

## Hepatitis B: seguimientos serológico y virológico de la respuesta y la resistencia al tratamiento antiviral

F. Rodríguez-Frías y R. Jardí

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

### INTRODUCCIÓN

A pesar de los importantes avances en su tratamiento y prevención, la infección por el virus de la hepatitis B (VHB) representa un problema de salud pública a escala mundial. Se estima que un tercio de la población mundial se ha infectado por este virus, con más 350 millones de portadores crónicos, de los que el 30% presenta una infección activa<sup>1</sup>. La infección crónica por el VHB (HCB) se asocia a un riesgo de desarrollar complicaciones graves, como la cirrosis hepática (CH) y el hepatocarcinoma (CHC), 60 veces superior al de la población general, riesgo que aumenta con los valores de ácido desoxirribonucleico (ADN)-VHB<sup>2</sup>.

### Virología del virus de la hepatitis B

*Características del genoma viral.* El genoma del VHB está formado por una pequeña molécula de ADN (3.200 pares de bases), parcialmente en forma de doble cadena circular sin cerrar o relajada (ADNrc), con 4 regiones codificantes de proteínas (ORF) fuertemente solapadas<sup>3</sup>: ORF preS/S (proteínas de la envuelta que forman el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B [HBsAg]); ORF preCore/C (antígeno *core* del virus de la hepatitis B [HBcAg] de la cápsida viral y el antígeno no estructural «e» HBeAg); la ORF X (proteína transactivadora involucrada en la carcinogénesis) y la ORF P (polimerasa), que cubre el 80% del genoma viral y codifica una proteína con 4 dominios funcionales: la proteína terminal (PT) o primasa, cebadora en la síntesis de la cadena negativa del

ADN viral; la polimerasa viral con actividad transcriptasa reversa; ADN polimerasa (RT), y la ARNsa H (RH). La RT del VHB presenta analogías con la polimerasa del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), comparten el motivo catalítico esencial YMDD (tirosina, metionina, ácido aspártico, ácido aspártico) situado en el dominio C.

*Replicación del VHB ADNccc.* En el núcleo del hepatocito, el ADNrc viral es convertido en el ADN de doble cadena circular y cerrado por una unión covalente (ADNccc)<sup>3</sup>. Un hepatocito infectado puede contener 50 o más copias de ADNccc en forma de minicromosomas, que permanecen durante toda la vida de la célula<sup>4</sup>. El ADNccc actúa como molde de síntesis de los ácidos ribonucleicos (ARN) mensajeros virales, uno de los cuales (ARN pregenómico) es retrotranscrito por la RT a nuevas moléculas de ADNrc en el interior de partículas *core* (nucleocápsidas). Estas nucleocápsidas con ADNrc, además de dar lugar a nuevas partículas virales, pueden entrar de nuevo en el núcleo celular e incrementar el reservorio de ADNccc. Se considera al ADNccc como la causa de mantener la infección crónica y su reactivación tras retirar los tratamientos antivirales. Su eliminación es el factor clave en la erradicación de la infección.

### Variabilidad del virus de la hepatitis B

*Errores de la polimerasa viral.* La RT del VHB no tiene capacidad de corrección de errores, por lo que éstos se acumulan durante la retrotranscripción del ARN pregenómico, dando lugar a una elevada tasa de mutación ( $1,4-3,2 \times 10^5$  sustituciones/nucleótido/ciclo). Debido a esta variabilidad y a su alta capacidad replicativa, el VHB circula como una mezcla compleja de variantes genómicas o cuasi-especies, que evoluciona durante la infección, bajo la presión evolutiva de factores como la respuesta inmunitaria y los tratamientos antivirales.

*Genotipos virales.* A partir de su variabilidad, el VHB se ha clasificado en 8 genotipos (A-H) con una distribución

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

geográfica característica<sup>5</sup>. En España, los genotipos A y D se encuentran en proporciones muy análogas y representan conjuntamente el 90% de los casos estudiados<sup>6,7</sup>. El genotipo del VHB puede afectar al curso de la enfermedad<sup>7</sup>, y la respuesta, a tratamientos antivirales<sup>5,8,9</sup>. Así, en tratamiento con interferón (IFN), la tasa de seroconversión a anti-HBe es superior en los genotipos A y B que en C y D ( $\cong 45$  frente a  $\cong 25\%$ )<sup>9</sup>. En tratamientos con análogos de nucleós(t)idos (AN), datos recientes indican la asociación entre la respuesta y el genotipo viral<sup>8-11</sup>.

