

Marcadores virológicos en la infección por VHB

F. Rodríguez-Frías y R. Jardí

Servicio de Bioquímica. Unidad de Proteínas Hepatitis. Hospital Universitario Vall d'Hebron. Barcelona. España.

INTRODUCCIÓN

El virus de la hepatitis B (VHB) pertenece a la familia de los hepadnavirus, cuyo genoma está formado por una pequeña molécula de ADN (3.200 pares de bases). Este genoma consta de 4 regiones codificantes de proteínas (ORF) fuertemente solapadas (fig. 1): ORF preS/S, correspondiente a las proteínas de la envuelta que constituyen el antígeno de superficie del VHB (HBsAg); ORF preC/C, que codifica el componente de la cápsida viral (antígeno *core* o HBcAg) y una proteína no estructural que tras su modificación posttraduccional es secretada y constituye el denominado antígeno «e» (HBeAg); ORF P, que codifica la polimerasa viral (poliproteína con actividad ADN polimerasa, transcriptasa reversa y ARNasa) y la ORF X, que codifica una proteína cuya función concreta aún no se conoce¹ (posible función transactivadora involucrada en carcinogénesis). El genoma del VHB presenta una tasa de mutación de $1,4\text{--}3,2 \times 10^{-5}$ sustituciones/nucleótido/año, 100 veces mayor que otros virus ADN², debida a la falta de mecanismos de reparación de errores en la etapa de transcripción inversa del ciclo replicativo viral. Como consecuencia de esta variabilidad el virus circula como una mezcla compleja de variantes genéticas, constituyendo una cuasiespecie, que evoluciona a lo largo de la infección dependiendo de la presión evolutiva de factores como la respuesta inmune y los tratamientos antivirales. De esta manera las variantes mutadas (MT) del VHB son seleccionadas por su mayor capacidad de supervivencia en un ambiente de presión selectiva que las variantes no mutadas (WT). Sobre la base de esta variabilidad el VHB se ha clasificado en 8 genotipos (A-H) definidos por una diferencia mayor del 8% en las secuencias del genoma viral completo^{3,4}, estos genotipos presentan una distribución geográfica característica y parecen tener diferentes propiedades biológicas que afectan al

curso de la enfermedad^{5,6} así como a la respuesta a tratamientos antivirales^{4,7-9}.

Además de los genotipos, se han descrito tres grupos de variantes genéticas que se observan con una frecuencia significativa en muestras de pacientes y son de especial interés en el curso de la infección por el VHB⁸:

- Variantes de la envuelta viral, gen S, con cambios en el determinante «a» del HBsAg (epítopo inmunodominante), que escapan a la vacunación y a la acción protectiva de la terapia con inmunoglobulinas específicas, HBIG.
- Variantes de la polimerasa viral, gen P, que son resistentes a tratamientos con inhibidores de dicho enzima (análogos de nucleótidos/nucleósidos).
- Variantes de la región *precore-core* (preC-C) que impiden o disminuyen la expresión del HBeAg.

Estas variantes, conjuntamente con el genotipo viral, constituyen potenciales marcadores virológicos de la infección por VHB.

La infección por VHB puede presentarse de formas muy diversas y la correcta clasificación de la misma resulta de gran interés para su monitorización y abordaje terapéutico¹⁰. Desde el descubrimiento del antígeno Australia por Blumberg y Alter, en 1965, hasta la actualidad se ha desarrollado una amplia batería de ensayos serológicos de alta sensibilidad y especificidad para la detección de los antígenos virales y sus respectivos anticuerpos. A estos ensayos se han sumado más recientemente métodos de detección y cuantificación del genoma del VHB (ADN-VHB). Estos marcadores virológicos se aplican a la clasificación y seguimiento de la infección por VHB y se pueden clasificar en:

- Moléculas proteicas: codificadas directamente por el VHB, antígenos virales, (HBsAg y HBeAg), o producidas por el huésped, anticuerpos frente a estos antígenos, antiHBs (frente al HBsAg), antiHBc total o de tipo IgM (frente al HBcAg), y antiHBe (frente al HBeAg). Los antígenos virales y los anticuerpos se detectan mediante enzimoinmunoensayos habitualmente automatizados, que en la actualidad en su mayoría son luminiscentes de alta sensibilidad y especificidad.

Correspondencia: Dr. F. Rodríguez-Frías.
Servicio de Bioquímica. Unidad de Proteínas Hepatitis.
Hospital Universitario Vall d'Hebron. P.º Vall d'Hebron, 119-129.
08035 Barcelona. España.
Correo electrónico: frarodri@vhebron.net

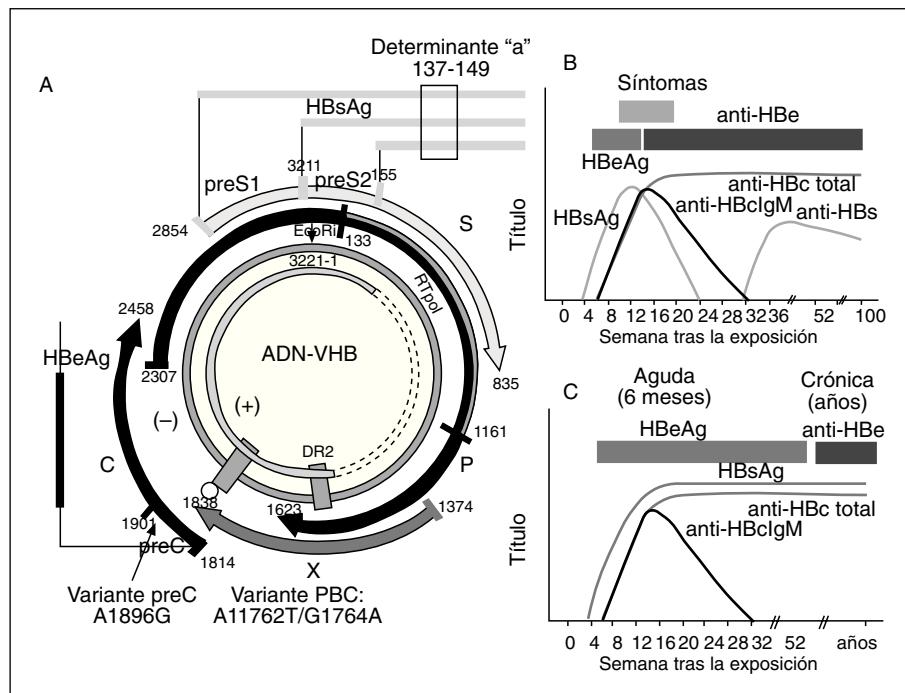


Fig. 1. (A) Esquema del genoma del VHB, indicando las diferentes regiones codificantes S, P, X y C. Superpuesto en la región P se indica el fragmento correspondiente a la polimerasa viral (Rt-pol). Junto a las regiones S y C se esquematizan las proteínas HBsAg y HBe. Ejemplo de perfiles de marcadores serológicos en la infección por VHB (modificado de la web del CDC: <http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/slideset>): (B) infección aguda por VHB autolimitada. (C) Infección crónica, con seroconversión antiHBe.

