

# Determinación del genotipo del virus de la hepatitis B y detección de mutaciones de resistencia al tratamiento con lamivudina

M.C. Nogales<sup>a</sup>, M.C. Serrano<sup>a</sup>, E. Suárez<sup>b</sup>, R. Corpas<sup>b</sup>, L. Pérez<sup>a</sup>, R. Claro<sup>a</sup>, R. Jarana<sup>a</sup>, M. Romero-Gómez<sup>b</sup> y E. Martín-Mazuelos<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Microbiología. Hospital Universitario de Valme. Sevilla. <sup>b</sup>Unidad de Hepatología-Sección de Digestivo. Hospital Universitario de Valme. Sevilla. España.

## RESUMEN

**OBJETIVOS:** Determinar los genotipos del virus de la hepatitis B (VHB) en el Área Sur de Sevilla e investigar el desarrollo de mutaciones de resistencia a la lamivudina utilizando una técnica de hibridación con sondas específicas y comparar los resultados con la técnica de secuenciación directa. Valorar la relación temporal entre las variaciones del nivel de ADN-VHB y la detección de variantes mutantes. Analizar la influencia de los diversos genotipos en el patrón de mutaciones desarrolladas y en los valores de carga viral y alaninaminotransferasa (ALT) tras su aparición.

**PACIENTES Y MÉTODO:** En 37 pacientes con hepatitis crónica por VHB se determinó mediante la técnica de LiPA el genotipo del VHB y en 10 de ellos, en tratamiento con lamivudina durante una media de 19,2 meses, se investigó el desarrollo de mutaciones al fármaco. En estos 10 pacientes se comparó la técnica de LiPA con la secuenciación directa. Durante el tratamiento con lamivudina se determinó el ADN-VHB por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y ALT cada 3-6 meses.

**RESULTADOS:** Los genotipos más frecuentes fueron D (45,9%) y A (18,9%); 2 pacientes tenían el genotipo B; el 18,9% presentó genotipos mixtos. La secuenciación mostró idénticos resultados excepto en un genotipo mixto. En el 60% de los casos se encontraron mutaciones. La secuenciación fue concordante excepto en la detección de poblaciones mixtas formadas por mutantes y población salvaje (*wild type* [WT]). Los pacientes con genotipo A presentaron en los primeros 12 meses el patrón M204I+WT y los pacientes con genotipo D, el patrón L180M+M204V con o sin WT a los 18 meses. En 5/6 casos se observó un aumento  $> 1 \log_{10}$  en el ADN-VHB 3-8 meses antes de la detección de la mutación

por LiPA. En los pacientes con el genotipo B, el nivel de ADN-VHB y ALT tras el desarrollo de las mutaciones fue menor que el basal e inferior al de los genotipos A y D.

**CONCLUSIONES:** La técnica de LiPA para la determinación del genotipo del VHB y la detección de mutaciones de resistencia a la lamivudina presenta una excelente correlación con la técnica de secuenciación más compleja. El genotipo D predomina en el Área Sur de Sevilla. Durante el tratamiento con lamivudina, un aumento del nivel de ADN-VHB por PCR predice la aparición de mutaciones antes de su demostración por LiPA.

## DETERMINATION OF HEPATITIS B VIRUS GENOTYPE AND DETECTION OF LAMIVUDINE-RESISTANCE MUTATIONS

**OBJECTIVES:** To determine hepatitis B virus (HBV) genotypes in southern Seville (Spain) and investigate the development of lamivudine-resistance mutations by using a hybridization technique with specific probes and by comparing the results with those of the direct sequencing technique. To evaluate the temporal relationship between variations in the level of HBV-DNA and detection of mutant variants. To analyze the influence of several genotypes on the pattern of mutations developed and on values of viral load and alanine aminotransferase (ALT) after their development.

**PATIENTS AND METHOD:** In 37 patients with chronic HBV infection, HBV genotype was determined using the LiPA technique. In 10 of these patients undergoing lamivudine treatment for a mean of 19.2 months, the development of lamivudine-resistant mutations was investigated. In these 10 patients, the LiPA technique was compared with direct sequencing. During lamivudine treatment, we determined HBV-DNA by polymerase chain reaction (PCR) and ALT every 3-6 months.