*Variantes.* Además de los genotipos, se han descrito otras variantes genéticas de especial interés para el curso de la infección<sup>5</sup>: variantes de la región de la RT viral (resistencia a tratamientos antivirales con AN) de la región pre-core (HCB HBeAg negativa), y de la región de superficie (ausencia de efecto protector de la vacuna o de las inmunoglobulinas específicas).

### TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN CRÓNICA POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS B

Se han desarrollado tratamientos muy efectivos para atenuar la replicación viral en la infección por el VHB, y disminuir el riesgo de la progresión de la enfermedad asociado a esta replicación<sup>2</sup>. Actualmente, 5 de estos tratamientos están aprobados en España: 2 formulaciones de IFN ( $\alpha$ -2b estándar y  $\alpha$ -2a pegilado), 2 análogos de nucleósidos, lamivudina (LAM) y entecavir (ETV), y un análogo de nucleótidos, adefovir-dipivoxil (ADV). Un tercer análogo de nucleósidos, telbivudina (LdT), está aprobado en Estados Unidos. Otros tratamientos con AN aprobados para la infección por el VIH, como tenofovir (TDF), emtricitabina (FTC) y la combinación de ambos, tienen actividad frente al VHB. El objetivo último de estos tratamientos es prevenir la progresión de la infección, pero ésta puede requerir décadas para mostrarse, por lo que el objetivo a corto plazo es alcanzar la supresión de la replicación viral e inducir la remisión de la enfermedad hepática. A pesar de su gran potencia antiviral, los AN no son capaces de erradicar el VHB, por lo que el beneficio de su aplicación depende de su habilidad para mantener la supresión sostenida de la replicación viral. Los AN tienen un escaso efecto en la eliminación del ADNccc; en teoría se necesitarían 14 años de tratamiento para su eliminación completa<sup>12</sup>. Por este motivo, se requieren tratamientos muy prolongados, lo que aumenta el riesgo de selección de variantes virales resistentes al tratamiento que provocan el fracaso de ésta y el posible agravamiento de la lesión hepática<sup>13</sup>. Un seguimiento adecuado del tratamiento que permita la detección temprana de las resistencias es esencial para disminuir el impacto negativo de éstas.

El tratamiento con IFN o IFN pegilado tiene una duración limitada por sus importantes efectos secundarios, la evaluación de los cuales debe incluirse en su seguimiento<sup>14</sup>. En cambio, los AN presentan una seguridad elevada, y únicamente ADV y TDF se han asociado con casos de dis-

función renal (nefrotoxicidad)<sup>15</sup>. Esta seguridad permite su utilización durante períodos prolongados, o incluso indefinidos, con el riesgo comentado del desarrollo de resistencias y sus consecuencias negativas.

### Valoración del éxito de los tratamientos antivirales.

#### Definiciones de respuesta (adaptado de Lok y McMahon<sup>16</sup> y Hoofnagle et al<sup>17</sup>)

*Respuesta bioquímica.* «Consiste en la normalización de los valores séricos de alanina-aminotransferasa (ALT)». Es difícil valorar descensos significativos sin normalización. La persistencia de elevaciones de ALT, a pesar de haber respuesta al tratamiento, puede relacionarse con afectación hepática no viral.

*Respuesta histológica.* «Disminución de 2 puntos en los parámetros necroinflamatorios del índice de actividad histológica de Knodell, sin empeoramiento de la fibrosis hepática».

*Respuesta virológica.* «ADN del VHB indetectable por una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de alta sensibilidad».

*Pérdida de HBeAg con o sin seroconversión a anti-HBe.* Se considera la respuesta al tratamiento en HCB HBeAg positivo junto a la reducción de los valores de ADN del VHB.

*Respuesta sostenida.* «Respuesta mantenida a los 6-12 meses de finalizar el tratamiento».

*Respuesta completa.* «Respuesta combinada (bioquímica y virológica) con pérdida de HBsAg y desarrollo de anti-HBs». Se considera la resolución de la infección.

### Eficacia de los tratamientos antivirales para la infección por el virus de la hepatitis B

En general, en un año de tratamiento, los AN disminuyen más los valores séricos de ADN del VHB (ETV y LdT, más que LAM y ADV) que IFN, pero con menor tasa de seroconversión a anti-HBe o negativización del HBsAg (fig. 1A). Sin embargo, la seroconversión aumenta al prolongar el tratamiento con AN (> 40% tras 5 años con ADV o LAM, o 3 años con ETV)<sup>18</sup>. En pacientes HBeAg negativo la respuesta virológica es muy elevada, tanto con AN como con IFN, pero la reactivación al interrumpir el tratamiento es muy frecuente (> 80-90%)<sup>19</sup>. La probabilidad de selección de variantes resistentes con AN aumenta al prolongar el tratamiento, sobre todo con LAM y LdT y tratamientos de rescate de pacientes con resistencias a LAM mediante ADV o ETV (fig. 1B). La combinación LAM más ADV disminuye las resistencias en relación con la monoterapia con LAM (el 15 frente al 43% a los 2 años), pero no su respuesta virológica<sup>18</sup>.