– Ácido nucleico viral (ADN-VHB): detección, cuantificación (carga viral) y caracterización del ADN (genotipos virales y variantes de genes P y preC-C), y la detección y cuantificación en tejido hepático del ADN circular covalentemente cerrado (cccADN), intermediario principal del ciclo replicativo viral intra hepatocito^{11,12}.

ANTÍGENOS Y ANTICUERPOS

HBsAg

El HBsAg es el marcador de laboratorio más importante en el diagnóstico de la hepatitis B de la infección aguda y crónica por VHB, siendo habitualmente detectable a las 6-10 semanas de la exposición al virus. El HBsAg está formado por las proteínas de la envuelta viral codificadas por el gen S, las cuales también se encuentran como partículas no infecciosas, formadas por el exceso de síntesis de los productos del gen S¹. La detección en suero se efectúa mediante enzimoinmunoensayos que utilizan anticuerpos frente al determinante «a» del HBsAg de elevada especificidad (99,5%) y sensibilidad (< 0,15 ng/ml), lo que ha permitido disminuir sensiblemente el período ventana de la infección. Estos ensayos también pueden detectar formas mutantes de la región S, aunque con efectividad variable¹³ (categoría II). La presencia del HBsAg es un signo de producción de la envuelta viral, pero no constituye un marcador de replicación viral al ser positivo en todos los portadores crónicos de la infección independientemente de la actividad de la misma. La determinación cuantitativa del HBsAg puede ser útil en el seguimiento de tratamientos antivirales ya que los cambios observados en los niveles intra hepáticos cccADN, molde para la síntesis del ARNm

del HBsAg, correlacionan con una reducción similar en el título del HBsAg en suero¹¹ (categoría II). Un resultado negativo no excluye una infección activa por VHB, ya que un HBsAg negativo con niveles detectables de ADN-VHB puede observarse en ciertas situaciones como: el período ventana al final del período de incubación o al final de la convalecencia de una infección aguda, en la resolución de una infección crónica y en casos de aclaramiento del HBsAg tras tratamiento antiviral. Un caso ilustrativo de esta última situación ha sido descrito en un estudio muy reciente de pacientes con infección crónica por VHB tratados con interferón α -2b pegilado (PEG-IFN) en el que el 40% de los casos que negativizaron el HBsAg presentaban niveles detectables de ADN-VHB por PCR¹⁴ (categoría III). La presencia de mutaciones en el HBsAg (principalmente la G145R del determinante «a») se asocia en algunos casos con infección por VHB que escapa a la detección por algunos reactivos comerciales, o presenta perfiles serológicos anómalos¹⁵ (categoría B). En regiones endémicas para la infección por VHB, se ha observado una prevalencia importante de estas formas mutadas, por ejemplo en el 23% en niños vacunados para VHB en Taiwán¹⁶. Entre los casos con HBsAg negativo y antiHBc positivo del 0,5 al 1% presentan positividad para el ADN-VHB a niveles bajos, y constituyen una forma de infección «oculta» por VHB¹⁷ (categoría B).

HBeAg y antiHBe

El antígeno HBeAg está formado por una proteína no estructural que resulta de la modificación posttraduccional del producto peptídico codificado por la región core completa¹ (proteína preC). Este antígeno es, por lo tanto, pro-

ducido en hepatocitos durante la replicación viral y por este motivo su presencia puede ser indicativa de replicación viral activa. La pérdida del HBeAg con la concomitante aparición de antiHBe usualmente se asocia con la remisión bioquímica e histológica y una significativa supresión de la replicación viral. Sin embargo, existe una importante prevalencia de pacientes HBeAg negativos¹⁸, que en su mayoría presentan ALT normal y ADN-VHB indetectable por técnicas de hibridación, pero que mediante técnicas de PCR son ADN-VHB positivo. En estos casos la secuenciación del genoma del VHB ha permitido detectar la existencia de variantes del VHB que impiden o disminuyen la expresión del HBeAg. Las principales variantes que impiden la expresión del HBeAg se detectan en la región preC: creación de una señal *stop* (principalmente G1896A, codon 28) y en menor proporción, la destrucción del codón de iniciación (posiciones 1814-1816). Estas formas son muy comunes en el área mediterránea y están relacionadas con el genotipo viral, preferentemente con el genotipo D, muy prevalente en esta área^{19,20}. Las variantes que disminuyen la expresión del HBeAg presentan en su mayoría cambios en la región del promotor básico del *precore*, PBC (principalmente A1762T y G1764A). Por estos motivos no se puede considerar al HBeAg estrictamente como un marcador de replicación viral, ya que su negatividad no se relaciona con la ausencia de replicación. La presencia de mutaciones se ha relacionado con la respuesta al tratamiento de la hepatitis crónica²¹⁻²³ (categoría III). La terapia antiviral conlleva una intensa disminución de los niveles de ADN-VHB (ej.: inhibidores de la polimerasa viral) y, sin embargo, se observa una proporción inferior de pacientes que pierden el HBeAg; esta aparente discrepancia podría explicarse con la hipótesis de que el HBeAg sea un marcador del número de células infectadas más que de la actividad replicativa viral²⁴ (categoría IV). La probabilidad de aclaramiento del HBeAg está en relación con el tipo de tratamiento antiviral aplicado^{24,25} siendo superior en el tratamiento con IFN que en la terapia con análogos de nucleótidos/nucleósidos (categoría A). La seroconversión del HBeAg a su anticuerpo antiHBe puede ser un marcador real del cambio en el estado del sistema inmune, aunque también debida a un menor enmascaramiento de la respuesta antiHBe por el HBeAg²⁴ (categoría IV). El estudio de las mutaciones de la región pre-C se puede efectuar por varias técnicas: secuenciación directa de productos amplificados por PCR correspondientes a la región preC-C o mediante hibridación inversa con sondas específicas fijadas a tiras de papel (LIPA) (INNOLIPA HBV PreCore, Innogenetics). Esta última técnica está comercializada pero tan sólo permite detectar las mutaciones principales (G1896A, A1762T y G1764A), mientras que la secuenciación permite detectar todas las posibles variantes de esta región preC-C²⁰ (categoría A).

