 de preCore de tipo salvaje
HBPr121	GGCTTTGGGCCATGGA	121	codón 28 de preCore de tipo salvaje
HBPr122	TGGCTTTGGGACATGG	122	codón 28 de preCore de tipo salvaje, codón 29 mutante
HBPr123	GGCTTTGGGACATGG	123	codón 28 de preCore de tipo salvaje, codón 29 mutante
HBPr124	TGGCTTTGGGACATG	124	codón 28 de preCore de tipo salvaje,

Nombre	Secuencia	SEC ID nº	Región
			codón 29 mutante
HBPr125	GTGGCTTTGGGACATG	125	codón 28 de preCore de tipo salvaje, codón 29 mutante
HBPr126	GGCTTTGGGACATGGA	126	codón 28 de preCore de tipo salvaje, codón 29 mutante
HBPr127	TCAGTTATATGGATGATG	127	genotipo D de YMDD, tipo salvaje
HBPr128	TTCAGTTATATGGATGAT	128	genotipo D de YMDD, tipo salvaje
HBPr129	TTTCAGTTATATGGATGAT	129	genotipo D de YMDD, tipo salvaje
HBPr130	TCAGTTATGTGGATGATG	130	genotipo D de YMDD, mutante
HBPr131	TTCAGTTATGTGGATGAT	131	genotipo D de YMDD, mutante
HBPr132	TTTCAGTTATGTGGATGAT	132	genotipo D de YMDD, mutante
HBPr133	TTTCAGTTATGTGGATGA	133	genotipo D de YMDD, mutante
HBPr134	TGCTGCTATGCCTCATCTTC	134	Cebador de HBsAg externo sentido
HBPr135	CA(G/A)AGACAAAAGAAAATTGG	135	Cebador de HBsAg externo anti-sentido
HBPr136	CTATGGATGGAAATTGC	136	codón 143 mutante de HBsAg
HBPr137	CCTATGGATGGAAATTG	137	codón 143 mutante de HBsAg
HBPr138	ACCTATGGATGGAAATT	138	codón 143H mutante de HBsAg
HBPr139	CT CAA GGC AAC TCT ATG TGG	139	HBsAg, genotipo A
HBPr140	CT CAA GGC AAC TCT ATG GG	140	HBsAg, genotipo A
HBPr141	T CAA GGC AAC TCT ATG TTG	141	HBsAg, genotipo A
HBPr142	ATC CCA TCA TCT TGG G	142	HBsAg, genotipo B
HBPr143	ATC CCA TCA TCT TGG GCG G	143	HBsAg, genotipo B
HBPr144	TC CCA TCA TCT TGG GCG G	144	HBsAg, genotipo B
HBPr145	C CCA TCA TCT TGG GCT GG	145	HBsAg, genotipo B
HBPr146	TTC GCA AAA TAC CTA TGG	146	HBsAg, genotipo B

Nombre	Secuencia	SEC ID nº	Región
HBPr147	T TTC GCA AAA TAC CTA TG	147	HBsAg, genotipo B
HBPr148	CT TTC GCA AAA TAC CTA TG	148	HBsAg, genotipo B
HBPr149	TC GCA AAA TAC CTA TGG G	149	HBsAg, genotipo B
HBPr150	T CTA CTT CCA GGA ACA T	150	HBsAg, genotipo C
HBPr151	T CTA CTT CCA GGA ACA TC	151	HBsAg, genotipo C
HBPr152	CT CTA CTT CCA GGA ACA T	152	HBsAg, genotipo C
HBPr153	CT CTA CTT CCA GGA ACA G	153	HBsAg, genotipo C
HBPr154	C TGC ACG ATT CCT GCT	154	HBsAg, genotipo C
HBPr155	TGC ACG ATT CCT GCT CA	155	HBsAg, genotipo C
HBPr156	C TGC ACG ATT CCT GCT C	156	HBsAg, genotipo C
HBPr157	TGC ACG ATT CCT GCT CAA	157	HBsAg, genotipo C
HBPr158	TTC GCA AGA TTC CTA TG	158	HBsAg, genotipo C
HBPr159	CT TTC GCA AGA TTC CTA T	159	HBsAg, genotipo C
HBPr160	CT TTC GCA AGA TTC CTA	160	HBsAg, genotipo C
HBPr161	CT TTC GCA AGA TTC CTA TG	161	HBsAg, genotipo C
HBPr162	C TCT ATG TAT CCC TCC T	162	HBsAg, genotipo D
HBPr163	TCT ATG TAT CCC TCC TG	163	HBsAg, genotipo D
HBPr164	C TCT ATG TAT CCC TCC TGG	164	HBsAg, genotipo D
HBPr165	CC TCT ATG TAT CCC TCC T	165	HBsAg, genotipo D
HBPr166	C TGT ACC AAA CCT TCG G	166	HBsAg, genotipo D
HBPr167	C TGT ACC AAA CCT TCG	167	HBsAg, genotipo D
HBPr168	GC TGT ACC AAA CCT TCG G	168	HBsAg, genotipo D
HBPr169	TGT ACC AAA CCT TCG GAG	169	HBsAg, genotipo D
HBPr170	GGA CCC TGC CGA ACC T	170	HBsAg, genotipo E
HBPr171	GGA CCC TGC CGA ACC G	171	HBsAg, genotipo E
HBPr172	G GGA CCC TGC CGA AC	172	HBsAg, genotipo E
HBPr173	GGA CCC TGC CGA AC	173	HBsAg, genotipo E
HBPr174	GT TGC TGT TCA AAA CCT T	174	HBsAg, genotipo E
HBPr175	GT TGC TGT TCA AAA CCT G	175	HBsAg, genotipo E
HBPr176	TGT TGC TGT TCA AAA CCT G	176	HBsAg, genotipo E
HBPr177	A TGT TGC TGT TCA AAA CCT G	177	HBsAg, genotipo E
HBPr178	GA TCC ACG ACC ACC A	178	HBsAg, genotipo F
HBPr179	GGA TCC ACG ACC ACC A	179	HBsAg, genotipo F
HBPr180	GGA TCC ACG ACC ACC	180	HBsAg, genotipo F
HBPr181	GA TCC ACG ACC ACC AGG	181	HBsAg, genotipo F
HBPr182	TGT TCC AAA CCC TCG G	182	HBsAg, genotipo F
HBPr183	C TGT TCC AAA CCC TCG	183	HBsAg, genotipo F
HBPr184	C TGT TCC AAA CCC TCG G	184	HBsAg, genotipo F

Nombre	Secuencia	SEC ID nº	Región
HBPr185	GT TCC AAA CCC TCG GAT	185	HBsAg, genotipo F
HBPr186	G CCA AAT CTG TGC AGC	186	HBsAg, genotipo F
HBPr187	CCA AAT CTG TGC AGC AT	187	HBsAg, genotipo F
HBPr188	G CCA AAT CTG TGC AGC AG	188	HBsAg, genotipo F
HBPr189	GG CCA AAT CTG TGC AGC	189	HBsAg, genotipo F
HBPr190	A TCA ACA ACA ACC AGT A	190	HBsAg, genotipo A
HBPr191	GA TCA ACA ACA ACC AGT	191	HBsAg, genotipo A
HBPr192	GA TCA ACA ACA ACC AGT A	192	HBsAg, genotipo A
HBPr193	GGA TCA ACA ACA ACC AGT	193	HBsAg, genotipo A
HBPr194	T CAA GGC AAC TCT ATG TGG	194	HBsAg, genotipo A
HBPr195	AGG TTA AAG GTC TTT GT	195	promotor genotipo A tipo salvaje
HBPr196	T AGG TTA AAG GTC TTT GG	196	promotor genotipo A tipo salvaje
HBPr197	TT AGG TTA AAG GTC TTT	197	promotor genotipo A tipo salvaje
HBPr198	GG TTA AAG GTC TTT GTA GG	198	promotor genotipo A tipo salvaje
HBPr199	AGG TTA ATG ATC TTT GT	199	promotor genotipo A mutante
HBPr200	T AGG TTA ATG ATC TTT GG	200	promotor genotipo A mutante
HBPr201	CT TTC GCA AGA TTC CTA TGG	201	codón 160 de genotipo C de HBsAg
HBPr202	GCT TTC GCA AGA TTC CTA TG	202	codón 160 de genotipo C de HBsAg
HBPr202	GCT TTC GCA AGA TTC CTA TGG	203	codón 160 de genotipo C de HBsAg
HBPr204	CT TTC GCA AGA TTC CTA TGG G	204	codón 160 de genotipo C de HBsAg
HBPr205	GC TGT ACC AAA CCT TCG GAG	205	codón 140 de genotipo D de HBsAg
HBPr206	TGC TGT ACC AAA CCT TCG G	206	codón 140 de genotipo D de HBsAg
HBPr207	TGC TGT ACC AAA CCT TCG GAG	207	codón 140 de genotipo D de HBsAg
HBPr208	GC TGT ACC AAA CCT TCG GAT	200	codón 140 de genotipo D de HBsAg

Nombre	Secuencia	SEC ID nº	Región
HBPr209	TGG TTC GCC GGG CTT T	209	Codón 184 de ge- notipo E de HBsAg
HBPr210	G TGG TTC GCC GGG CTT G	210	Codón 184 de ge- notipo E de HBsAg
HBPr211	GG TTC GCC GGG CTT TC	211	Codón 184 de ge- notipo E de HBsAg
HBPr212	TGG TTC GCC GGG CTT TC	212	Codón 184 de ge- notipo E de HBsAg
HBPr213	AG TGG TTC GCC GGG CTG G	213	Codón 184 de ge- notipo E de HBsAg
HBPr214	A GGA TCC ACC ACC ACC AGG	214	Genotipo F de HBsAg
HBPr215	A GGA TCC ACG ACC ACC AGT	215	Genotipo F de HBsAg
HBPr216	CA GGA TCC ACG ACC ACC AGG	216	Genotipo F de HBsAg
HBPr217	C TGT TCC AAA CCC TCG GAG	217	Genotipo F de HBsAg
HBPr218	C TGT TCC AAA CCC TCG GAT	218	Genotipo F de HBsAg
HBPr219	GC TGT TCC AAA CCC TCG GAG	219	Genotipo F de HBsAg
HBPr220	CTGAACCTTTACCCCGTTGC	220	Cebador potencia- dor
HBPr221	CTCGCCAACCTTACAAGGCCTTTC	221	Cebador potencia- dor
HBPr222	AGAATGGCTTGCCTGAGTGC	222	Cebador de Core anti-sentido
HBPr223	GCT TTC GCA AGA TTC CTA TGG G	223	codón 160 de geno- tipo C de HBsAg
HBPr224	G GCT TTC GCA AGA TTC CTA TGG	224	codón 160 de geno- tipo C de HBsAg
HBPr225	G GCT TTC GCA AGA TTC CTA TGG G	225	codón 160 de geno- tipo C de HBsAg
HBPr226	G GCT TTC GCA AGA TTC CTA TGG GA	226	codón 160 de geno- tipo C de HBsAg
HBPr227	C AGC TAT ATG GAT GAT GTG	227	Motivo YMDDV
HBPr228	AGC TAT ATG GAT GAT GTG GG	228	Motivo YMDDV
HBPr229	GC TAT ATG GAT GAT GTG GT	229	Motivo YMDDV