**RESULTS:** The most frequent genotypes were D (45.9%) and A (18.9%); 2 patients were genotype B while 18.9% had mixed genotypes. Sequencing showed identical results except in one mixed genotype. Mutations were found in 60% of the

Correspondencia: Dra. M.C. Nogales.  
 Servicio de Microbiología. Hospital Universitario de Valme.  
 Ctra. de Cádiz, s/n. 41014 Sevilla. España.  
 Correo electrónico: mariac.nogales.sspa@juntadeandalucia.es

Recibido el 26-2-2004; aceptado para su publicación el 22-6-2004.

cases. The results of sequencing were in agreement, except in the detection of mixed populations composed of mutants and wild-type (WT). Patients with genotype A showed the pattern M204I+WT in the first 12 months and those with genotype D showed the pattern L180M+M204V with or without WT at 18 months. In 5/6 cases, an increase of  $> 1 \log_{10}$  in HBV-DNA was observed 3-8 months before the mutation was detected by LiPA. In patients with genotype B, levels of HBV-DNA and ALT after the development of mutations was lower than basal levels and was also lower than those in patients with genotypes A and D.

**CONCLUSIONS:** The LiPA technique for determination of HBV genotype and detection of lamivudine-resistance mutations shows excellent correlation with the most complex sequencing technique. Genotype D predominates in southern Seville. During lamivudine treatment, an increase in the level of HBV-DNA detected by PCR predicts the development of mutations before these are demonstrated by LiPA.

## INTRODUCCIÓN

La infección por el virus de la hepatitis B (VHB) es un problema internacional de salud pública que provoca alrededor de 520.000 muertes al año en todo el mundo<sup>1</sup>. El VHB ha sido clasificado en 7 genotipos diferentes designados de la A a la G y últimamente se ha descrito un nuevo genotipo H<sup>2,3</sup>. Estos genotipos se definen por la existencia de una divergencia de más del 8% de los nucleótidos en la secuencia completa y muestran una distribución geográfica característica. Estudios recientes señalan la utilidad clínica de la determinación de los genotipos del VHB, tanto en la evolución natural de la enfermedad como en la respuesta al tratamiento<sup>4-10</sup>.

En la actualidad se dispone de 3 tratamientos para la hepatitis crónica por VHB: interferón alfa, lamivudina y adefovir dipivoxil<sup>11</sup>. La lamivudina produce una rápida disminución de los valores de ADN-VHB en sangre y una mejoría de la histología hepática; sin embargo, el tratamiento prolongado lleva al desarrollo de mutaciones en el gen de la polimerasa, principalmente en los codones 204 y 180. La selección de estas mutaciones produce una elevación de las transaminasas, una menor pérdida del antígeno HBe (HBeAg) y seroconversión a anti-HBe, así como mayor deterioro de la histología hepática<sup>12-14</sup>.

En este estudio determinamos los genotipos del VHB en el Área Sur de Sevilla e investigamos el desarrollo de mutaciones de resistencia a lamivudina. Para ello hemos utilizado una técnica de hibridación con sondas específicas y hemos comparado los resultados con la técnica de secuenciación directa. Asimismo, valoramos la relación temporal entre las variaciones de los niveles de ADN-VHB y la detección de variantes mutantes. Por último, analizamos la influencia de los diversos genotipos en el patrón de mutaciones desarrolladas, en el tiempo de aparición de éstas y en los valores de carga viral VHB y alaninaminotransferasa (ALT) tras su aparición.

## PACIENTES Y MÉTODO

### Pacientes y muestras

Para determinar el genotipo obtuvimos aleatoriamente muestras de suero correspondientes a 37 pacientes, 23 varones y 14 mujeres con una edad media de  $40 \pm 10$  años (rango, 19-63 años), diagnosticados de hepatitis crónica por VHB y en seguimiento en la consulta de hepatología de nuestro hospital. El HBeAg era positivo en 8 pacientes y negativo en 29. El nivel de ADN-VHB era  $\geq 10^4$  copias/ml. Ninguno estaba coinfectado por virus de la hepatitis C (VHC), D (VHD) o virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). De los 37 pacientes, 21 fueron tratados con lamivudina por presentar una ALT  $> 2$  veces su valor normal y una carga viral  $\geq 10^5$  copias/ml. En 10 de estos pacientes, 9 varones y 1 mujer con edad media de  $46,1 \pm 7,44$  años (rango, 37-60 años), estudiamos el desarrollo de mutaciones de resistencia al fármaco. El HBeAg era positivo en 2 y negativo en 8. Se observó cirrosis en 2 pacientes, 6 de ellos, incluidos los 2 con un HBeAg positivo, no habían respondido previamente al tratamiento con interferón. Los pacientes recibieron tratamiento con lamivudina durante 10-30 meses (media,  $19,2 \pm 7,13$ ). Durante el tratamiento se determinaron los valores de ALT y ADN-VHB cada 3 meses en los primeros 12 meses y posteriormente cada 6 meses. Se consideró que había respuesta virológica a la lamivudina ante un descenso del valor de ADN-VHB a  $< 10^5$  copias/ml y seroconversión a anti-HBe en los pacientes con un HBeAg positivo.