AntiHBC e IgM antiHBC

Estos anticuerpos están dirigidos contra epítopos del antígeno *core* de VHB, que constituye el producto peptídico

del gen C y forma la cápsida viral, detectándose en tejido hepático. Los anticuerpos antiHBC aparecen muy precozmente durante la infección y son detectables de por vida cualquiera que sea el curso de la infección. La especificidad del ensayo para este marcador es muy elevada (99,9%). El anticuerpo antiHBC puede detectarse en presencia o ausencia de HBsAg o antiHBs, durante el período de recuperación de una infección aguda por VHB antes de la aparición de antiHBs, o en pacientes que resuelven la infección pero no muestran niveles detectables de antiHBs. Por este motivo, su detección es indicativa de contacto previo o actual con VHB. La detección aislada o en combinación con el HBsAg es necesaria en el cribaje de la infección por VHB, en el estudio previo a la vacunación frente a este virus (categoría A). La detección junto a títulos altos de antiHBs puede indicar inmunidad frente al VHB, particularmente con niveles indetectables de ADN viral (categoría A). La positividad aislada de antiHBC puede ser el único marcador de portador crónico infeccioso del VHB. Se trata de un hallazgo relativamente frecuente con prevalencia variable en función de la población estudiada²⁵, en estos casos se observa en una proporción significativa de pacientes positivos el ADN-VHB¹³ (categoría III). Los antiHBC de tipo IgM se utilizan para el diagnóstico de infección aguda por VHB siendo detectables aproximadamente hasta 6 meses después de la infección. También se detectan en reactivaciones de infecciones crónicas²⁵, aunque con niveles inferiores (10 a 500 PEIU/ml) a los procesos agudos (superior a 500 PEIU/ml), por este motivo la detección de niveles moderados de IgM antiHBC puede ser indicativa de actividad viral en casos de perfiles serológicos anómalos como la detección aislada de antiHBC¹³ (categoría II).

AntiHBs

Un título de este anticuerpo mayor o igual a 10 mUI/ml se asocia con inmunidad frente al VHB, con un valor predictivo del 97,6%¹⁷ (categoría A). La detección aislada de este anticuerpo es sugestiva de inmunidad adquirida por vacunación mientras que su detección conjuntamente con antiHBC es indicativa de inmunidad natural tras la resolución de la infección (categoría A), una proporción importante de individuos con infección pasada por VHB presentan títulos inferiores a 100 mUI/ml²⁵. Sin embargo, en algunos casos se puede detectar la positividad aislada para antiHBC por la pérdida progresiva de los anticuerpos antiHBs o bien por falsos negativos de los ensayos utilizados en la determinación de estos anticuerpos, ya que las técnicas comerciales para su determinación presentan una importante variabilidad a títulos bajos (entre 10-100 mUI/ml) (categoría B).

ADN-VHB

La cuantificación del ADN-VHB en sangre periférica es la técnica de referencia para monitorizar la actividad re-

plicativa del VHB, siendo la determinación más útil para el seguimiento de los pacientes con hepatitis crónica. Se ha observado una buena correlación entre los niveles de ADN-VHB y los marcadores serológicos y bioquímicos de actividad de la enfermedad hepática²⁶ (categoría I). El ADN-VHB es el marcador más precoz de la infección, detectándose a los pocos días de su inicio, con un pico en la fase aguda y descendiendo al resolverse la infección. Se mantiene detectable en pacientes que progresan a infección crónica, con niveles que dependen de la fase de la enfermedad¹⁰ (categoría A): altos durante la fase de inmunotolerancia, generalmente más bajos y a menudo fluctuantes durante la inmuno-eliminación. En las fases de latencia los niveles pueden ser indetectables, aunque este hecho depende de la sensibilidad del ensayo utilizado. En las fases de reactivación generalmente se observan niveles elevados, reflejo del incremento de la actividad viral. En todas las fases de la hepatitis crónica por VHB, el ADN-VHB y cccADN se detectan en tejido hepático²⁷ (categoría A). Las técnicas de detección y cuantificación son muy heterogéneas y la falta de estándares internacionales ha hecho que los resultados obtenidos con las mismas resulten difíciles de comparar. En la actualidad se dispone de un estándar internacional de la Organización Mundial de la Salud (valor arbitrario 10⁶ UI/ml) que permite valorar todos los ensayos actuales en estas unidades (equivalencia 1 UI = 5,7 copias). En esta determinación se debe utilizar la escala logarítmica en lugar de la lineal¹⁷ (categoría A). Las técnicas actuales (tabla 1) se basan principalmente en dos metodologías: amplificación de la señal de detección tras la hibridación directa del ADN viral y la amplificación del ácido nucleico viral mediante PCR, que en la actualidad se puede llevar a cabo mediante detección a tiempo real con sondas fluorescentes (PCR a tiempo real). El rango dinámico de los ensayos varía considerablemente y ninguno de ellos parece cubrir la totalidad del rango de valores observados en los diferentes estadios de la infección, no obstante, los ensayos basados en la PCR a tiempo real son los de rango dinámico más amplio y permiten la mejor valoración de la replicación viral¹⁷ (categoría A). Estos métodos permiten la amplificación y cuantificación del ADN viral de forma simultánea, disminuyendo significativamente las etapas de manipulación, disminuyendo el riesgo de falsos resultados (categoría B). La gran sensibilidad de estos métodos permite detectar las infecciones ocultas por VHB que presentan usualmente niveles de ADN-VHB < 500 UI/ml (3 x 10³ copias/ml)¹⁵ (categoría B). En la práctica diferencias en los resultados obtenidos inferior a 0,5 logaritmos₁₀ (un factor de 3) no son valorables, y pueden ser intrínsecas a la variabilidad intra-paciente, de hecho en infecciones crónicas por el VHB sin tratamiento antiviral monitorizadas durante un año se pueden observar cambios de 1 a 1,5 logaritmos en los niveles de ADN-VHB que correlacionan con elevaciones de ALT y pérdida del HBeAg²⁴ (categoría B). Este comportamiento oscilatorio podría explicarse por la evolución del VHB para escapar de los efectos de la respuesta inmune (categoría IV). El nivel de 10⁵ copias/ml, límite habitual de detección de las técnicas