Nombre	Secuencia	SEC ID nº	Región
HBPr230	AGC TAT ATG GAT GAT GTG GT	230	Motivo YMDDV
HBPr231	C AGC TAT ATG GAT GAT ATA	231	MOTIVO YMDDI
HBPr232	AGC TAT ATG GAT GAT ATA GG	232	MOTIVO YMDDI
HBPr233	GC TAT ATG GAT GAT ATA GT	233	MOTIVO YMDDI
HBPr234	AGC TAT ATG GAT GAT ATA GT	234	MOTIVO YMDDI
HBPr235	CCA TCA TCT TGG GCT TG	235	codón 155 de genotipo B de HBsAg
HBPr236	CA TCA TCT TGG GCT TT	236	codón 155 de genotipo B de HBsAg
HBPr237	CCA TCA TCT TGG GCT TT	237	codón 155 de genotipo B de HBsAg
HBPr238	CCA TCA TCT TGG GCT TTC	238	codón 155 de genotipo B de HBsAg
HBPr239	CCC ACT GTC TGG CTT TC	239	codón 190 de genotipo B de HBsAg
HBPr240	CC ACT GTC TGG CTT TC	240	codón 190 de genotipo B de HBsAg
HBPr241	CC ACT GTC TGG CTT T	241	codón 190 de genotipo B de HBsAg
HBPr242	CCC ACT GTC TGG CTT G	242	codón 190 de genotipo B de HBsAg
HBPr243	TAT ATG GAT GAT GTG GTA	243	MOTIVO YMDDV
HBPr244	TAT GTG GAT GAT GTG GTA	244	MOTIVO YVDDV
HBPr245	TAT ATA GAT GAT GTG GTA	245	MOTIVO YIDDV
HBPr246	TAT ATT GAT GAT GTG GTA	246	MOTIVO YIDDV
HBPr247	TAT GTA GAT GAT GTG GTA	247	MOTIVO YVDDV
HBPr248	TAT GTT GAT GAT GTG GTA	248	MOTIVO YVDDV
HBPr249	TAT ATG GAT GAT ATA GTA	249	MOTIVO YMDDI
HBPr250	TAT ATG GAT GAT ATC GTA	250	MOTIVO YMDDI
HBPr251	TAT GTG GAT GAT ATA GTA	251	MOTIVO YVDDI
HBPr252	TAT GTG GAT GAT ATC GTA	252	MOTIVO YVDDI
HBPr253	TAT ATA GAT GAT ATA GTA	253	MOTIVO YIDDI
HBPr254	TAT ATA GAT GAT ATC GTA	254	MOTIVO YIDDI
HBPr255	TAT ATT GAT GAT ATA GTA	255	MOTIVO YIDDI
HBPr256	TAT ATT GAT GAT ATC GTA	256	MOTIVO YIDDI
HBPr257	TAT GTA GAT GAT ATA GTA	257	MOTIVO YVDDI
HBPr258	TAT GTA GAT GAT ATC GTA	258	MOTIVO YVDDI
HBPr259	TAT GTT GAT GAT ATA GTA	259	MOTIVO YVDDI

Nombre	Secuencia	SEC ID nº	Región
HBPr260	TAT GTT GAT GAT ATC GTA	260	MOTIVO YVDDI
HBPr261	TAT ATG GAT GAT CTG GTA	261	MOTIVO YMDDL
HBPr262	TAT GTG GAT GAT CTG GTA	262	MOTIVO YVDDL
HBPr263	TAT ATA GAT GAT CTG GTA	263	MOTIVO YIDDL
HBPr264	TAT ATT GAT GAT CTG GTA	264	MOTIVO YIDDL
HBPr265	TAT GTA GAT GAT CTG GTA	265	MOTIVO YVDDL
HBPr266	TAT GTT GAT GAT CTG GTA	266	MOTIVO YVDDL
HBPr267	T ATG GGA GTG GGC CTC AG	267	MGVGL
HBPr268	T ATG GGA TTG GGC CTC AG	268	MGLGL
HBPr269	C AGT CCG TTT CTC TTG GC	269	SPFLL

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Preparación de ADN de HBV y amplificación mediante PCR

Se recogieron muestras de suero procedentes de individuos positivos a HBsAg, y se almacenaron a menos 20°C hasta uso en alícuotas de 0,5 ml. Para preparar el genoma vírico, se mezclaron 18 µl de suero con 2 µl de NaOH 1 N, y se incubó a 37°C durante 60 minutos. La desnaturalización se detuvo y se neutralizó añadiendo 20 µl de HCl 0,1 N. Después de la etapa de centrifugación de 15 minutos, el sobrenadante se recogió, y el pelete se desechó. Se llevó a cabo una PCR sobre este lisado según lo siguiente: se mezclaron 32 µl de H₂O con 5 µl de tampón de PCR 10x, 1 µl de dXTP 10 mM, 1 µl de cada cebador biotinilado (10 pmoles/µl), 10 µl de lisado sérico, y 2 U de enzima Taq. El esquema de amplificación contenía 40 ciclos de 95°C durante 1 minuto, hibridación a 45°C durante 1 minuto, y alargamiento a 72°C durante 1 minuto. Los productos de la amplificación se visualizaron en gel de agarosa al 3%.

El conjunto de cebadores exteriores para preS1 tuvo la siguiente secuencia:

sentido exterior: HBPr 1: 5'-bio-GGGTCACCATATTCTTGGG-3'

antisentido exterior: HBPr 4: 5'-bio-GTTCC(T/G)GAAGTGGAGCCACCAG-3'

El conjunto de cebadores exteriores para preCore tuvo la siguiente secuencia:

sentido exterior: HBPr 69: 5'-bio-ACATAAGAGGACTCTTGGAC-3'

antisentido exterior: HBPr 8: 5'-bio-GAAGGAAAGAAGTCAGAAGGC-3'

El conjunto de cebadores exteriores para HBsAg tuvo la siguiente secuencia:

sentido exterior: HBPr 134: 5'-bio-TGCTGCTATGCCTCATCTTC-3'

antisentido exterior: HBPr 135: 5'-bio-CA(G/A)AGACAAAAGAAAATTGG-3'

Las muestras que fueron negativas en la PCR de primera ronda se volvieron a ensayar en una reacción anidada compuesta de lo siguiente: µl de H₂O, 5 µl de tampón Taq 10x, 1 µl de dXTP 10 mM, 1 µl de cada cebador anidado (10 pmoles/µl), 1 µl del producto de la PCR de primera ronda, y 2 U de Taq polimerasa. El esquema de amplificación fue idéntico al de la PCR de primera ronda. La secuencia de los cebadores anidados fueron las siguientes, para la región de preS1:

sentido anidado: HBPr 2: 5'-bio-GAACAAGAGCTACAGCATGGG-3'

antisentido anidado: HBPr 3: 5'-bio-CCACTGCATGGCCTGAGGATG-3';

y para la región de preCore:

sentido anidado: HBPr 70: 5'-bio-TACTTCAAAGACTGTGTGTTTA-3'

antisentido anidado: HBPr 7: 5'-bio-CTCCACAG(T/A)AGCTCCAAATTC-3'

En una segunda reacción, la región de HBsAg se puede amplificar en un protocolo similar usando los siguientes cebadores: HBPr 75: 5'-bio-CAAGGTATGTTGCCGTTTGTCC-3' en combinación con HBPr 76: 5'-bio-CCAAACAGTGGGGGAAAGCCC-3'; o con HBPr 94: 5'-bio-GGTA(A/T)AAAGGGACTCA(C/A)GATG-3'.

Ejemplo 2. Preparación de los Ensayos de Sondas en Líneas

Se diseñaron sondas para cubrir los motivos universales, genotípicos y mutantes. En principio, sólo se utilizaron sondas que discriminan entre una variación de un solo nucleótido. Sin embargo, para ciertos polimorfismos en los finales extremos de la sonda, se toleró una reactividad cruzada. La especificidad se alcanzó experimentalmente para cada sonda de forma individual después de considerar el % (G + C), la longitud de la sonda, la concentración final, y la temperatura de hibridación. Se proporcionaron sondas optimizadas enzimáticamente con una cola poly-T usando TdT (Pharmacia) en una condición de reacción estándar. De forma breve, se incubaron 400 pmoles de sonda a 37°C en 30 µl de mezcla de reacción que contiene 5,3 mM de dTTP, 25 mM de Tris.HCl pH 7,5, 0,1 M de cacodilato sódico, 1 mM de CoCl₂, 0,1 M de DTT y 170 U de desoxinucleotidil transferasa terminal (Pharmacia). Después de una hora de incubación, la reacción se detuvo y las sondas terminadas se hicieron precipitar y se lavaron con etanol enfriado con hielo. Las sondas se disolvieron en 6 x SSC a sus concentraciones específicas respectivamente, y se aplicaron como líneas horizontales sobre tiras de membrana en concentraciones entre 0,2 y 2,5 pM/ml. Como control positivo, se aplicó en el lado ADN biotinilado (línea 1 de LiPA). Los oligonucleótidos se fijaron a la membrana cociendo a 80°C durante 12 horas. La membrana se rebanó entonces en tiras de 4 mm. El diseño de esta tira se indica en la Figura 2.