El genotipo VHB se determinó mediante la técnica de hibridación con sondas específicas en los 37 pacientes y, además, con la técnica de secuenciación directa en el subgrupo de 10 pacientes tratados con lamivudina.

Para el estudio de las mutaciones mediante las técnicas de hibridación con sondas específicas y secuenciación directa se analizaron 3-7 muestras en cada paciente, incluyendo una basal y varias durante el tratamiento. La carga viral de las muestras estudiadas se encontraba comprendida entre  $10^3$  y  $10^8$  copias/ml. Se consideró que había resistencia a lamivudina ante el desarrollo de mutaciones detectadas mediante la técnica de hibridación con sondas específicas.

Se determinaron los siguientes marcadores serológicos: HBsAg, anti-HBc, HBeAg y anti-HBe mediante AXYS (Abbott Laboratories) y ADN-VHB por Cobas AmpliCor HBV Monitor Test (Roche Diagnostics) con un límite de detección  $< 200$  copias/ml.

El ADN viral se extrajo del suero utilizando las columnas de extracción TRUPREP<sup>TM</sup> Extraction Kit (Visible Genetics).

### Hibridación con sondas específicas

A partir del ADN viral extraído, se realizó la determinación del genotipo del VHB y la detección de mutaciones de resistencia a lamivudina mediante los sistemas INNO-LiPA HBV Genotyping Kit e INNO-LiPA HBV-DR, respectivamente (Innogenetics).

### Secuenciación

A partir del ADN viral extraído, se llevó a cabo la técnica de secuenciación mediante el sistema TRUGENE HBV Genotyping Kit (Bayer Diagnostics) y siguiendo las normas de la firma comercial.

### Análisis estadístico

Las variables cuantitativas se compararon mediante las pruebas no paramétrica de Mann-Whitney y de Wilcoxon para 2 muestras independientes. Para las variables categóricas se utilizó la prueba de la  $\chi^2$  o el test exacto de Fisher. Todos los cálculos se realizaron con el programa SPSS 11.0 para Windows.

## RESULTADOS

En los 37 pacientes estudiados, los valores basales medios de ALT y ADN-VHB fueron  $85,78 \pm 38,42$  U/l (rango, 43-218) y  $2,6 \times 10^7 \pm 1,1 \times 10^8$  copias/ml (rango,  $5,9 \times 10^4$ - $6,5 \times 10^8$ ), respectivamente. La carga viral de los pacientes con un HBeAg positivo fue superior a la de los pacientes con un HBeAg negativo:  $1 \times 10^8 \pm 2,2 \times 10^8$  frente a  $5,8 \times 10^6 \pm 7,98 \times 10^6$  copias/ml ( $p = 0,01$ ). El

TABLA I. Características de los genotipos del virus de la hepatitis B

Genotipo	N.º de pacientes	HBeAg+ (%)	Sexo (V/M)	Edad media (años)	ALT media (U/l)	ADN-VHB media (copias/ml)
A	7	57	5/2	34,7 ± 10,5	113,7 ± 57,9	1,1 × 10 <sup>8</sup> ± 2,4 × 10 <sup>8</sup>
D	17	23,5	10/7	40 ± 11	77 ± 29,3	1,2 × 10 <sup>7</sup> ± 1,7 × 10 <sup>7</sup>
Mixto	7	0	4/3	39 ± 8	80 ± 30	8,5 × 10 <sup>5</sup> ± 1,5 × 10 <sup>5</sup>

HBeAg: antígeno HBe; ALT: alaninaminotransferasa; V: varón; M: mujer; VHB: virus de la hepatitis B.

valor basal de ALT fue similar en ambos grupos (87,8 ± 41,3 y 85,2 ± 38,3 U/l, respectivamente). En los 10 pacientes tratados con lamivudina, los valores basales medios de ALT y carga viral fueron 118,2 ± 43,74 U/l (rango, 77-218) y 7,29 × 10<sup>6</sup> ± 7,51 × 10<sup>6</sup> copias/ml (rango, 5,95 × 10<sup>4</sup>-2,15 × 10<sup>7</sup>), respectivamente.