TABLA 1. **Métodos comerciales para la detección cuantitativa del ADN-VHB**

| | Proveedor | Principio medida | Procedimiento | Nivel inferior de detección | Linealidad | Genotipos detectados |
|------------------------------|-------------------|--|----------------|-------------------------------|---|---------------------------------|
| HBV Digene Hybrid Capture I | Digen Diagnostics | Hibridación | Manual | 7 x 10 ⁵ copias/ml | 7 x 10 ⁵ -6 x 10 ⁸ copias/ml | A-D |
| HBV Digene Hybrid Capture I | Digen Diagnostics | Hibridación y amplificación de señal | Manual | 1,2 x 10 ⁵ UI/ml | 1,2 x 10 ⁵ -1,2 x 10 ⁸ UI/ml | A-D |
| HBV Digene Hybrid Capture II | Digen Diagnostics | Hibridación y amplificación de señal tras centrifugación | Manual | 1,8 x 10 ⁴ UI/ml | 5 x 10 ³ -6 x 10 ⁷ copias/ml | A-D |
| VERSANT HBV DNA 1.0 | Bayer Diagnostics | Hibridación con amplificación de señal, bADN | Semiautomático | 9 x 10 ² UI/ml | 9 x 10 ² -3,7 x 10 ⁶ UI/ml | ? |
| VERSANT HBV DNA 3.0 | Bayer Diagnostics | Hibridación con amplificación de señal, bADN | Semiautomático | 7 x 10 ⁵ copias/ml | 7 x 10 ⁵ -5 x 10 ⁹ copias/ml | ? |
| Amplicor HBV Monitor | Roche Diagnostics | PCR | Automático | 1,2 x 10 ⁵ UI/ml | 1,2 x 10 ⁵ -9 x 10 ⁸ UI/ml | ? |
| COBAS Amplicor HBV Monitor | Roche Diagnostics | PCR | Automático | 2 x 10 ³ copias/ml | 2 x 10 ³ -1 x 10 ⁸ copias/ml | A-F |
| TaqMan | Roche Diagnostics | PCR (tiempo real) | Automático | 3,5 x 10 ² UI/ml | 3,5 x 10 ² -1,8 x 10 ⁷ UI/ml | ? |
| RealArt HBV PCR | Artus | PCR (tiempo real) | Automático | 5 x 10 ¹ copias/ml | 1 x 10 ¹ -1 x 10 ¹⁰ copias/ml | A-G (genotipo F infardetectado) |
| | | | | | 8,8 UI/ml | A-G (*) |
| | | | | | 1 x 10 ² -6 x 10 ¹⁰ copias/ml | |
| | | | | | 2 x 10 ¹ -1 x 10 ⁹ UI/ml (*) | |

Se ha utilizado un factor de conversión de 1 UI/ml = 5,7 copias/ml (adaptada de 17, 25,27). (*) información del proveedor. HBV: virus de la hepatitis B.

que no emplean la PCR, se ha utilizado de forma arbitraria para diferenciar los diferentes estadios de la infección por VHB, y monitorizar pacientes con hepatitis crónica^{28,10}. No obstante, pueden observarse casos de enfermedad hepática avanzada con niveles de ADN viral $< 10^5$ copias/ml (categoría A). En este sentido niveles de 3-5 x 10^4 se han sugerido para distinguir entre casos de hepatitis crónica y portadores inactivos, con especificidad y sensibilidad del orden del 90%^{29,30} (categoría III). En un estudio con población asiática³¹ el 89% de los pacientes HBeAg positivos mostraban niveles de ADN-VHB persistentemente $> 10^5$ copias/ml, pero un 51% de los casos que perdían el HBeAg mantenían niveles $> 10^5$ copias/ml. Según este estudio un valor de 10^5 copias/ml excluiría la totalidad de los portadores inactivos, pero en hepatitis crónicas HBeAg negativo un 45% de casos también se excluirían si se efectúa una única determinación y un 30% si se efectúan 3 determinaciones (categoría II). Esta situación debida al perfil fluctuante característico de estos casos ilustra la gran dificultad en establecer un umbral de diferenciación entre actividad y no actividad en la infección HBeAg negativa. De hecho aun en la actualidad no existe un consenso internacional sobre el nivel de ADN-VHB por debajo del cual se puede considerar la enfermedad como inactiva^{27,31,32}, y son necesarios más estudios para establecer este nivel de decisión con evidencia suficiente. No obstante, la Asociación Americana para el Estudio de Enfermedades Hepáticas (AASLD) recomienda un valor mayor o igual a 10^5 copias/ml como umbral razonable para determinar candidatos al tratamiento antiviral²⁸. En este sentido las conferencias de consenso europeas (Asociación Europea para el Estudio del Hígado, EASL) asumen esta recomendación, aunque reconocen la insuficiencia de datos clínicos para valorar el significado clínico completo de los niveles de ADN-VHB^{32,33}. Teniendo en cuenta el perfil fluctuante de los niveles de ADN-VHB y que se observa frecuentemente, sobre todo en la hepatitis crónica HBeAg negativa³⁴, el estudio de los niveles de ADN viral para la valoración de la situación clínica o la infectividad debe basarse en determinaciones seriadas^{25,31} (categoría A).

Durante la infección crónica se acumula cccADN, en los núcleos de los hepatocitos, donde persiste como una forma episómica estable que actúa como molde en la transcripción de los genes del VHB. Se cree que este cccADN es responsable de la infección persistente de los hepatocitos, permaneciendo a lo largo de la historia natural de la infección incluso en pacientes con evidencias serológicas de aclaramiento viral¹² (categoría I). Considerando la larga vida media de los hepatocitos, el factor limitante de la eliminación parece ser precisamente el aclaramiento de los reservorios de cccADN de las células infectadas¹¹ (categoría I). Este intermediario tiene una vida media muy larga y persiste a pesar de reducciones importantes en el ADN-VHB sérico, como la provocada por un tratamiento antiviral^{11,35}, y parece ser el responsable de la replicación viral tras cesar el tratamiento^{35,36}. Estos datos indican el posible interés de la monitorización del cccADN en tejido hepático. Sin embargo, la reducción de niveles de cc-

ADN correlaciona con una reducción similar del HBsAg sugiriendo el interés de monitorizar los niveles séricos de HBsAg como alternativa a la determinación del cccADN en tejido hepático³⁵ (categoría B).