Ejemplo 3. Comportamiento del ensayo de LiPA

Se mezclaron volúmenes iguales (10 µl cada uno) del fragmento de PCR biotinilado y de la disolución de desnaturalización (DS; 400 mM de NaOH/10 mM de EDTA) en recipientes de ensayo, y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después, se añadieron 2 ml de la disolución de hibridación precalentada a 37°C (HS, 3 x SSC/0,1% de SDS), seguido de la adición de una tira por recipiente de ensayo. La hibridación se produjo durante 1 hora a 50 ± 0,5°C en un baño de agua agitado cerrado. Las tiras se lavaron dos veces con 2 ml de disolución de lavado restrictivo (3 x SSC/0,1% de SDS) a temperatura ambiente durante 20 segundos, y una vez a 50°C durante 30 minutos. Después del lavado restrictivo, las tiras se aclararon dos veces con 2 ml de la disolución de aclarado (RS) estándar de Innogenetics. Las tiras se incubaron en una plataforma giratoria con el conjugado de estreptavidina marcado con fosfatasa alcalina, se diluyeron en disolución de conjugado estándar durante 30 minutos a temperatura ambiente (20 a 25°C). Las tiras se lavaron entonces dos veces con 2 ml de RS y una vez con tampón de sustrato estándar (SB), y se inició la reacción de color añadiendo BCIP y NBT al SB. Después de un máximo de 30 minutos a temperatura ambiente, la reacción de color se detuvo sustituyendo los compuestos de color por agua destilada. Inmediatamente después de secar, las tiras se interpretaron. Las reactividades se consideraron positivas siempre que la reactividad fue más fuerte que la reacción en el control negativo. Las tiras se pueden almacenar en un lugar oscuro seco. El procedimiento completo descrito anteriormente también se puede sustituir por el dispositivo automático estándar Inno-LiPA (auto-LiPA).

Ejemplo 4. Selección de material de referencia.

Se prepararon fragmentos de PCR, derivados de miembros de los diferentes genotipos, las diferentes secuencias de tipo salvaje y mutante de preCore, motivos resistentes a fármacos y mutantes de escape de vacuna. Los fragmentos de PCR se amplificaron con cebadores que carecen del grupo biotina en su extremo 5', y se clonaron en el sitio EcoRV pretratado del vector pGEMT (Promega). Los clones recombinantes se seleccionaron después de la complementación α y análisis de la longitud de los fragmentos de restricción, y se secuenciaron con cebadores plasmídicos. Otros fragmentos biotinilados se secuenciaron directamente con un protocolo terminador de colorante (Applied Biosystems), usando los cebadores de amplificación. Como alternativa, se llevó a cabo una PCR anidada con análogos de los cebadores, en los que el grupo biotina se sustituyó por la secuencia del cebador T7 y SP6, respectivamente. Estos amplicones se secuenciaron entonces con un procedimiento de cebador de colorante de SP6 y T7. Al hacer esto, se preparó un panel de referencia de clones recombinantes, lo que es necesario para optimizar sondas de LiPA.

Ejemplo 5: Genotipado de muestras séricas infectadas con HBV

Sólo tras crear un alineamiento de secuencias como se muestra en la Figura 1, se vio claramente qué regiones podrían ser útiles para el genotipado de HBV. La región de preS1 parece ser adecuada debido al elevado grado de variabilidad. Por lo tanto, se diseñaron sondas para cubrir la mayoría de estas regiones variables, como se muestra en la Tabla 1. Sólo se obtuvo una selección limitada de sondas, debido a su reacción específica con el panel de referencia. Las más importantes se indican como regiones encajonadas en la Figura 1. Estas sondas seleccionadas se aplicaron entonces en un formato de LiPA indicado en la Figura 2, como número de línea 2 a 14. Algunas de las sondas se pudieron aplicar juntas en una línea, debido a su carácter universal, mientras que fue necesario aplicar separadamente otras. Con la selección de sondas así obtenida, se ensayaron las muestras séricas recogidas en diferentes partes del mundo (Europa, Sudamérica, África, Oriente Medio). La parte superior de la Figura 3 muestra la reactividad de una selección de muestras en estas sondas. El genotipado de estas muestras es directo, perteneciendo las muestras 2 a 8 al genotipo A, perteneciendo las muestras 9 y 10 al genotipo B, perteneciendo las muestras 11 y 12 al genotipo C, perteneciendo las muestras 13 a 19 al genotipo D, perteneciendo las muestras 20 a 23 al genotipo E, y perteneciendo la muestra 24 al genotipo F.

El genotipado también se puede llevar a cabo en la región de HBsAg. Nuevamente, se diseñaron sondas para cubrir la mayoría de las regiones variables mostradas en la Fig. 1. Sólo se obtuvo una selección limitada de sondas.

Estas sondas están encajonadas en la Fig. 1 y se enumeran en la Figura 4. Se preparó una tira de LiPA que posee estas sondas, y se caracterizaron las muestras que pertenecen a los diferentes genotipos, como se muestra en la Fig. 5.

Ejemplo 6. Barrido de la región de preCore en busca de mutaciones.

La expresión de HBeAg se puede regular a nivel transcripcional y traduccional. Se postula que existe una regulación transcripcional debido a la presencia de una variación dinucleotídica en la región promotora del ARNm de preCore. Se seleccionaron sondas que cubren el motivo de tipo salvaje (por ejemplo sonda HBPr 88) y el motivo mutante (por ejemplo HBPr 89), y sus posiciones se indican en el alineamiento mostrado en la Figura 1, y se aplicaron en la tira de LiPA como línea 15 y 16 (Figura 2).

A nivel translacional, pueden surgir muchas más mutaciones, todas dando como resultado posiblemente la anulación de la expresión de HBeAg: cualesquiera mutaciones en el codón 1 (ATG) que destruye el inicio de la traducción, codón 2 (CAA a TAA), codón 7 (TGC a TGA), codón 12 (TGT a TGA), codón 13 en el genotipo B, C, D, E, F (TCA a TGA o TAA), codón 14 (TGT a TGA), codón 18 (CAA a TAA), codón 21 (AAG a TAG), codón 23 (TGC a TGA), codón 26 (TGG a TAG o TGA), codón 28 (TGG a TAG o TGA). Sin embargo, debido al constreñimiento secundario de la señal de encapsidamiento, la mayoría de las mutaciones se producen en el codón 28 (TGG a TAG). Junto con la mutación en el codón 28, a menudo se observa una segunda mutación en el codón 29 (GGC a GAC). En el caso del genotipo A, y nuevamente como consecuencia del constreñimiento secundario, las mutaciones del codón de parada en el codón 28 sólo es probable que ocurran después de la selección de una mutación del codón 15 (CCC a CCT). Por tanto, la interpretación correcta de las mutaciones de preCore depende del genotipo. Además de los codones de parada mencionados anteriormente, una gran cantidad de diferentes mutaciones de supresión o inserción en el marco de lectura abierto del preCore puede dar esencialmente el mismo resultado.

A fin de desarrollar un ensayo sensible para detectar las mutaciones relevantes y las mutaciones hipotéticas, se desarrolló un procedimiento de barrido de sondas. Se diseñaron sondas que solapan parcialmente, y se aplicaron en un formato de LiPA (Figura 2, línea 17 a 27). En este formato de ensayo, se reconocen de forma positiva las secuencias de tipo salvaje a lo largo de la región de preCore completa, junto con la variación del codón 15 para el genotipo A frente a genotipos que no son A, y las mutaciones más habituales en el codón 28 (TAG), en el codón 29 (GAC) y la combinación del codón 28 y 29 (TAGGAC). La ausencia de reactividad en una de las otras sondas siempre indica la presencia de una variación. La naturaleza exacta de esta variación se puede revelar entonces mediante análisis de secuencias, o con otras sondas de LiPA diseñadas.

La Figura 3 muestra la reactividad de las muestras genotipadas seleccionadas en las sondas para la región de preCore. Las muestras se ensayaron previamente en busca de la presencia de HBeAg o de anti-HBe. La interpretación de la reactividad en las sondas de LiPA para cada muestra se indica debajo de cada tira. Este enfoque permitió el cribado simultáneo de una muestra para mutaciones de preCore, y la caracterización del genotipo vírico.

La Figura 6 también muestra un panel de muestras con mutaciones en la región de preCore, así como muestras de tipo salvaje. Las sondas usadas en este ensayo se enumeran en la Figura 4. Este ensayo incluye un mutante del codón 29 (motivo M4), que no estaba presente en el experimento en la Figura 3.

Ejemplo 7. Detección de mutantes en la región de HBsAg.

Se han descrito mutantes de escape de vacuna. El mutante más habitualmente encontrado es la variación en el codón 145 de HBsAg (G145R o GGA a AGA). Se diseñaron sondas de LiPA para detectar sondas de tipo salvaje y mutantes. Existen variaciones genotípicas en la vecindad del codón 145. Por lo tanto, el genotipo A está cubierto por la sonda 77, el genotipo B por la sonda 78, el genotipo C por la sonda 79, y el genotipo D/E por la sonda 80. Por tanto, en principio, es posible genotipar y detectar las cepas de tipo salvaje del virus en un único experimento. Las secuencias diana mutantes están cubiertas por la sonda 81 y 82 para el genotipo A y D, respectivamente. La sonda 83 se puede usar como un control positivo en estos experimentos. La detección adicional de mutantes en la región determinante a es posible por medio de un enfoque de barrido de sondas. Aquí por lo tanto, se diseñan sondas para cubrir la secuencia de tipo salvaje de los diferentes genotipos a lo largo de la región del epítipo de HBsAg, y se aplicaron en un formato de LiPA. Nuevamente aquí, la ausencia de tinción en una de estas sondas indica la presencia de una cepa mutante. La naturaleza exacta de esta variante se determinó entonces mediante análisis de secuenciación.

Ejemplo 8. Detección de cepas de HBV resistentes a lamivudina.