De los 37 pacientes, 27 (72,9%) tenían un genotipo único: 17 pacientes infectados con el genotipo D (45,9%), 7 con el A (18,9%), 2 con el B (5,4%) y 1 con el F (2,7%). En 7 muestras (18,9%) se obtuvo como resultado un genotipo mixto: en 4 el A+D, en 2 el B+D y en 1 el D+F. Tres muestras (8,1%) no pudieron ser amplificadas. Entre los pacientes con un HBeAg positivo, 4 tenían el genotipo A (50%) y 4 el genotipo D (50%). En los que tenían un HBeAg negativo, 13 presentaban el genotipo D (44,8%), 3 el genotipo A (10,3%), 2 el genotipo B y 1 el genotipo F; el resto tenía genotipos mixtos (24,1%) o no amplificables (10,3%). Estas diferencias no alcanzaron significación estadística. En la tabla I se muestran las características de los diferentes genotipos. El nivel de ADN-VHB basal de los pacientes con un genotipo mixto fue inferior al de los pacientes con los genotipos A y D (p = 0,006 y 0,01, respectivamente).

En los 10 pacientes tratados con lamivudina, el genotipo también se determinó empleando la técnica de secuenciación; se obtuvieron idénticos resultados mediante ambas técnicas en los 9 pacientes con genotipo único (5 con el genotipo D, 2 con el genotipo A y 2 con el genotipo B), y en el paciente en el que el LiPA identificó un genotipo B + D, la secuenciación identificó D.

En el estudio de mutaciones de resistencia, durante el tratamiento con lamivudina, 7 pacientes mantuvieron los valores de ADN-VHB siempre por encima del nivel de detección de la técnica, pero en sólo 2 de ellos estos niveles fueron superiores a 10<sup>5</sup> copias/ml. Los 3 pacientes con ADN-VHB negativo en algún momento del tratamiento eran los únicos con una carga viral basal inferior a 10<sup>6</sup> copias/ml y con los genotipos B (2 pacientes) o B+D (1 paciente). De los 10 pacientes, 4 (40%) conservaban población salvaje (*wild type* [WT]) y en 6 (60%) se encontraron mutaciones en el gen de la polimerasa. Dos pacientes presentaron las mutaciones L180M y M204V asociadas o no a WT, en otros 2 apareció la mutación M204I asociada a WT y sólo en 1 paciente se detectó la mutación M204V aislada. En 1 caso, la variante mutante L180M se detectó en la muestra basal y con posterioridad se desarrollaron las mutaciones M204I y V207I. Mediante la técnica de secuenciación se estudiaron 14 muestras correspondientes a estos 10 pacientes. Los resultados obtenidos concuerdan con el LiPA, excepto en la ausencia de detección de poblaciones mixtas constituidas por mutantes asociadas a WT.

De los 4 pacientes sin mutaciones, 2 pacientes con HBeAg negativo mantuvieron durante el tratamiento valores de ADN-VHB superiores a 10<sup>5</sup> copias/ml y valores de ALT elevados, por lo que se suspendió la lamivudina a los 10 y 12 meses al considerarlos no respondedores; tras la suspensión no presentaron brotes de hepatitis; 2 y 18 meses después iniciaron tratamiento con adefovir dipivoxil. Un paciente con HBeAg positivo y genotipo D desarrolló seroconversión a anti-HBe a los 4 meses de tratamiento, suspendiéndose la lamivudina 12 meses después; pese a ello, a los 3 meses de la suspensión presentó reversión a HBeAg positivo con niveles de ADN-VHB de 1,8 × 10<sup>7</sup> copias/ml y de ALT de 199 U/l, por lo que fue tratado de nuevo con lamivudina. Por último, 1 paciente con HBeAg negativo y genotipo B+D a los 24 meses de tratamiento conservaba población WT; el nivel de ADN-VHB aumentó de < 200 copias/ml a los 18 meses a 1,13 × 10<sup>4</sup> y 8,30 × 10<sup>4</sup> copias/ml en 2 determinaciones repetidas a los 24 meses con ALT normal; se mantuvo la lamivudina y 6 meses después el ADN-VHB descendió a 9,50 × 10<sup>3</sup> copias/ml.