USO PRÁCTICO DE LA CUANTIFICACIÓN DEL ADN-VHB

- 1) La cuantificación del ADN-VHB no es necesaria para el diagnóstico de hepatitis aguda, que se basa únicamente en métodos serológicos. En cuanto a la infección crónica, la detección o cuantificación del ADN viral es necesaria para establecer si hay o no replicación del VHB. En los casos HBeAg negativos la interpretación de los niveles de ADN-VHB resulta difícil, puesto que, aunque los portadores inactivos parecen presentar niveles inferiores que las infecciones crónicas²⁹⁻³¹, los niveles de discriminación entre infección activa e inactiva están aún por establecer. Por esta razón la decisión de tratar una hepatitis crónica por VHB, que tiene en cuenta los niveles de ADN-VHB, resulta fácil en presencia de HBeAg, pero es más complicada en pacientes negativos para este antígeno.
- 2) En cuanto a la valoración de la severidad y el pronóstico, la presencia de ADN-VHB se asocia con un riesgo significativo de progresión de la infección crónica a cirrosis y carcinoma hepatocelular. Este riesgo es bajo en ausencia de niveles detectables de ADN-VHB, excepto en casos de pacientes con cirrosis, que pueden evolucionar a carcinoma hepatocelular en ausencia de replicación aparente.
- 3) En cuanto a la decisión de la terapia óptima, hay que tener en cuenta que los pacientes con niveles bajos de ADN viral parecen tener una mayor proporción de respuesta sostenida al IFN. Mientras que con niveles altos podrían ser candidatos al tratamiento con análogos de nucleósidos/nucleótidos.
- 4) Una vez instaurado el tratamiento antiviral, la cuantificación del ADN-VHB, junto a los niveles de ALT y el sistema HBeAg/antiHBe, resulta esencial en la monitorización del tratamiento, de forma que los pacientes no respondedores muestran cambios muy pequeños o incluso nulos en los niveles de ADN-VHB. En el caso de pacientes respondedores, estos niveles se reducen significativamente, aunque tampoco existe ningún acuerdo sobre el valor umbral por debajo del cual se puede asegurar una respuesta virológica sostenida.

ENSAYOS DE RESISTENCIA A TRATAMIENTOS ANTIVIRALES DEL VHB

El descubrimiento y utilización clínica de agentes antivirales que actúan sobre la polimerasa viral ha revolucionado el tratamiento de los pacientes infectados crónicamente por el VHB. Sin embargo, el beneficio clínico de estas terapias está comprometido por la emergencia de variantes virales resistentes con mutaciones específicas en el gen de la polimerasa (categoría A). La resistencia a tratamientos antivirales puede ser considerada a varios niveles y es importante especificar exactamente el significado de

TABLA 2. Principales variantes del VHB, asociadas a resistencia a tratamientos con análogos de nucleósidos/nucleótidos: lamivudina (LAM), adefovir-dipivoxil (ADV), entecavir (ETV), TEL (telbivudina), FAM (famciclovir), ND (no determinado)

| Tratamiento | Retrotranscriptasa VHB: dominios catalíticos y sus posiciones de aminoácidos | | | | | Período de tratamiento (% resistencias) | | | |
|-------------|--|----------------|---------|---------|---------|---|--------|--------|--------|
| | A | B | C | D | E | 1 año | 2 años | 3 años | 4 años |
| | 75/89 | 159/182 | 200/210 | 230/243 | 246/253 | | | | |
| LAM | L80I | L180M V173L | M204V/I | | | 24% | 41% | 53% | 70% |
| ADV | | A181V | | N236T | | 0% | 3% | 6% | 15-18% |
| ETV | | T184G I169T | S202I | | M250V | ND | ND | ND | ND |
| TEL | | | M204I | | | ND | ND | ND | ND |
| FAM | | L180M | | | | ND | ND | ND | ND |

Adaptado de 8 y 37. Nomenclatura de los diferentes dominios y variantes respecto a los aminoácidos de retrotranscriptasa (1 corresponde al 349 de la polimerasa completa y 344 corresponde al 692 de la polimerasa completa).

TABLA 3. Genotipos del VHB: distribución en diferentes poblaciones de pacientes, y frecuencia de mutaciones de la región precore y promotor básico del core (PBC)

| País | N | Método | Genotipo (%) | | | | | | | |
|--|-------|---------------|--------------|------|-----|-----|-------------------|----|-----|----|
| | | | A | B | C | D | E | F | G | H |
| Estados Unidos | 320 | ELISA | 34 | 7 | 14 | 20 | 1 | 1 | ND | ND |
| Estados Unidos | 531 | LIPA | 34 | 22 | 31 | 10 | 3 (conjuntamente) | 0 | ND | ND |
| España ⁶ (6% no tipables) | 258 | RFLP | 51 | ND | ND | 36 | ND | 7 | ND | ND |
| España ³⁹ (7% genotipos mixtos) | 486 | RFLP | 40 | 0,4 | 0,2 | 48 | 0,2 | 4 | ND | ND |
| Francia (20% genotipos mixtos) | 190 | LIPA | | | | | | | | |
| Sudáfrica | 29 | Secuenciación | 24 | 4 | 11 | 29 | 10 | 1 | 3 | 0 |
| India (6% genotipos mixtos) | 130 | RFLP | 46 | 0 | 0 | 48 | 0 | 0 | ND | ND |
| China | 142 | RFLP | 4,2 | 14,1 | 79 | 1,4 | 0 | 0 | ND | ND |
| Taiwán | 272 | RFLP | 0 | 68 | 32 | 0 | 0 | 0 | ND | ND |
| Japón (1% no tipable) | 1.077 | ELISA | 2 | 9 | 88 | 0,2 | 0,2 | ND | ND | ND |
| Tailandia | 107 | RFLP | 0 | 25 | 72 | 2,8 | 0 | 0 | ND | ND |
| Hong Kong | 332 | LIPA | 0,7 | 45 | 54 | 0,7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Frecuencia de mutaciones del gen preC-C ⁴ (%) | | | | | | | | | | |
| Precore: G1896A | | | 6,5 | 50 | 50 | 43 | 27 | ND | 100 | ND |
| BCP: 1762/1764 | | | 45 | 16 | 58 | 12 | 7 | ND | ND | ND |

Modificada de Wai et al⁷ con datos de 4, 6 y 39.

este concepto. La resistencia fenotípica se refiere a la pérdida de supresión de la replicación viral a pesar de continuar la administración del tratamiento, y se demuestra por un incremento de la actividad viral igual o superior a 1 logaritmo en los niveles de ADN-VHB a partir del valor más bajo obtenido durante la terapia («nadir»). Las cepas virales resistentes son aquellas que tienen mutaciones que confieren la resistencia fenotípica a un tratamiento determinado. Para su detección se han desarrollado ensayos genotípicos que identifican una o varias de las mutaciones en la polimerasa viral que le confieren poca o nula sensibilidad al tratamiento³⁷ (tabla 2). En general en muestras preterapéuticas estas mutaciones no son detectables en la población mayoritaria, aunque pueden estar presentes en poblaciones residuales. Sin embargo, estas formas serán las predominantes en la cuasiespecie tras las reactivaciones virales, al ser seleccionadas por la presión evolutiva del fármaco al que no son sensibles, y disminuir intensamente la población mayoritaria, que sí es sensible al fármaco. La mayor parte de los datos de emergencia de resistencia a tratamientos antivirales provienen de los estudios efectuados con lamivudina, no obstante, aunque con menor frecuencia y variantes diferentes, este fenómeno