A través de la analogía con el HIV y la resistencia frente al compuesto antiviral 3TC (lamivudina o (-)-β-2',3'-didesoxi-3'-tiacitidina), se predijo que al tratar pacientes infectados con HBV con 3TC, se seleccionarían cepas víricas que muestran resistencia al motivo YMDD en el gen de HB pol. El motivo YMDD está localizado físicamente en la región de HBsAg, pero está codificado en otro marco de lectura. Por tanto, esta parte de la región de pol de HBV es amplificada con la combinación de cebadores HBPr 75-HBr 94, pero no con la combinación HBPr 75-HBr 76. Las sondas que cubren el motivo YMDD de tipo salvaje y el motivo mutante YVDD se indican en la Figura 1, respectivamente sondas 95 a 100 y 101 a 103, así como las sondas 115, 116, 127 y 132, produciendo estas últimas sondas los mejores resultados en el ensayo de LiPA. Tal ensayo se usó para determinar la presencia de mutaciones en el motivo YMDD en suero de

un paciente infectado con HBV durante el tratamiento con lamivudina. La Fig. 7 muestra que en la primera fase del tratamiento (mayo de 1995) no se detectaron mutaciones. Durante el tratamiento, la carga vírica disminuyó, alcanzando un nivel de aproximadamente 10^4 durante noviembre y diciembre de 1995, con lo que después se observó un rebrote, dando como resultado un nivel tan alto como durante los primeros meses de tratamiento hacia junio de 1996. De forma interesante, un ensayo de LiPA realizado en febrero de 1996 indicó que la mayoría del virus presente poseía una mutación en el motivo YMDD, que había cambiado a YVDD. En junio de 1996, no se pudo detectar ya más el motivo de tipo salvaje, sino sólo YVDD mutante. Con este ensayo, se pueden detectar fácilmente así cepas de HBV resistentes. Además, la detección combinada del motivo YMDD y los mutantes de preCore puede ser clínicamente importante en la predicción y pronóstico del tratamiento posterior.

REFERENCIAS

Asseline U, Delarue M, Lancelot G, Toulme F, Thuong N (1984) Nucleic acid-binding molecules with high affinity and base sequence specificity: intercalating agents covalently linked to oligodeoxynucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81(11):3297-301.

Barany F. Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 189-193.

Bej A, Mahbubani M, Miller R, Di Cesare J, Half L, Atlas R. Multiplex PCR amplification and immobilized capture probes for detection of bacterial pathogens and indicators in water. *Mol Cell Probes* 1990; 4:353-365.

Boom R., Sol C.J.A., Salimans M.M.M., *et al.* Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 495-503.

Carman W, Zanetti A, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G, Tanzi E, Zuckerman A, y Thomas H. Vaccine induced escape mutants. *Lancet* 1990; 336:325-329.

Carman W, Korula J, Wallace L, MacPhee R, Mimms L, y Decker R. Fulminant reactivation of hepatitis B due to envelope protein mutant that escaped detection by monoclonal HBsAG ELISA. *Lancet* 1995; 345: 1406-1407.

Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature* 1991; 350: 91-92.

Crawford D. Hepatitis B virus 'escape' mutants: Arare event which causes vaccination failure. *British Med. J.* 1990; 301: 1058-1059.

Duck P. Probe amplifier system based on chimeric cycling oligonucleotides. *Biotechniques* 1990; 9: 142-147.

Gao Q, Gu Z, Parniak M, Cameron I, Cammack N, Boucher C, y Wainberg M. The same mutation that encodes low-level human immunodeficiency virus type-1 resistance to 2',3'-dideoxyinosine and 2',3'-dideoxycytidine confers high level resistance to the (-) enantiomer of 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993; 37: 1390-1392.

Guatelli J, Whitfield K, Kwoh D, Barringer K, Richman D, Gengeras T. Isothermal, *in vitro* amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1874-1878.

Hadziyannis S. Hepatitis B e antigen negative chronic hepatitis B: from clinical recognition to pathogenesis and treatment. *Viral Hepatitis* 1995; 1: 7-36.

Honkoop P, de Man R, Zondervan P, Niesters H, y Schalm S. Histological improvement in patients with chronic hepatitis B virus infection treated with lamivudine is associated with a decrease in HBV-DNA by PCR. *Hepatology* 1995; 22: abstract 887.

Kwong D, Davis G, Whitfield K, Chappelle H, Dimichele L, Gingeras T. Transcription-based amplification system and detection of amplified human immunodeficiency virus type 1 with a bead-based sandwich hybridization format. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 1173-1177.

Kwok S, Kellogg D, McKinney N, Spasic D, Goda L, Levenson C, Sinisky J. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: Human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucl. Acids Res.* 1990; 18: 999.

Landgren U, Kaiser R, Sanders J, Hood L. A ligase-mediated gene detection technique. *Science* 1988; 241: 1077-1080.

Li J-S, Tong S-P, Wen Y-M, Vivitski L, Zhang Q, y Trépo C. Hepatitis B virus genotype A rarely circulates as an Hbe-minus mutant: possible contribution of a single nucleotide in the preCore region. *J. Virol.* 1993; 67: 5402-5410.

Ling, R., Mutimer, D., Ahmed, M., Boxall, E. H., Elias, E., Dusheiko, G.M. y Harrison, T.J. Selection of mutations in the Hepatitis B Virus polymerase during therapy of transplant recipients with lamivudine. *Hepatology* 1996; 24: 711-713.

Lok A, Akarca U, y Greene S. Mutations in the precore region of hepatitis B virus serve to enhance of the secondary structure of the pre-genome encapsidation signal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91: 4077-4081.

Lomeli H, Tyagi S, Printchard C, Lisardi P, Kramer F. Quantitative assays based on the use of replicatable hybridization probes. *Clin Chem* 1989; 35: 1826-1831.

Magnius L, y Norder H. Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene. *Intervirology* 1995; 38: 24-34.

Matsukura M, Shinozuka K, Zon G, Mitsuya H, Reitz M, Cohen J, Broder S (1987) Phosphorothioate analogs of oligodeoxynucleotides : inhibitors of replication and cytopathic effects of human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84(21):7706-10.

Miller P, Yano J, Yano E, Carroll C, Jayaram K, Ts'o P (1979) Nonionic nucleic acid analogues. Synthesis and characterization of dideoxyribonucleoside methylphosphonates. *Biochemistry* 18(23):5134-43.

Naoumov N, Perillo R, Chokshi S, Dienstag J, Vicary C, Brown N, y Williams R. Reduction in hepatitis B virus quasispecies during lamivudine treatment is associated with enhanced virus replication and hepatocytolysis. *Hepatology* 1995; 22: abstract 885.

Nielsen P, Egholm M, Berg R, Buchardt O (1991) Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* 254(5037):1497-500.

Nielsen P, Egholm M, Berg R, Buchardt O (1993) Sequence specific inhibition of DNA restriction enzyme cleavage by PNA. *Nucleic-Acids-Res.* 21 (2):197-200.

Okamoto H, Yotsumoto S, Akahane Y, Yamanaka T, Miyazaki Y, Sugai Y, Tsuda F, Tanaka T, Miyakawa Y, y Mayumi M. Hepatitis B virus with precore region defects prevail in persistently infected hosts along with seroconversion to the antibody against e antigen. *J. Virol.* 1990; 64: 1298-1303.

Saiki R, Walsh P, Levenson C, Erlich H. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:6230-6234.

Sato S, Suzuki K, Akahane Y, Akamatsu K, Akiyama K, Yunomura K, Tsuda F, Tanaka T, Okamoto H, Miyakawa Y, Mayumi M. Hepatitis B virus strains with mutations in the core promoter in patients with fulminant hepatitis. *Ann. Intern. Medicine* 1995; 122: 241-248.

Shaw, T., Mok, S.S., Locarnini, S.A. Inhibition of hepatitis B virus DNA polymerase by enantiomers of penciclovir triphosphate and metabolic basis for selective inhibition of HBV replication by penciclovir. *Hepatology* 1996; 24: 996-1002.

Stuyver L, Rossau R, Wyseur A, *et al.* Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *J. Gen. Virol.* 1993; 74: 1093-1102.

Takahashi K, Aoyama K, Onhno N, Iwata K, Akahane Y, Baba K, Yoshizawa H, y Mishiro S. The precore/core promoter mutant (T1 762A1764) of hepatitis B virus: clinical significance and an easy method for detection. *J. Gen. Virol.* 1995; 76: 3159-3164.

Tipples, G.A., Ma, M.M., Fischer, K.P., Bain, V.G., Kneteman, N.M. y Tyrell, D.L.J. Mutation in HBV RNA-dependent DNA polymerase confers resistance to lamivudine in vivo. *Hepatology* 1996; 24: 714-717.

Waters J, Kennedy M, Voet P, Hauser P, Petre J, Carman W, and Thomas H. Loss of the common 'a' determinant of hepatitis B surface antigen by vaccine-induced escape mutants. *J. Clin. Invest.* 1992; 90: 2543-2547.

Wu D, Wallace B. The ligation amplification reaction (LAR) - amplification of specific DNA sequences using sequential rounds of template-dependent ligation. *Genomics* 1989; 4:560-569.

Yuan T, Faruqi A, Shih J, y Shih C. The mechanism of natural occurrence of two closely linked HBV precore predominant mutations. *Virol.* 1995; 211; 144-156.

Zhang X, Zoulim F, Habersetzer F, Xiong S, y Trépo C. Analysis of hepatitis B virus genotypes and preCore region variability during interferon treatment of Hbe antigen negative chronic hepatitis B. *J. Med. Virol.* 1996; xxx-xxx.

REIVINDICACIONES

1.- Un método para la detección de tanto genotipos de cepas de HBV como de mutantes de HBV resistentes a fármacos, en una muestra biológica, que comprende:

- (i) si es necesario, liberar, aislar o concentrar los ácidos polinucleicos presentes en dicha muestra;
- (ii) si es necesario, amplificar la parte relevante de un gen de HBV adecuado presente en dicha muestra con al menos un par de cebadores adecuados;
- (iii) hibridar los ácidos polinucleicos de la etapa (i) o (ii) con una combinación de al menos una sonda procedente de cada uno de los siguientes grupos:

- SEC ID 77, 81, 139-141, 190-194

- SEC ID 78, 142-147, 149

- SEC ID 79, 150-161, 204

- SEC ID 82, 162-169, 208

- SEC ID 170-176, 213

- SEC ID 178-189, 214-219,

- opcionalmente una o más de SEC ID 80, 148 y 177, y al menos una sonda procedente de cada uno de los siguientes grupos:

- SEC ID 114, 115, 127-129, 227-234, 243, 249, 250, 261

- SEC ID 116, 117, 130-133, 244-248, 251-260, 262-266, y/o al menos una sonda procedente de:

- SEC ID 267 y 269, cada una junto con SEC ID 268,

- (iv) detectar los híbridos formados en la etapa (iii);

- (v) inferir los genotipos de HBV y los mutantes de HBV resistentes a fármacos presentes en dicha muestra a partir de la señal o señales de hibridación diferenciales obtenidas en la etapa (iv).