De los 6 pacientes con mutaciones, 2 tenían el genotipo A, 2 el B y 2 el D. Las variantes mutantes aparecieron a los 9 meses en 2 casos, a los 12 meses en 1, a los 18 meses en 2 y a los 26 meses en 1. La M204I asociada o no a WT se desarrolló en los primeros 12 meses, mientras que la L180M+M204V asociada o no a WT surgió a los 18 meses y la M204V aislada a los 26 meses. Los pacientes con genotipo A presentaron el patrón M204I+WT y los pacientes con genotipo D, el patrón L180M+M204V con o sin WT. Los pacientes con genotipo B desarrollaron patrones variables (M204I+V207I o M204V).

En 5 pacientes que desarrollaron mutaciones se observó un aumento superior a 1 log<sub>10</sub> de la carga viral en 2 determinaciones repetidas entre 3 y 8 meses antes de su detección por LiPA; en 2 de ellos este aumento significó la reaparición del ADN-VHB, que era < 200 copias/ml durante el tratamiento. En el caso restante, el aumento de la carga viral fue simultáneo a la detección de las variantes mutantes.

El nivel medio de ADN-VHB tras la aparición de las mutaciones fue inferior en los pacientes con genotipo B (5,54 × 10<sup>3</sup> ± 4,92 × 10<sup>3</sup> copias/ml) que en los de genotipo A (1,28 × 10<sup>7</sup> ± 1,70 × 10<sup>7</sup> copias/ml; p = 0,0001) y genotipo D (1,88 × 10<sup>7</sup> ± 2,60 × 10<sup>7</sup> copias/ml; p = 0,0001). En los pacientes con genotipo B, este nivel fue menor que el basal (6,65 × 10<sup>4</sup> ± 9,89 × 10<sup>3</sup> copias/ml), mientras que en los de genotipos A y D fue superior al basal (7,63 × 10<sup>6</sup> ± 1,99 × 10<sup>6</sup> y 8,74 × 10<sup>6</sup> ± 6,58 × 10<sup>6</sup> copias/ml, respectivamente), sin alcanzar significación estadística. Las cifras basales medias de ALT fueron si-

TABLA II. Evolución de los genotipos del virus de la hepatitis B tras las mutaciones

	Genotipo A	Genotipo D	Genotipo B
Carga viral media basal (copias/ml)	$7,63 \times 10^6 \pm 1,99 \times 10^6$	$8,74 \times 10^6 \pm 6,58 \times 10^6$	$6,65 \times 10^4 \pm 9,89 \times 10^3$
Carga viral media tras la aparición de las mutaciones (copias/ml)	$1,28 \times 10^7 \pm 1,7 \times 10^7$	$1,88 \times 10^7 \pm 2,60 \times 10^7$	$5,54 \times 10^3 \pm 4,92 \times 10^3$
ALT media basal (U/l)	$164,5 \pm 75,66$	$112 \pm 49,5$	$127 \pm 1,41$
ALT media tras la aparición de las mutaciones (U/l)	$224,5 \pm 38,9$	$136 \pm 87,7$	$34 \pm 16,9$
Patrón de mutaciones	M204I+WT	L180M+M204V ± WT	M204I+V207I o M204V

ALT: alaninaminotransferasa.

milares en los pacientes con los genotipos A, B y D ( $164,5 \pm 75,66$ ,  $127 \pm 1,41$  y  $112 \pm 49,5$  U/l, respectivamente;  $p = \text{NS}$ ). Tras el desarrollo de las mutaciones, el valor medio de ALT fue superior al basal en los genotipos A y D ( $224,5 \pm 38,9$  y  $136 \pm 87,7$  U/l, respectivamente) e inferior al basal, dentro del rango normal, en el genotipo B ( $34 \pm 16,9$  U/l), sin diferencias significativas (tabla II).

En los 4 pacientes con genotipos A y D, tras la aparición de las mutaciones se sustituyó la lamivudina por el adefovir dipivoxil. En los 2 pacientes con genotipo B se mantuvo la lamivudina por permanecer el nivel de ADN-VHB  $\leq 10^4$  copias/ml y los valores de ALT en un rango normal a los 10 y 20 meses, respectivamente, del desarrollo de las mutaciones.