no está relacionado con otros tratamientos con análogos de nucleótidos/nucleósidos³⁷ (adefovir-dipivoxil, entecavir, etc.; tabla 3) (categoría A). La más común de estas variantes es la que está asociada a la resistencia al tratamiento con lamivudina, que presenta la sustitución rtM204I o rtM204V. Esta variante está situada en el motivo YMDD (tirosina, metionina, aspártico, aspártico) del dominio C de la polimerasa viral y se acompaña frecuentemente de otras mutaciones compensatorias (principalmente rt180M y/o rtV173L) que restauran la capacidad replicativa del VHB mutado³⁷ (categoría B). Las cepas virales resistentes a lamivudina son sensibles al adefovir-dipivoxil y viceversa, las cepas resistentes al adefovir (mutaciones rtN236T y rtA181V) son sensibles a la lamivudina. Este hecho permite el rescate de pacientes resistentes a una u otra terapia (categoría A). El entecavir presenta actividad sobre las variantes resistentes a lamivudina. Hasta la actualidad únicamente se han observado cepas resistentes a este fármaco con mutaciones propias (rtI169T, rtT184S, rtS202I, rtM250V) acompañadas de mutaciones resistentes a la lamivudina³⁷. Los ensayos genotípicos incluyen básicamente dos tipos de tecnologías: la secuenciación directa de productos de

amplificación de la región catalítica de la retrotranscriptasa viral (gen *P*), que permite identificar todas las mutaciones con resistencias a estos tratamientos; o las técnicas de hibridación inversa sobre tiras de papel (LIPA), donde tan sólo se pueden determinar las mutaciones cuyas sondas han sido fijadas a las tiras. En la actualidad se dispone de dos ensayos comerciales: TRUGENETTM (Bayer), basado en secuenciación directa, e INNO-LIPA HBV DR (Innogenetics) basado en hibridación inversa. Si bien la técnica de hibridación inversa parece ser más sensible para detectar subpoblaciones virales³⁸ (categoría B), la secuenciación permite detectar nuevas mutaciones asociadas a nuevos tratamientos, hecho que, dada la rápida aparición de éstos, representa una importante ventaja sobre la de hibridación (categoría A). Esta última técnica requiere una modificación frecuente para adaptarse a las nuevas variantes detectadas, la versión actualmente disponible permite detectar las variantes asociadas a los tratamientos con lamivudina y adefovir.

GENOTIPOS DEL VHB

Los genotipos del VHB presentan una distribución étnica y geográfica característica (tabla 3). Los genotipos A y D son mayoritarios en Europa y poblaciones de este origen (A en el norte de Europa y el D en la zona mediterránea). En la población española los genotipos A y D representan conjuntamente en torno al 90% de los casos estudiados y se encuentran en proporciones muy análogas^{6,39}, seguidos del genotipo F, que es frecuente en poblaciones de Sudamérica. Los genotipos B y C parecen ser endémicos de poblaciones asiáticas. Aunque no se dispone de suficientes datos epidemiológicos, el genotipo E se detecta en África oriental, el genotipo G en Europa y Estados Unidos y el genotipo H en América Central y del Sur⁷.

La determinación de los genotipos virales se lleva a cabo mediante el análisis de la región solapada de los genes *S* y *P* por secuenciación directa, análisis de fragmentos de restricción (RFLP) o hibridación inversa, metodología LIPA. La técnica más adecuada es la secuenciación, pero también resulta la de mayor complejidad (categoría A). Las técnicas de análisis de fragmento de restricción se han aplicado en muchos estudios epidemiológicos (tabla 3), pero no permiten detectar la totalidad de los genotipos. En la actualidad se halla comercializada una técnica LIPA (INNO-LIPA HBV genotyping assay, Innogenetics,) que permite un genotipado rápido de los 8 genotipos conocidos, y puede detectar infecciones con mezclas de genotipos.

A diferencia de la infección por VHC, todavía no se dispone de datos concluyentes sobre el significado clínico de los genotipos del VHB. Sin embargo, hay una creciente evidencia de que el genotipo correlaciona con el curso clínico de la infección por VHB y la respuesta al tratamiento⁴⁰ (categoría I). Las evidencias más claras se han obtenido en estudios realizados en Asia (donde predominan los genotipos B y C) que parecen indicar que el genotipo C se asocia a una enfermedad más avanzada y una

menor probabilidad de seroconversión a antiHBe que el genotipo B^{7,41} (categoría A). En cuanto a los genotipos mayoritarios en España, el genotipo A parece asociarse a un mejor pronóstico que el D (mayores proporciones de aclaración del BSA y de remisión sostenida tras la seroconversión a antiHBe), mientras que el genotipo F parece presentar un peor pronóstico, relacionándose con una mayor proporción de muertes relacionadas con la enfermedad hepática⁶ (categoría I). En relación al tratamiento antiviral, en un estudio de Janssen et al en pacientes tratados con IFN⁹, se ha observado que la tasa de seroconversión a antiHBe es del 47% para el genotipo A, 44% para el B, 28% para el C y 25% para el D, lo que sugiere que el genotipo del VHB puede ser un importante predictor de la respuesta a la terapia con este fármaco (categoría A). En relación al tratamiento con análogos de nucleósidos o nucleótidos, el genotipo viral no parece influir ni en el desarrollo de resistencias a la lamivudina, ni en la respuesta virológica al tratamiento con adefovir-dipivoxil^{7,42} (categoría B). Sin embargo, algunos estudios puntuales han obtenido resultados que permiten mantener abierto el interés del estudio del genotipo del VHB en tratamientos con análogos de nucleótidos o nucleósidos. En este sentido un estudio realizado en Alemania ha reportado que las variantes resistentes a la lamivudina emergen más precozmente en el genotipo A que en el D, aunque sin correlación con la respuesta⁴³ (categoría III). Chien et al⁴⁴, en un estudio realizado en Asia, han sugerido que el genotipo B puede ser un factor pronóstico de respuesta en tratamiento con lamivudina (categoría III). Recientemente Fung⁵ ha observado una mayor probabilidad de aparición de resistencias al tratamiento con adefovir-dipivoxil en pacientes con resistencias a la lamivudina de genotipo D (categoría III).