2.- Método según la reivindicación 1, en el que las sondas oligonucleotídicas de la etapa (iii) se caracterizan porque detectan específicamente mutaciones de resistencia a fármacos en el motivo YMDD, siendo dichas sondas

- SEQ ID 77, 140 y 193,

- SEQ ID 78,

- SEQ ID 153, 154 y 204,

- SEQ ID 165 y 208,

- SEQ ID 172 y 213,

- SEQ ID 186, 216 y 219,

- SEQ ID 80 y 177,

- SEQ ID 115 y 127,

- SEQ ID 116 y 132.

3.- Un kit de ensayo para la detección de tanto genotipos de cepas de HBV como mutantes de HBV resistentes a fármacos presentes en una muestra biológica según el método de la reivindicación 1, que comprende los siguientes componentes:

- (i) cuando sea apropiado, un medio para liberar, aislar o concentrar los ácidos polinucleicos presentes en dicha muestra;

- (ii) cuando sea apropiado, al menos un par de cebadores adecuado;

- (iii) al menos una sonda procedente de cada uno de los siguientes grupos:

- SEQ ID 77, 81, 139-141, 190-194

- SEQ ID 78, 142-147, 149

- SEQ ID 79, 150-161, 204

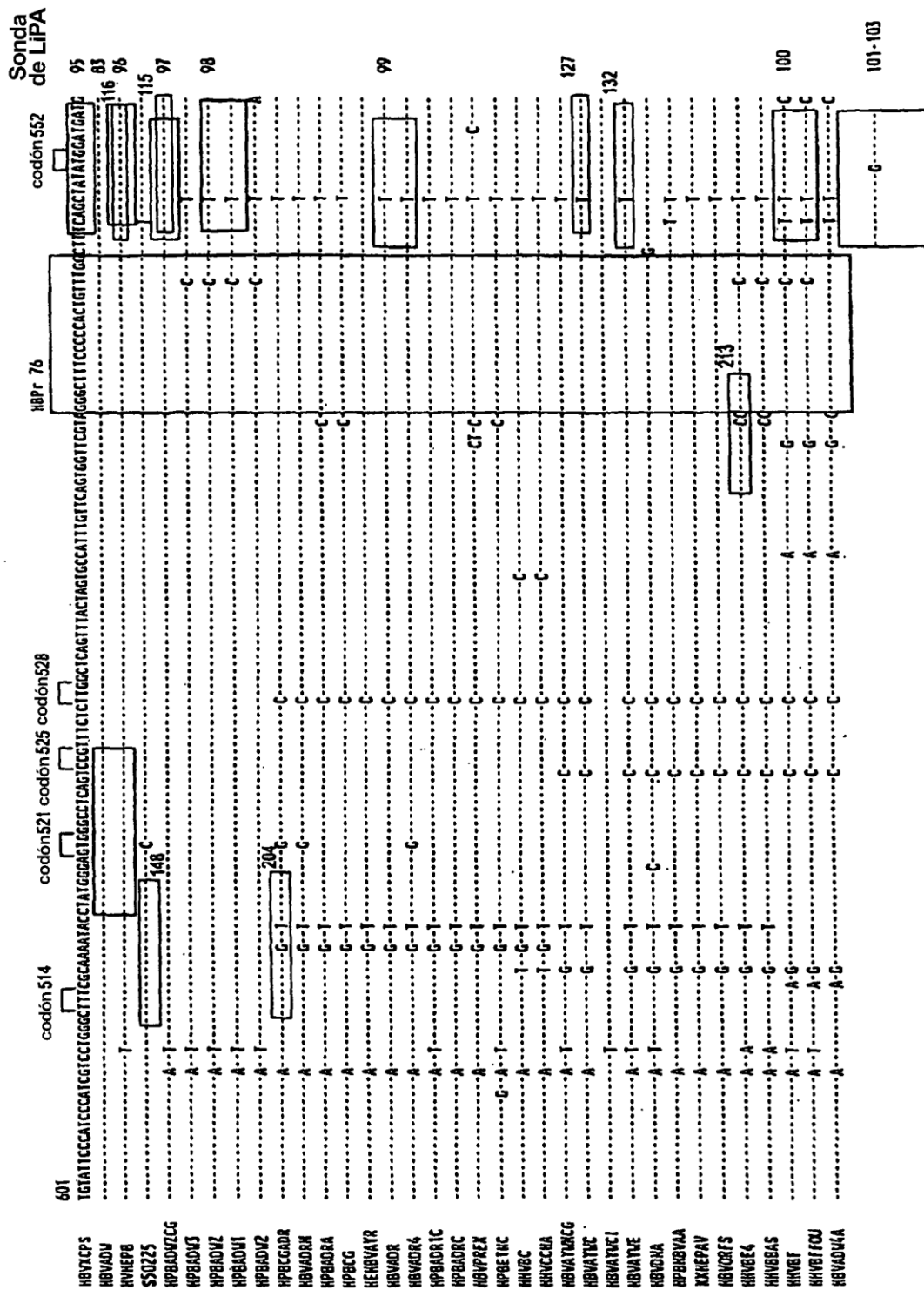
- 5
- SEQ ID 82, 162-169, 208
 - SEQ ID 170-176, 213
 - SEQ ID 178-189, 214-219,
 - opcionalmente una o más de SEQ ID 80, 148 y 177, y al menos una sonda procedente de cada uno de los siguientes grupos:
 - SEQ ID 114, 115, 127-129, 227-234, 243, 249, 250, 261
 - SEQ ID 116, 117, 130-133, 244-248, 251-260, 262-266, y/o al menos una sonda de:
 - SEQ ID 267 y 269, cada una junto con SEQ ID 268, posiblemente fijada a un soporte sólido;
- 10
- (iv) un tampón de hibridación, o componentes necesarios para producir dicho tampón;
 - (v) una disolución de lavado, o componentes necesarios para producir dicha disolución;
 - (vi) cuando sea apropiado, un medio para detectar los híbridos que resultan de la hibridación anterior;
 - (vii) cuando sea apropiado, un medio para unir dicha sonda a una localización conocida sobre un soporte sólido.
- 15
- 4.- Un mutante de HBV que comprende una secuencia nucleotídica que contiene una mutación resistente a fármacos en el gen pol de RT de HBV, en el que la mutación da como resultado un cambio de aminoácido en el motivo YMDD de la polimerasa de HBV, en el que dicho cambio de aminoácido es M a V en la posición 552 según se indica en la figura 1.
- 20
- 5.- Un método para identificar un mutante de HBV como se define en la reivindicación 4, en una muestra, que comprende:
- (i) liberar, aislar o concentrar los ácidos polinucleicos presentes en dicha muestra;
 - (ii) opcionalmente, amplificar al menos una parte del gen de HBV presente en dicha muestra con al menos un par de cebadores;
 - (iii) determinar la presencia o ausencia de una mutación en el gen pol de RT de HBV que da como resultado un cambio de aminoácido en el motivo YMDD de la polimerasa de HBV, en el que dicho cambio de aminoácido es M a V en la posición 552 como se indica en la figura 1, e identificar de ese modo la existencia en dicha muestra de una cepa de HBV resistente a fármacos.
- 25

HBPr 4			
HBVCP5	AAATCCAC1GCTTCCACCAAGCTCTGAGGATCCCAAGTCAGGGGTCTGATCTCTCTCTGTTGGTGGCTCCAGTTGAGGAAGAGTAACCCCTGCTCCGAATATTGCTCTCACATCTCTGTCATCTCCGCGAGGACTGGGGACCTGTG		
HBVADW	G.....		
HBVNEP8	A-C-G.....		
S50225	G.....		
HPBAQVZCG	A-T.....		
HPBAQK3	A-T-A.....		
HPBAQVZ	A-T-A.....		
HPBAQW1	A-T-A.....		
HPBAQVZ	A-T-A.....		
HPBGGADR	A-T-A.....		
HBVADRM	A-T-A.....		
HPBAQRA	A-T-A.....		
HPBGG	A-T-A.....		
HBVAVTR	A-T-A.....		
HBVADR	A-T-A.....		
HBVADR4	A-T-A.....		
HPBAQRI1C	A-T-A.....		
HPBAQRC	A-T-A.....		
HBVPREX	A-T-A.....		
HPBETWC	A-T-A.....		
HBVBC	A-T-A.....		
HBVCCNA	A-T-A.....		
HBVAVLMCG	A-T-A.....		
HBVAVTC	A-T-A.....		
HBVAVTCI	A-T-A.....		
HBVAVTE	A-T-A.....		
HBVOMA	A-T-A.....		
HPBBBVA	A-T-A.....		
XXNEPAV	A-T-A.....		
HBVORFS	A-T-A.....		
HBVBE4	A-T-A.....		
HBVBSAS	A-T-A.....		
HBVBF	A-T-A.....		
HBVBFQJ	A-T-A.....		
HBVADK4A	A-T-A.....		

Fig.1.