## DISCUSIÓN

En el presente estudio realizado en el Área Sur de Sevilla, los genotipos D y A eran los más frecuentes. En los pacientes con HBeAg positivo, los genotipos A y D presentaban la misma prevalencia y en los que tenían un HBeAg negativo predominaba el genotipo D, sin alcanzar la significación estadística probablemente debido a la detección de genotipos mixtos (todos con genotipo D). Estos resultados concuerdan con los de otros trabajos realizados en nuestro país<sup>5,15</sup>, lo que confirma el predominio del genotipo D en el área mediterránea. En 4 casos encontramos genotipo B, en 2 como genotipo único y en 2 asociado al genotipo D, en pacientes no emigrantes nacidos en la provincia de Sevilla. El genotipo B se ha detectado en el sudeste asiático, China, Japón y en norteamericanos de origen asiático<sup>16</sup>. Estudios epidemiológicos con un mayor número de casos realizados en nuestra área y en otras del país nos permitirán valorar el significado de la presencia del genotipo B en la población autóctona. Destacaba la presencia de poblaciones mixtas de genotipos en el 19% de nuestros casos. En los 2 estudios españoles<sup>5,15</sup> en los que el genotipo se investigó mediante el análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) no se encontraron genotipos mixtos. En nuestra serie, en los pacientes en los que se determinó el genotipo también por la técnica de secuenciación, la correlación entre ambas técnicas era excelente; únicamente en un caso con una población mixta en LiPA, la secuenciación detectó sólo 1 de los 2 genotipos. Esto se debe a una mayor sensibilidad de la técnica de LiPA, mientras que la secuenciación sólo permite detectar la población predomi-

nante<sup>17</sup>. La carga viral de los pacientes con genotipo mixto era inferior a la de los pacientes con genotipos A y D. La utilización de esta técnica en futuros estudios puede confirmar estos resultados.

En el presente estudio, el 60% de los pacientes en tratamiento con lamivudina durante una media de 19 meses desarrolló mutaciones resistentes al fármaco. Esta frecuencia de mutaciones es similar a la descrita en otras series a los 2 años de tratamiento: del 38% en asiáticos con HBeAg positivo y del 57-64% en los que tienen un HBeAg negativo<sup>18,19</sup>. Los niveles basales de ADN-VHB de los 10 pacientes incluidos eran elevados, factor asociado a la aparición de mutaciones<sup>20</sup>.

Las mutaciones del gen de la polimerasa encontradas en nuestro trabajo, en los codones 180 y 204, corresponden a las descritas en la bibliografía<sup>21</sup>. En un paciente con genotipo B apareció la mutación V207I asociada a la M204I. El mismo paciente presentaba en la muestra basal la mutación L180M. En portadores inactivos de VHB no tratados con lamivudina se ha descrito la presencia de mutantes en el codón 204, lo que sugiere que el tratamiento seleccionaría a mutantes preexistentes<sup>22</sup>; sin embargo, no hemos encontrado casos similares descritos en las series de pacientes con hepatitis crónica VHB. En la determinación de resistencias hemos encontrado una correlación excelente entre las técnicas de LiPA y secuenciación. La técnica de secuenciación no fue capaz de detectar a las poblaciones mixtas formadas por mutantes y población salvaje e identificó sólo a las mutantes. La técnica de LiPA es más sensible y muestra poblaciones presentes en un 5%, mientras que la secuenciación precisa que éstas constituyan más del 25% de la población total<sup>23</sup>.

La variante mutante con mayor resistencia *in vitro* a lamivudina (M204I) apareció más precozmente que las mutaciones con menor resistencia (L180M+M204V y M204V)<sup>24</sup>. Los pacientes con genotipo A desarrollaron la mutación M204I y los de genotipo D el patrón L180M+M204V. Estos datos coinciden con los de un estudio reciente que mostraba una tasa similar de resistencias a la lamivudina en genotipos A y D a largo plazo, pero en el genotipo A se presentaban más precozmente<sup>25</sup>. Hay discrepancias en la bibliografía relativas al patrón de mutaciones asociado a los diferentes genotipos; en 2 estudios, la mutación M204I era más frecuente en el genotipo D y la M204V, en el genotipo A<sup>14,26</sup>, resultados discordantes con los nuestros, pero en otro, el patrón L180M+M204V se presentaba con una frecuencia similar a la mutación M204I en el genotipo D<sup>27</sup>. En este último trabajo, las mutaciones de resistencia fueron investigadas mediante la técnica de LiPA, como en nuestro estudio, y los

hallazgos son más similares. Es necesario conocer los mecanismos que determinan la asociación de patrones de mutación y genotipos realizando estudios con técnicas estandarizadas.