APLICABILIDAD DE LOS NUEVOS MARCADORES VIROLÓGICOS COMO FACTORES PRONÓSTICO DE RESPUESTA ANTIVIRAL

Debido a que el tratamiento con IFN puede presentar efectos secundarios severos y la terapia prolongada con análogos de nucleósidos o nucleótidos (como lamivudina y adefovir) se asocia al desarrollo de resistencias, es importante decidir lo más precozmente posible si la continuación de estos tratamientos tiene una probabilidad razonable de éxito (categoría A). Uno de los dilemas en el tratamiento de la infección por VHB es que el final de éste no está claramente definido y es importante disponer de criterios objetivos para limitarlo. Los criterios convencionales³³ incluyen la normalización de los niveles de ALT (respuesta bioquímica), supresión de los niveles de ADN-VHB por debajo de las 10^5 copias/ml y la seroconversión a antiHBe en pacientes inicialmente HBeAg positivos (respuesta virológica), y negativización del HBsAg (respuesta completa) (categoría A). Existen muy pocos datos sobre posibles valores pronósticos de respuesta a los diferentes tratamientos. En la terapia con IFN se han considerado como factores pronósticos los niveles elevados

de ALT y bajos de ADN-VHB así como el genotipo viral^{9,45}. En relación con los tratamientos con inhibidores de la polimerasa viral, el genotipo viral no parece tener un interés inmediato⁴² (categoría B). En este último sentido, tan sólo algunos estudios aislados parecen avalar su aplicación. Así, en tratamiento con lamivudina, los niveles de ADN-VHB en el momento de la seroconversión, el genotipo del VHB (genotipo B) y la edad del paciente⁴⁴ (menor de 36 años) se han reportado como factores para predecir la durabilidad de la respuesta (categoría C).

Un parámetro que parece muy prometedor es la determinación de los niveles de cccADN intrahepático. Este intermediario, forma mayoritaria de ADN-VHB hepático¹², actúa en el núcleo de los hepatocitos como molde transcripcional para la producción de los ARN mensajeros de VHB. Los agentes antivirales producen un importante descenso en los niveles de viremia; sin embargo, el cccADN no es eliminado, siendo el responsable de reiniciar la infección cuando cesa el tratamiento (categoría B). En el tratamiento con lamivudina, a pesar de la reducción de todas las demás formas intra hepáticas del ADN viral, los niveles de cccADN se afectan poco, considerándose el aclaramiento de su reservorio en las células infectadas como el factor limitante en la eliminación de la infección^{45,46} (categoría B). En pacientes en tratamiento a largo plazo con adefovir dipivoxil, la concentración de cccADN es sustancialmente más baja tras la seroconversión a antiHBe y la desaparición del HBsAg¹¹ (categoría I). En un estudio con pacientes tratados con monoterapia con lamivudina o en combinación con PEG-IFN, realizado por Sung et al³⁶, se ha observado que al final del tratamiento los niveles de cccADN y ADN-VHB séricos descendían significativamente en pacientes con respuesta virológica sostenida, correlacionando mucho mejor con esta respuesta los niveles de cccADN que los de ADN-VHB sérico (categoría II). Un valor umbral de $-0,80 \log_{10}$ cccADN copias/genoma permite obtener una especificidad, sensibilidad y valores predictivos del orden del 80% en el caso de la terapia combinada, pero inferior en el caso de la monoterapia con lamivudina. El nivel de cccADN correlaciona pobremente con el nivel de ADN-VHB sérico, detectándose incluso en ausencia de éste (categoría I). Finalmente la buena correlación observada entre los cambios en los niveles intra hepáticos de cccADN y la reducción del título del HBsAg¹¹ sugiere que la determinación cuantitativa del HBsAg puede ser una alternativa práctica a la determinación del cccADN, en tejido hepático (categoría B).

Respecto a otros marcadores virológicos, como la detección de variantes de la región *precore*, existen muy pocas evidencias sobre su utilidad como factores pronóstico de respuesta a tratamientos antivirales.

- Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol and Mol Biol Rev*. 2000;64:51-68.
- Okamoto H, Imai M, Kametani M, Nakamura T, Mayumi M. Genomic heterogeneity of hepatitis B virus in a 54 year-old woman who contracted the infection through materno-fetal transmission. *Jpn J Exp Med*. 1987;57:231-236.
- Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnus LO. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol*. 2002;83:2059-73.
- Bartholomeusz A, Schaefer S. Hepatitis B virus genotypes: comparison of genotyping methods. *Rev Med Virol*. 2004;14:3-16.
- Fung SK, Chae HB, Fontana RJ, Conjeevaram H, Marrero J, Oberhelman K, et al. Virologic response and resistance to adefovir in patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol*. 2006;44:283-90.
- Sánchez-Tapias JM, Costa J, Mas A, Bruguera M, Rodes J. Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic B in western patients. *Gastroenterology*. 2002;123:1848-56.
- Wai CT, Fontana RJ. Clinical significance of hepatitis B virus genotypes, variants and mutants. *Clin Liver Dis*. 2004;8:321-52.
- Perrillo RP. Current treatment of chronic hepatitis B: benefits and limitations. *Seminars Liv Dis*. 2005;25(Suppl 2):20-8.
- Janssen HL, Van Zonneveld M, Senturk H, Zeuzem S, Akarka US, Cakaloglu Y, et al; HBV 99-01 Study Group; Rotterdam Foundation for Liver Research. Pegylated interferon alfa 2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomized trial. *Lancet*. 2005;365:123-9.
- McMahon BJ. The natural history of chronic hepatitis B virus infection. *Semin Liv Dis*. 2004;24(Suppl 1):17-21.
- Werle-Lapostolle B, Bowden S, Locarnini S, Wursthorn K, Petersen J, Lau G, et al. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. *Gastroenterology*. 2004;126:1750-8.
- Le Mire MF, Miller DS, Foster WK, Burrell CJ, Gilbert AR. Covalently closed circular DNA is the predominant form of duck hepatitis B virus DNA that persists following transient infection. *J Virol*. 2005;79:12242-52.
- Weber B, Melchior W, Gehrke R, Berger A, Rabenau HF. Hepatitis B virus (HBV) markers in isolated anti-HBc positive individuals. *J Med Virol*. 2001;64:312-9.
- Flink HJ, Van Zonneveld M, Hansen BE, De Man RA, Schalm SW, Janssen HLA; HBV 99-01 Study Group. Treatment with Peg interferon α -2b for HBeAg positive chronic hepatitis B: HBsAg loss is associated with HBV genotype. *Am J Gastroenterol*. 2006;101:297-303.
- Allain JP. Occult hepatitis B infection: implication in transfusion. *Vox Sanguinis*. 2004;86:83-91.
- Hsu HY, Chang MH, Ni YH, Chen HL. Survey of hepatitis B surface variant infection in children 15 years after a nationwide vaccination programme in Taiwan. *Gut*. 2004;53:1499-503.
- Hatzakis A, Magiorkinis E, Haida C. HBV virological assessment. *J Hepatol*. 2006;44:S71-6.
- Funk ML, Rosenberg DM, Lok ASF. World-wide epidemiology of HBeAg negative chronic hepatitis B and associated precore and core promoter variants. *J Viral Hepat*. 2002;9:52-61.
- Rodríguez-Frías F, Buti M, Jardí R, Cotrina M, Viladomiu L, Esteban R, et al. Hepatitis B virus infection: precore mutants and its relation to viral genotypes and core mutations. *Hepatology*. 1995;22:1641-7.
- Jardí R, Rodríguez F, Buti M, Costa X, Valdes A, Allende H, et al. Mutations in the basic core promoter region of hepatitis B virus relationship with precore variants and HBV genotypes in Spanish population of HBV carriers. *J Hepatol*. 2004;40: 507-14.
- Marrone A, Zampino R, Luongo G, Utili R, Karayannidis P, Ruggiero G. Low HBeAg serum levels correlate with the presence of the double A1762T/G1764A core promoter mutation and a positive response to interferon in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Intervirology*. 2003;46:222-6.
- Tacke F, Gehrcke C, Luedde T, Heim A, Manns MP, Trautwein C. Basal core promoter and precore mutations in the hepatitis B virus genome enhance replication of lamivudine-resistant mutants. *J Virol*. 2004;78:8524-35.
- Chen CH, Lee CM, Lu SN, Changchien CS, Wang JC, Wang JH, et al. Comparison of sequence changes of precore and core promoter regions in HBeAg-positive chronic hepatitis B pa-