Comienza HBsAg	
ACGAAC	ATGGAGAACATCAGGATTCCTAGGACCCCTGCTCGTGTACAGGCGGGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAATTTCTAGGGGGGTACCCGCTGTGT
HBVXCP5	-----C-----A-----
HBVADW	-----C-----AG-----C
HBVIEPB	-----C-----T-----AAA-----
S50225	-----C-----T-----AA-----
HPBADU2CG	-----C-----A-----AA-----
IPBADUJ3	-----C-----A-----AA-----
IPBADU2	-----C-----A-----AA-----
IPBADU1	-----C-----A-----AA-----
IPBADU2	-----C-----A-----AA-----
IPBCGAOR	-----C-----A-----AG-----AC-----
HBVADRM	-----C-----A-----AG-----AC-----
HPBADRA	-----C-----A-----AG-----AC-----
IPBCG	-----C-----A-----AG-----AC-----
HEHBVATR	-----C-----A-----AG-----AC-----
HBVADR	-----C-----A-----AG-----AC-----
HBVADR4	-----C-----A-----AG-----AC-----
IPBADR1C	-----C-----A-----AG-----AC-----
IPBADRC	-----C-----A-----AG-----AC-----
HBVPREX	-----C-----A-----AG-----AC-----
IPBETNC	-----C-----A-----AG-----AC-----
HBVBC	-----C-----A-----AG-----AC-----
HBVCCIA	-----C-----A-----AG-----AC-----
HBVATMCG	-----C-----A-----AG-----AC-----
HBVATYC	-----C-----A-----AG-----AC-----
HBVATYCI	-----C-----A-----AG-----AC-----
HBVATYNE	-----C-----A-----AG-----AC-----
HBVDNA	-----C-----A-----AG-----AC-----
HPRIIVAA	-----C-----A-----AG-----AC-----
XXIEPAV	-----C-----A-----AG-----AC-----
HBVORFS	-----C-----A-----AG-----AC-----
HBVBEA	-----C-----A-----AG-----AC-----
HBVBAS	-----C-----A-----AG-----AC-----
HBVBF	-----C-----A-----AG-----AC-----
HBVBFQJ	-----C-----A-----AG-----AC-----
HBVADU4A	-----C-----A-----AG-----AC-----

32



	NBP-94	fin de HBSag
751	TGGTATTGGGGCCAGACTGTACAGCATCGTGAATGCTTTATACCTGCTTACCAATTTCTTTCTCTCTGGGTATACATTTAACCTTAACAAACAAACAAAGATGGGGTTATTCCTTAACCTTCATGCTCTACATAATTTGGAGTT	-----G-----GT--TG-----
HBVCP5	-----T-----T-----G-----	-----GT--TG-----
HBVADU	-----T-----T-----G-----	-----GT--TG-----
HNHEP8	-----T-----T-----G-----	-----GT--TG-----
SS0225	-----T-----T-----G-----	-----GT--TG-----
HPBADU2CG	-----T-----T-----G-----	-----GT--TG-----
HPBADU3	-----T-----T-----G-----	-----GT--TG-----
HPBADU2	-----T-----T-----G-----	-----GT--TG-----
HPBADU1	-----T-----T-----G-----	-----GT--TG-----
HPBADU2	-----T-----T-----G-----	-----GT--TG-----
HPBCGAD	-----T-----T-----G-----	-----GT--TG-----
HBVADBN	-----T-----T-----G-----	-----GT--TG-----
HPBADRA	-----T-----T-----G-----	-----GT--TG-----
HPBCG	-----T-----T-----G-----	-----GT--TG-----
HEHBVATR	-----T-----T-----G-----	-----GT--TG-----
HBVADR	-----T-----T-----G-----	-----GT--TG-----
HBVADR4	-----T-----T-----G-----	-----GT--TG-----
HPBADR1C	-----T-----T-----G-----	-----GT--TG-----
HPBADRC	-----T-----T-----G-----	-----GT--TG-----
HBVPREX	-----T-----T-----G-----	-----GT--TG-----
HPBETHC	-----T-----T-----G-----	-----GT--TG-----
HNH8C	-----T-----T-----G-----	-----GT--TG-----
HNHCCUA	-----T-----T-----G-----	-----GT--TG-----
HBVATUNCG	-----T-----T-----G-----	-----GT--TG-----
HBVATUC	-----T-----T-----G-----	-----GT--TG-----
HBVATUC1	-----T-----T-----G-----	-----GT--TG-----
HBVATUE	-----T-----T-----G-----	-----GT--TG-----
HBVDNA	-----T-----T-----G-----	-----GT--TG-----
HPBKAVAA	-----T-----T-----G-----	-----GT--TG-----
XXHEP4V	-----T-----T-----G-----	-----GT--TG-----
HBVDRFS	-----T-----T-----G-----	-----GT--TG-----
HNHDE4	-----T-----T-----G-----	-----GT--TG-----
HNHBBAS	-----T-----T-----G-----	-----GT--TG-----
HNHBF	-----T-----T-----G-----	-----GT--TG-----
HNHBF70J	-----T-----T-----G-----	-----GT--TG-----
HBVADJ4A	-----T-----T-----G-----	-----GT--TG-----

[illegible]

[illegible]

[illegible]

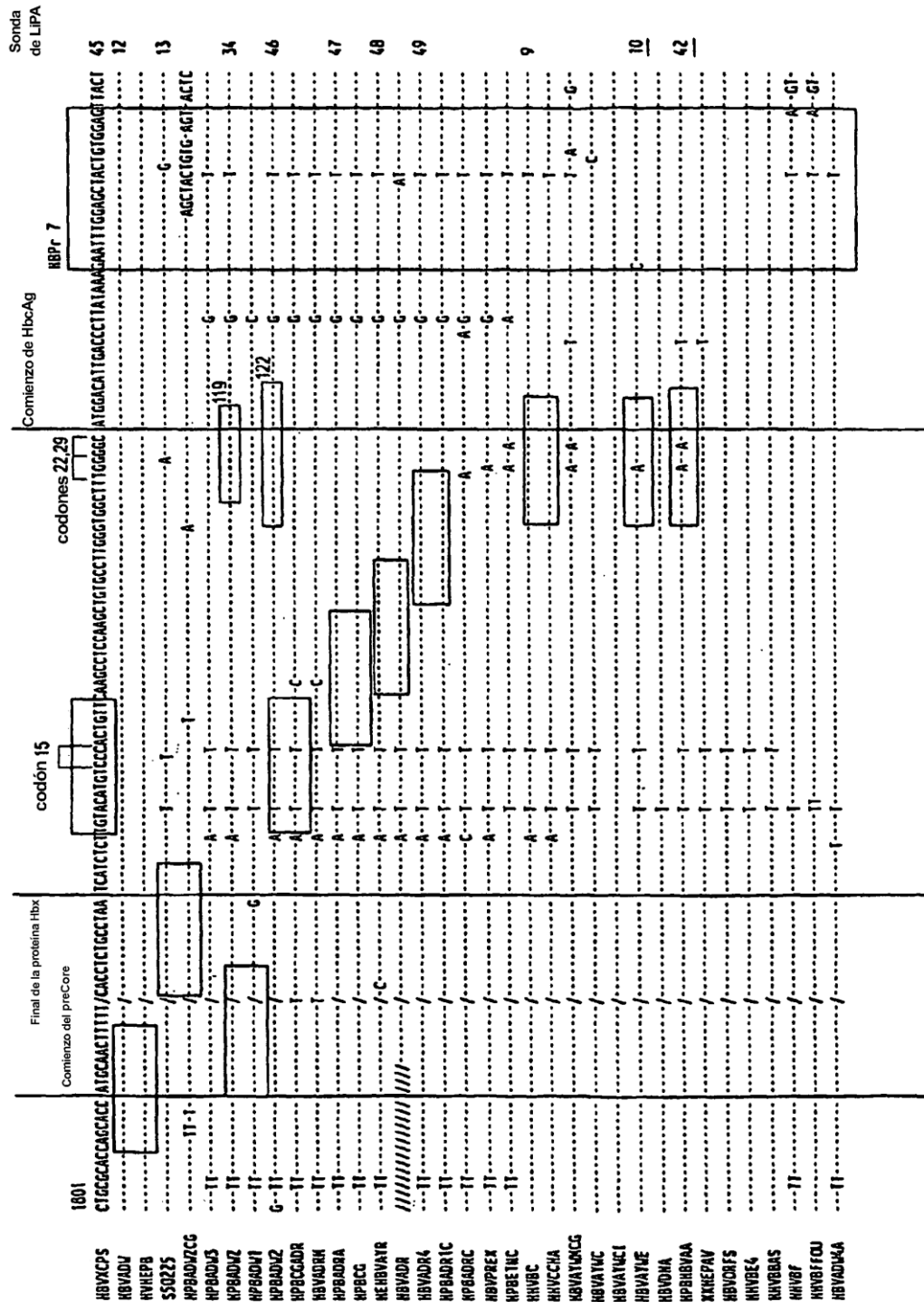
[illegible]

[illegible]

	HBPr 69	HBPr 70	Promotor PreCore	Promotor de núcleo	Sonda LIPA
HBVXCP5	CTTACATAGAGGACCTTTGGACCTTCAGCAATGTCBACGACGACCTTGAGGCG	ACTTCAAGACCTGTGTGTTTACGACTCGGACGACCTCGGCGACGACCTTTAGAGTCTTTAGGAGGCTGTAGGCATAAATTTGGT	T-A.....	T-A.....	
HBVADW	C.....	C.....	T-A.....	T-A.....	
KVHEP8	A.....	A.....	T-A.....	T-A.....	
SS0225	C.....	C.....	T-A.....	T-A.....	
HPBADVZEG	A.....	A.....	T-A.....	T-A.....	
HPBADV3	T.....	T.....	T-A.....	T-A.....	
HPBADVZ	T.....	T.....	T-A.....	T-A.....	
HPBADN1	T.....	T.....	T-A.....	T-A.....	
HPBADV2	T.....	T.....	T-A.....	T-A.....	
HPBGGADR	T.....	T.....	T-A.....	T-A.....	
HBVADRN	T.....	T.....	T-A.....	T-A.....	
HPBADRA	T.....	T.....	T-A.....	T-A.....	
HPBGG	T.....	T.....	T-A.....	T-A.....	
HBVADNR	T.....	T.....	T-A.....	T-A.....	
HBVADNR4	T.....	T.....	T-A.....	T-A.....	
HPBADR1C	T.....	T.....	T-A.....	T-A.....	
HPBADRC	T.....	T.....	T-A.....	T-A.....	
HBVPREX	T.....	T.....	T-A.....	T-A.....	
HPBETNC	T.....	T.....	T-A.....	T-A.....	
HBVBC	T.....	T.....	T-A.....	T-A.....	
HBVCCNA	T.....	T.....	T-A.....	T-A.....	
HBVATWCG	T.....	T.....	T-A.....	T-A.....	
HBVATWC	T.....	T.....	T-A.....	T-A.....	
HBVATWCJ	T.....	T.....	T-A.....	T-A.....	
HBVATVE	T.....	T.....	T-A.....	T-A.....	
HBVDHA	T.....	T.....	T-A.....	T-A.....	
KPBHBVAA	T.....	T.....	T-A.....	T-A.....	
XHHEPAV	T.....	T.....	T-A.....	T-A.....	
HBVORTS	T.....	T.....	T-A.....	T-A.....	
HBVBE4	T.....	T.....	T-A.....	T-A.....	
HBVBDAS	T.....	T.....	T-A.....	T-A.....	
KHBVF	T.....	T.....	T-A.....	T-A.....	
HBVBTFCU	T.....	T.....	T-A.....	T-A.....	
HBVADW4A	T.....	T.....	T-A.....	T-A.....	