Un aumento superior a  $1 \log_{10}$  de los niveles de ADN-VHB determinados mediante técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) precedió en 3-8 meses en el 83% de nuestros casos o coincidió con la detección de la mutación en el gen de la polimerasa mediante técnica de LiPA. En un paciente que no desarrolló mutaciones, este aumento se produjo en la última determinación realizada a los 24 meses de tratamiento, sin que se haya analizado muestras posteriores. Por el contrario, en los estudios publicados<sup>20,23</sup>, la recidiva genotípica o la presencia de las mutaciones mediante LiPA precedía en 90-144 días a la recidiva fenotípica o reaparición de ADN-VHB determinado por ADNb; esta técnica menos sensible necesita un nivel de ADN-VHB  $> 7 \times 10^5$  copias/ml para que se pueda detectar. La utilización de la técnica de PCR permite predecir precozmente la aparición de resistencias, debido a que detecta niveles de ADN-VHB  $\geq 200$  copias/ml.

En la bibliografía, la evolución clínica tras el desarrollo de mutantes resistentes a lamivudina es variable. En pacientes con HBeAg positivo, los valores de ALT y ADN-VHB pueden mantenerse por debajo del nivel basal y la mejoría histológica persistir durante al menos 2 años<sup>28</sup>. Por el contrario, en pacientes con HBeAg negativo, el 35 y el 43% presentan elevaciones de ALT superiores a 8 y 5 veces su valor normal, respectivamente<sup>14,20</sup>. En nuestra serie, el valor de ADN-VHB después del desarrollo de las mutaciones fue inferior en los pacientes con genotipo B que en los de genotipo A y D; además, dicho nivel era menor que el basal en los de genotipo B y mayor que el basal en los de genotipo A y D, sin que se obtuviera significación estadística por el escaso número de casos. El nivel de ALT tras la mutación fue inferior al basal y permaneció dentro del rango normal en los pacientes con genotipo B y superior al basal en los de genotipo D y A, de nuevo sin significación estadística. Estas diferencias en la evolución según el genotipo pueden explicar los distintos resultados publicados. En un estudio reciente se ha confirmado *in vitro* que la mutación pre-core G1896A, frecuente en el genotipo D, aumenta la eficacia de la replicación de las variantes mutantes resistentes a lamivudina<sup>29</sup>.

En conclusión, el presente trabajo muestra que la técnica de LiPA para la determinación del genotipo del VHB y la detección de mutaciones de resistencia a lamivudina en el gen de la polimerasa presenta una excelente correlación con la técnica de secuenciación, que es más compleja y requiere un material más costoso, así como un personal altamente cualificado. Se confirma el predominio del genotipo D en el Área Sur de Sevilla como zona mediterránea. En pacientes tratados con lamivudina, una elevación del nivel de ADN-VHB medido por PCR predice el desarrollo de mutaciones antes de su demostración por LiPA, lo que permite el tratamiento con adefovir dipivoxil antes de la exacerbación de la hepatopatía. La técnica de LiPA puede ser útil para descartar mutaciones en pacientes con un cumplimiento dudoso del tratamiento. Se necesitan es-

tudios más amplios para confirmar la influencia de los genotipos del VHB en el tipo de mutaciones desarrolladas y en la evolución clínica tras su aparición.