BIBLIOGRAFÍA

- Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol and Mol Biol Rev*. 2000;64:51-68.

- tients with and without HBeAg clearance in lamivudine therapy. *J Hepatol.* 2006;44:76-82.
24. Neuman AU. Hepatitis B viral kinetics: a dynamic puzzle still to be resolved. *Hepatology.* 2005;42:249-54.
 25. Weber B. Recent developments in the diagnosis and monitoring of HBV infection and role of the genetic variability of the S gene. *Expert Rev Mol Diagn.* 2005;5:75-9.
 26. Mommeja-Marin H, Mondou E, Blum R, Rousseau F. Serum HBV DNA as a marker of efficacy during therapy for chronic HBV infection: analysis and review of the literature. *Hepatology.* 2003;37:1309-19.
 27. Pawlotsky JM. Hepatitis B virus (HBV) DNA assays (methods a practical use) and viral kinetics. *J Hepatol.* 2003;39:S31-5.
 28. Lok ASF, McMahon BJ. Chronic Hepatitis B: Update of recommendations. *Hepatology.* 2004;48:857-61.
 29. Jardí R, Rodríguez F, Buti M, Costa X, Cotrina M, Valdés A, et al. Quantitative detection of hepatitis B virus DNA in serum by a new rapid real-time fluorescence PCR assay. *J Vir Hepat.* 2001;8:465-71.
 30. Manesis EK, Papatheodoridis GV, Sevastianos V, Cholongitas E, Papaioannou C, Hadziyannis SJ. Significance of hepatitis B viremia levels determined by a quantitative polymerase chain reaction assay in patients with hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B virus infection. *Am J Gastroenterol.* 2003;98:2261-7.
 31. Chu CJ, Hussain M, Lok SF. Quantitative serum HBV DNA levels during different stages of chronic hepatitis N infection. *Hepatology.* 2002;36:1408-15.
 32. Dusheiko G. Candidates for therapy: HBV. *J Hepatol.* 2006;44: S84-9.
 33. De Franchis R, Hadengue A, Lau G, Lavanchy D, Lok A, McIntyre N, et al; EASL Jury. EASL International Consensus Conference on Hepatitis B. *J Hepatol.* 2003;39:S3-25.
 34. Hadziyannis SJ, Vassilopoulos D. Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *Hepatology.* 2001;34:617-24.
 35. Zoulim F. Assessment of treatment efficacy in HBV infection and disease. *J Hepatol.* 2006;44:S95-9.
 36. Sung JJY, Wong ML, Bowden S, Liew CT, Hui AY, Wong VW, et al. Intrahepatic B virus covalently closed circular DNA can be a predictor of sustained response to therapy. *Gastroenterology.* 2005;128:1890-7.
 37. Durantel D, Brunelle MN, Gros E, Carrouee-Durantel S, Pichoud C, Villet S, et al. Resistance of human hepatitis B virus to reverse transcriptase inhibitors: from genotypic to phenotypic testing. *J Clin Virol.* 2005;34(Suppl 1):S34-43.
 38. Lok ASF, Zoulim F, Locarnini S, Mangia A, Niro G, Decraemer H, et al. Monitoring drug resistance in chronic hepatitis B virus (HBV) infected patients during lamivudine therapy: evaluation of performance of INNO-LIPA HBV DR assay. *J Clin Microbiol.* 2002;40:3729-34.
 39. Rodríguez-Frías F, Jardí R, Buti M, Schaper M, Hermosilla E, Valdés A, et al. Hepatitis B virus genotypes and G1896A pre-core mutation in 486 Spanish patients with acute and chronic HBV infection. *J Viral Hepatitis.* 2006; manuscrito JVH 691 en prensa, disponible on-line (24/01/2006).
 40. Fung SK, Lok ASF. Hepatitis B virus genotypes: do they play a role in the outcome of HBV infection? *Hepatology.* 2004;40: 790-2.
 41. Chu CJ, Hussain M, Lok AS. Hepatitis B virus genotype B is associated with earlier HBeAg seroconversion compared with hepatitis B virus genotype C. *Gastroenterology.* 2002;122: 1756-62.
 42. Westland C, Delaney W 4th, Yamg H, Chen SS, Marcellin P, Hadziyannis S, et al. Hepatitis B virus genotypes and virologic response in 694 patients in phase III studies of adefovir dipivoxil. *Gastroenterology.* 2003;125:107-16.
 43. Zollner B, Peteersen J, Puchhammer-Stockl E, Kletzmayr J, Sternecki M, Fischer L, et al. Viral features of lamivudine resistant hepatitis B genotypes A and D. *Hepatology.* 2004;39:42-50.
 44. Chien RN, Yeh CT, Tsai DL, Chu CM, Liaw YF. Determinants for sustained HBeAg response to lamivudine therapy. *Hepatology.* 2003;38:1267-73.
 45. Conjeevaram HS, Lok ASF. Management of chronic hepatitis B. *J Hepatol.* 2003;38:S90-103.
 46. Moraleda G, Saputelli J, Aldrich CE, Averett D, Condreay L, Mason WS. Lack of effect of antiviral therapy in non-dividing hepatocyte cultures on the closed circular DNA of woodchuck hepatitis virus. *J Hepatol.* 1997;71:9392-9.