89

88



[illegible]

IBVACPS	2101	GACCTCTAGCTACCTGGGTGGGTAAATTTGGGAAGATCCAGCATECCAGGGGATCTAGTACGTCAAATTATGTTATATCTAATCAGGCAACATTTGTGGTTTCATATATCTTGCCTTACTTTTGGGAAGAGACACTGTCT
HBVADW		C.....A.....
HBVIEPB		C.....A.....
SSOZ25		C.....A.....
HPBADWZCG		C.....A.....
HPBADW3		C.....A.....
HPBADWZ		C.....A.....
HPBADW1		C.....A.....
HPBADW2		C.....A.....
HPBCGADR		C.....A.....
HBVADRM		C.....A.....
HPBADRA		C.....A.....
HPBCG		C.....A.....
HBVAYTR		C.....A.....
HBVADR		C.....A.....
HBVADR4		C.....A.....
HPBADR1C		C.....A.....
HPBADRC		C.....A.....
HBVPREX		C.....A.....
HPBEINC		C.....A.....
HBVBC		C.....A.....
HBVBC1A		C.....A.....
HBVAYUNCG		C.....A.....
HBVAYNC		C.....A.....
HBVAYUCT		C.....A.....
HBVAYNE		C.....A.....
HBVDNA		C.....A.....
HPBIIBVAA		C.....A.....
XXIEPAV		C.....A.....
HBVORFS		C.....A.....
HBVBE4		C.....A.....
HBVBBAS		C.....A.....
HBVBF		C.....A.....
HBVGFJOU		C.....A.....
HBVADWKA		C.....A.....

[illegible]

[illegible]

[illegible]

	2701	HBPR 1
HBVHPS	TIAMACCTATTATCCGATCAGGTAGTAAATCAT	GGGTCCACATATCTTGG
HBVADW		
HBVIEPB		
SS0225		
HBADWZCG		
HBADWJ3		
HBADW2		
HBADW1		
HBADW2		
HBCCGADR		
HBVADRH		
HBADRA		
HBCCG		
HBVAYR		
HBVADR		
HBVADR4		
HBADR1C		
HBADRC		
HBVPRX		
HBETNC		
HBVBC		
HBVCCIA		
HBVATWCCG		
HBVATUC		
HBVATNC1		
HBVATNE		
HBVONA		
HBVIBVAA		
HBVIEPAV		
HBVORFS		
HBVBC4		
HBVBBAS		
HBVBF		
HBVBF0J		
HBVADW4A		

[illegible]

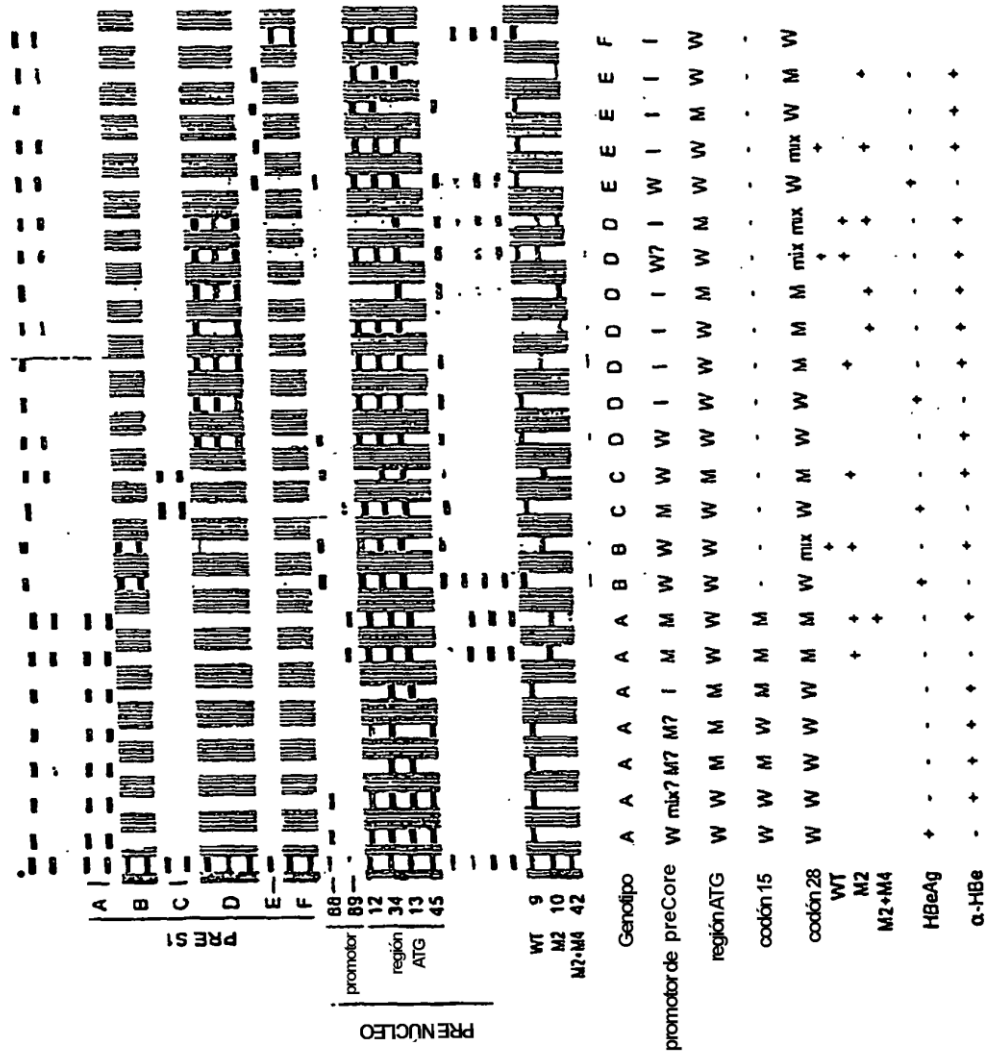
Sonda
de LIPA

3001	ABGGACCACTGGCCAGCCACCACTAGGAGCTGGGAGCATTCGGCCAGGCTCACCCTCCACAGCGGTA1TTGGGTGAGGCTCAGGCTCAGGCGATATTCACACAGTGTCAACAATTCCTCTCTGCTCCACCAAT	15
HBVQPS	CA	33
HBVADW	GGAT	58, 59
HBVPEB	GGAT	
SSQ225	GGAT	
HPBADVZCG	GGAT	
HPBADV3	GGAT	
HPBADV2	GGAT	
HPBADV1	GGAT	
HPBADV2	GGAT	
HPBGGOR	GGAT	
HBVADPH	GGAT	
HPBADRA	GGAT	
HPBGO	GGAT	
HEBVAT1R	GGAT	
HBVADR	GGAT	
HBVADR4	GGAT	
HPBADR1C	GGAT	
HPBADRC	GGAT	
HBVPREX	GGAT	
HPBETNC	GGAT	
HBVBC	GGAT	
HBVCCA	GGAT	
HBVATKQ3	GGAT	
HBVATNC	GGAT	
HBVATC1	GGAT	
HBVATVE	GGAT	
HBVDIA	GGAT	
HPBIBVAA	GGAT	
XXHEPAV	GGAT	
HBVDSFS	GGAT	
HBVBE6	GGAT	
HBVBAS	GGAT	
HBVBF	GGAT	
HBVBF0U	GGAT	
HBVADIAA	GGAT	
56		
65		

50

Diseño de HBV de LiPA			HBPr	
Línea de LiPA	Región	Objetivo	Número de sonda/SEC ID NO	secuencia
0		Línea Pencil		
1		ADN biotinilado		
2	PreS1	contr. ampl.	33	CTGAGGGCTCCACCCCA
3	PreS1	Genotipo A	22	AACCTCGCAAAGGCAT
4	PreS1	Genotipo A	50	CCCAGAGGGTTGGGAAC
	PreS1	Genotipo A	15	GCCAGCAGCCAACCAG
5	PreS1	Genotipo B	57	CTGCATTCAAAGCCAACT
	PreS1	Genotipo B	58	CCCCATGGGGGACTGTTG
6	PreS1	Genotipo B	59	CATACTCACAACGTGTCCA
7	PreS1	Genotipo C	55	TTCAACCCCAACAAGGATC
8	PreS1	Genotipo C	54	TCAGGAAGACAGCCTAC
9	PreS1	Genotipo D	92	TTCTGCCCCATGCTGTA
10	PreS1	Genotipo D	56	AATGCTCCAGCTCCTAC
11	PreS1	Genotipo D	73	TTCCACCAGCAATCCTC
12	PreS1	Genotipo E	60	GGGCTTTCTTGGACGGTCC
	PreS1	Genotipo E	61	CTCTCGAATGGGGGAAGA
	PreS1	Genotipo E	62	CCTACCCCAATCACTCCA
13	PreS1	Genotipo F	63	AGCACCTCTCTCAACGACA
14	PreS1	Genotipo F	64	GCAAATTCAGCAGTCCCG
	PreS1	Genotipo F	65	GCCAATGGCAAACAAGGTA
15	PreCore	promotor	88	TAGGTTAAAGGTCTTTGT
16	PreCore	promotor	89	TAGGTTAATGATCTTTGT
17	PreCore	codón de barrido -2 a +3	12	AAGTTGCATGGTGCTG
18	PreCore	codón de barrido 1 a 5	34	ATGCAACTTTTTCACC
19	PreCore	codón de barrido 5 a 9	13	CACCTCTGCCTAATCAT
20	PreCore	codón de barrido 12 a 17	45	TGTACATGTCCCACTGTT
21	PreCore	codón de barrido 12 a 17	46	TGTTTCATGTCTACTGTT
22	PreCore	codón de barrido 16 a 20	47	ACTGTTCAAGCCTCCAAG
23	PreCore	codón de barrido 19 a 23	48	GGCACAGCTTGGAGGCTT
24	PreCore	codón de barrido 23 a 27	49	AAAGCCACCCAAGGCACA
25	PreCore	codón 28 wt	9	TGGCTTTGGGGCATGG
26	PreCore	codón 28 mt	10	TGGCTTTAGGGCATGG
27	PreCore	codón 28+29 mt	42	TGGCTTTAGGACATGGA