#### AGRADECIMIENTO

A Ricardo Escartín de Gilead por su colaboración en la realización de este trabajo.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. EASL International Consensus Conference on Hepatitis B. *J Hepatol* 2003;38:533-40.
2. Kidd-Ljunggren K, Miyakawa Y, Kidd AH. Genetic variability in hepatitis B viruses. *J Gen Virol* 2002;83:1267-80.
3. Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnius L. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* 2002;83:2059-73.
4. Mayerat C, Mantegani A, Frei PC. Does hepatitis B virus (HBV) genotype influence outcome of HBV infection? *J Viral Hepat* 1999;6:299-304.
5. Sánchez-Tapias JM, Costa J, Mas A, Bruguera M, Rodés J. Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. *Gastroenterology* 2002;123:1848-56.
6. Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes correlates with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2000;118:554-9.
7. Yuen MF, Sablon E, Yuan HJ, Wong DKH, Hui CK, Wong BCY, et al. Significance of hepatitis B genotype in acute exacerbation, HBeAg seroconversion, cirrhosis-related complications and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2003;37:562-7.
8. Zhang X, Zoulim F, Habersetzer F, Xiong S, Trépo C. Analysis of hepatitis B virus genotypes and pre-core region variability during interferon treatment of HBe antigen negative chronic hepatitis B. *J Med Virol* 1996;48:8-16.
9. Kao JH, Wu NH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy. *J Hepatol* 2000;33:998-1002.
10. Wai CT, Chu CJ, Hussain M, Lok ASF. HBV genotype B is associated with better response to interferon therapy in HBeAg(+) chronic hepatitis than genotype C. *Hepatology* 2002;36:1425-30.
11. Buti M. Actualización en el tratamiento de la hepatitis crónica B. *Gastroenterol Hepatol* 2004;27:55-7.
12. Lai CL, Dienstag J, Schiff E, Leung NWY, Atkins M, Hunt C, et al. Prevalence and clinical correlates of YMDD variants during lamivudine therapy for patients with chronic hepatitis B. *Clin Infect Dis* 2003;36:687-96.
13. Dienstag JL, Goldin RD, Heathcote J, Hann WL, Woessner M, Stephenson SL, et al. Histological outcome during long-term lamivudine therapy. *Gastroenterology* 2003;124:105-17.
14. Papatheodoridis GV, Dimou E, Laras A, Papadimitropoulos V, Hadziyannis SJ. Course of virologic breakthroughs under long-term lamivudine in HBeAg-negative precore mutant HBV liver disease. *Hepatology* 2002;36:219-26.
15. Rodríguez-Frías F, Buti M, Jardi 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.
16. Buti M. Genotipos del virus de la hepatitis B. *Gastroenterol Hepatol* 2003;26:260-2.
17. Kato HK, Orito E, Sugauchi F, Ueda R, Koshizaka T, Yanaka S, et al. Frequent coinfection with hepatitis B virus strains of distinct genotypes detected by hybridization with type-specific probes immobilized on a solid-phase support. *J Virol Methods* 2003;110:29-35.
18. Liaw YF, Leung NWY, Chang TT, Guan R, Tai DI, Ng KY, et al. Effects of extended lamivudine therapy in Asian patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2000;119:172-80.
19. Rizzetto M. Efficacy of lamivudine in HBeAg negative chronic hepatitis BJM Virol 2002;66:435-41.

20. Si Ahmed SN, Tavan D, Pichoud C, Berby F, Stuyver L, Johnson M, et al. Early detection of viral resistance by determination of hepatitis B virus polymerase mutations in patients treated by lamivudine for chronic hepatitis B. *Hepatology* 2000; 32:1078-88.
21. Lok ASF, Hussain M, Cursano C, Margotti M, Gramenzi A, Grazi GL, et al. Evolution of hepatitis B virus polymerase gene mutations in hepatitis B e antigen-negative patients receiving lamivudine therapy. *Hepatology* 2000;32:1145-53.
22. Kobayashi S, Ide T, Sata M. Detection of YMDD motif mutations in some lamivudine-untreated asymptomatic hepatitis B virus carriers. *J Hepatol* 2001;34:584-6.
23. Yuen MF, Sablon E, Hui CK, Yuan HJ, Decraemer H, Lai CL. Factors associated with hepatitis B virus DNA breakthrough in patients receiving prolonged lamivudine therapy. *Hepatology* 2001;34:785-91.
24. Allen MI, Deslauriers M, Andrews CW, Tipples GA, Walters KA, Tyrrell DL, et al. Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. Lamivudine Clinical Investigation Group. *Hepatology* 1998;27:1670-7.
25. Buti M, Cotrina M, Valdés A, Jardi R, Rodríguez-Frías F, Esteban R. Is hepatitis B virus subtype testing useful in predicting virological response and resistance to lamivudine? *J Hepatol* 2002;36:445-6.
26. Zöllner B, Petersen J, Puchhammer-Stöckl E, Kletzmayr J, Sternek M, Fischer L, et al. Viral features of lamivudine resistant hepatitis B genotypes A and D. *Hepatology* 2004;39:42-50.
27. Ciancio A, Smedile A, Rizzetto M, Lagget M, Gerin J, Korba B. Identification of HBV DNA sequences that are predictive of response to lamivudine therapy. *Hepatology* 2004;39:64-73.
28. Leung NWY, Lai CL, Chang TT, Guan R, Lee CM, Ng KY, et al. Extended lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B enhances hepatitis B e antigen seroconversion rates: results after 3 years of therapy. *Hepatology* 2001;33:1527-32.
29. Chen RYM, Edwards R, Shaw T, Colledge D, Delaney IV WE, Isom H, et al. Effect of the G1896A precore mutation on drug sensitivity and replication yield of lamivudine-resistant HBV *in vitro*. *Hepatology* 2003;37:27-35.