Fig. 2



I = indeterminado, W = tipo salvaje, M = mutante

Fig. 3

Genotipado en HBsAg

Genotipo	Oligo	Secuencia
A	HBPr 193	GGA TCA ACA ACA ACC AGT
	HBPr 140	CT CAA GGC AAC TCT ATG GG
	HBPr 77	CTA CGG ATG GAA ATT GC
B	HBPr 78	TAC GGA CGG AAA CTG C
C	HBPr 153	CT CTA CTT CCA GGA ACA G
	HBPr 154	C TGC ACG ATT CCT GCT
	HBPr 204	CT TTC GCA AGA TTC CTA TGG G
D	HBPr 165	AC TCT ATG TAT CCC TCC T
	HBPr 208	GC TGT ACC AAA CCT TCG GAT
E	HBPr 172	G GGA CCC TGC CGA AC
	HBPr 213	AG TGG TTC GCC GGG CTG G
F	HBPr 216	CA GGA TCC ACG ACC ACC AGG
	HBPr 219	GC TGT TCC AAA CCC TCG GAG
	HBPr 186	G CCA AAT CTG TGC AGC
A/B	HBPr 148	CT TTC GCA AAA TAC CTA TG
C/D/E	HBPr 80	CTT CGG ACG GAA ATT GC
E/F	HBPr 177	ATG TTG CTG TTC AAA ACC TG

Resistencia a fármacos en gen pol de RT

Genotipo	Oligo	Secuencia	
A	HBPr 115	TCA GCT ATA TGG ATG ATG	tipo salvaje mutante
	HBPr 116	TTC AGC TAT GTG GAT GAT	
D	HBPr 127	TC AGT TAT ATG GAT GAT G	tipo salvaje mutante
	HBPr 132	T TTC AGT TAT GTG GAT GAT	

Región de PreCore

Genotipo	Oligo	Secuencia	
	HBPr 88	TAG GTT AAA GGT CTT TGT	promotor tipo salvaje promotor mutante
	HBPr 89	TAG GTT AAT GAT CTT TGT	
	HBPr 119	TGG CTT TGG GGC ATG	codón 28 de tipo salvaje codón 28 M2 mutante
	HBPr 10	TGG CTT TAG GGC ATG G	
	HBPr 122	TGG CTT TGG GAC ATG G	codón 29 M4 mutante codón M2/M4 mutante
	HBPr 42	TGG CTT TAG GAC ATG GA	

Fig. 4

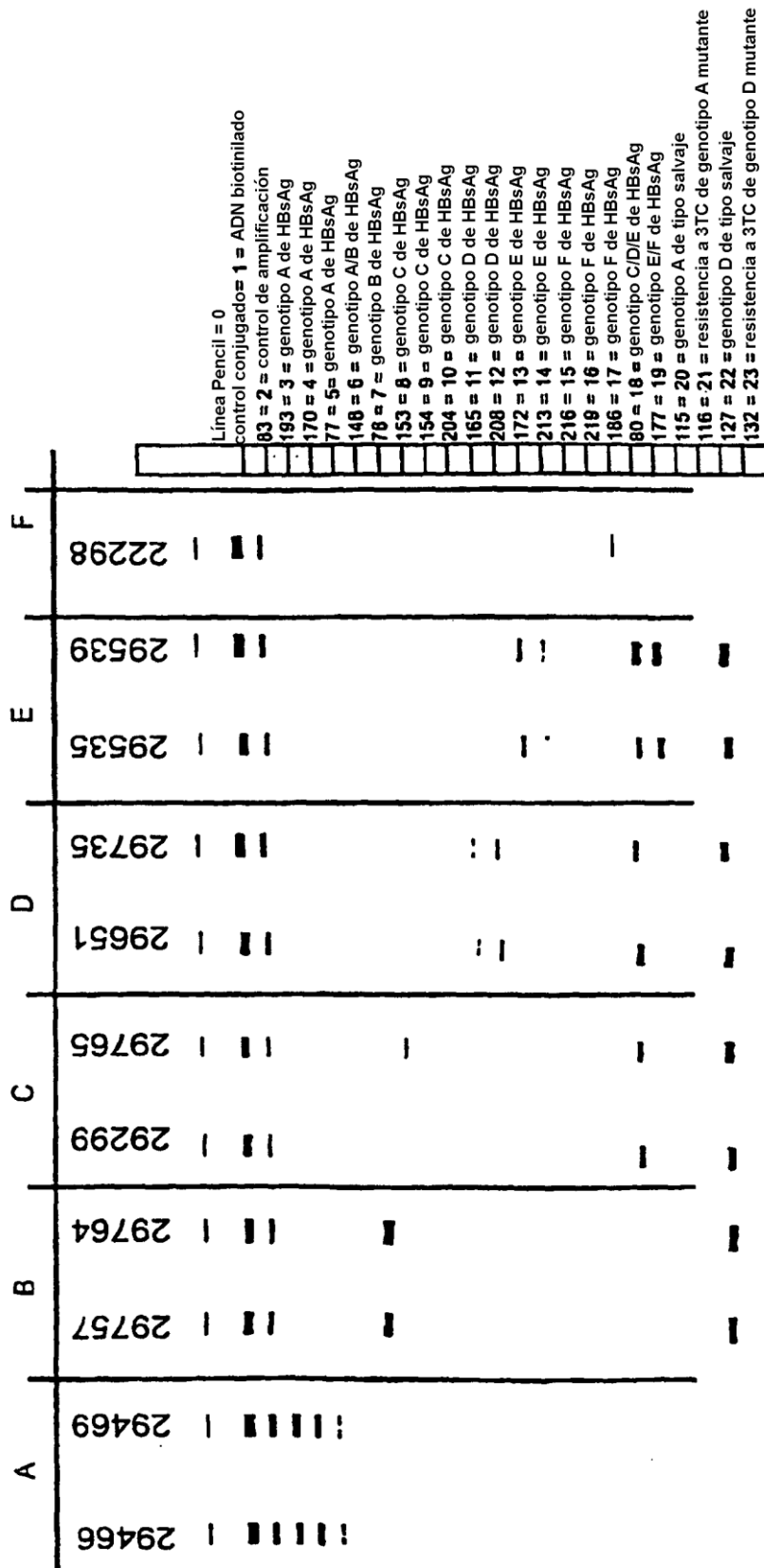


Fig. 5

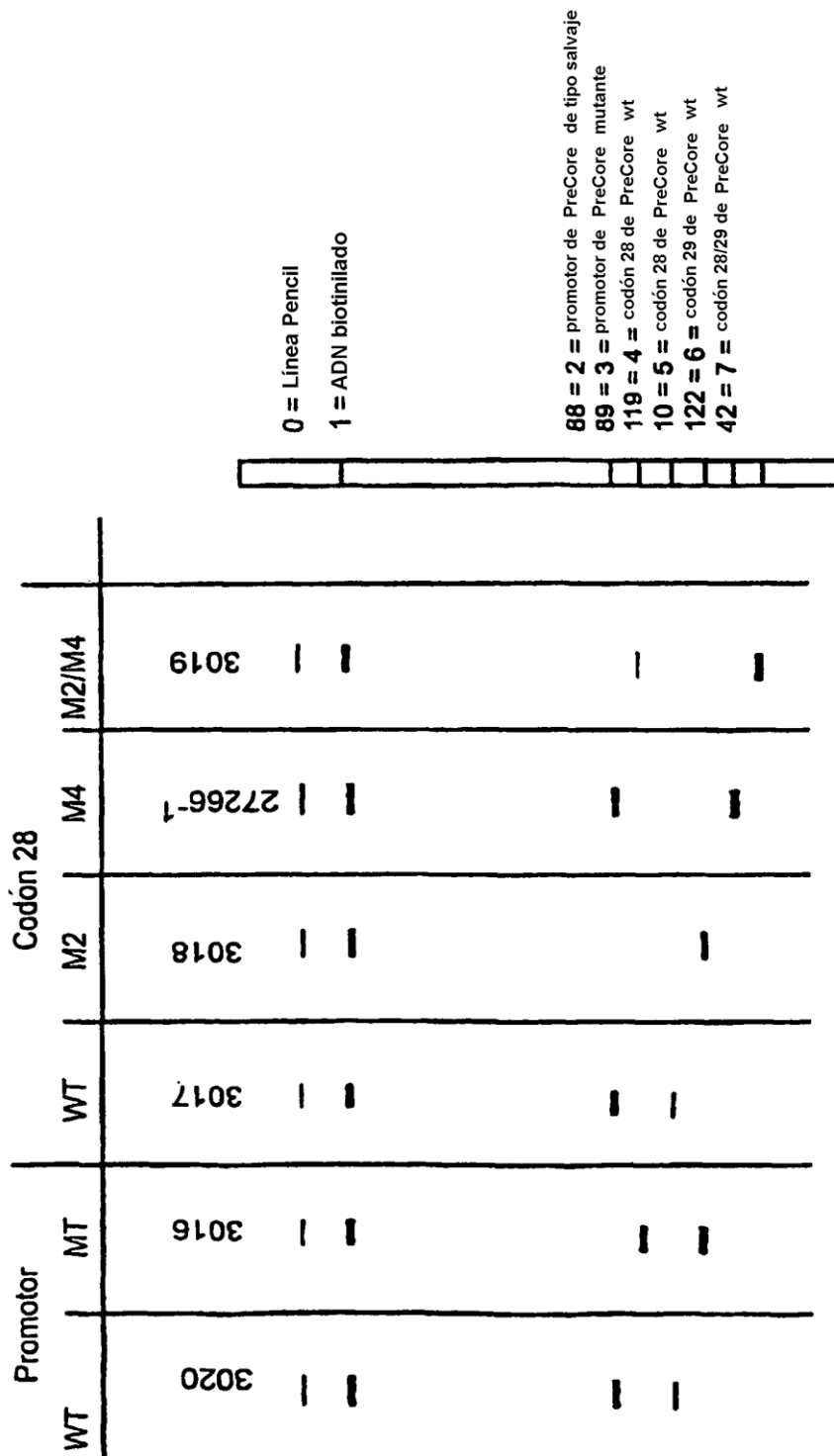


Fig. 6

Paciente infectado con HBV tratado
con lamivudina

Fig. 7