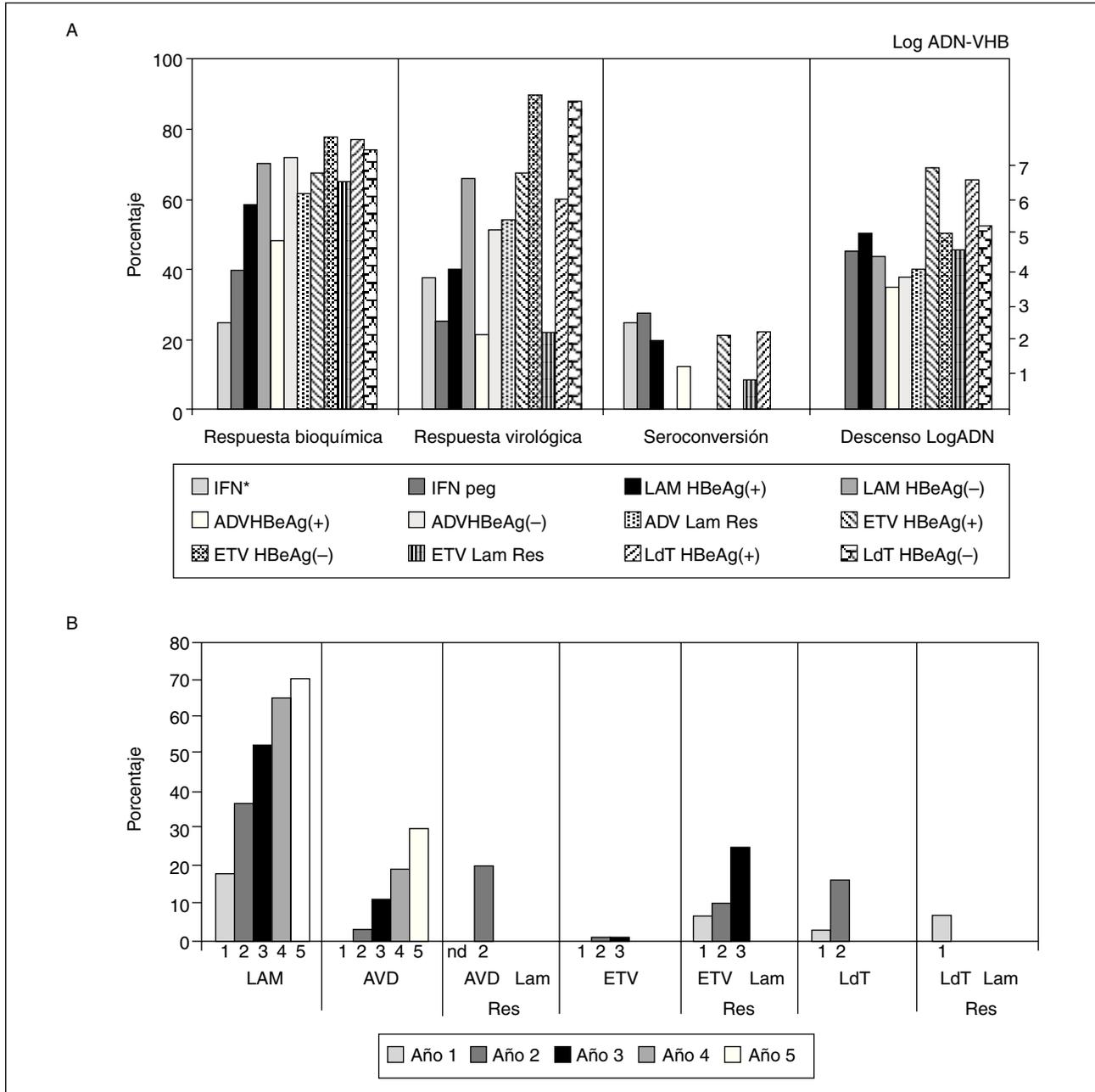


Fig. 1. A. Eficacia de los principales tratamientos de la infección por el virus de la hepatitis B (VHB) en pacientes con antígeno e de la hepatitis B (HBeAg) positivo o negativos, no tratados previamente o tras un tratamiento previo con lamivudina (LAM) y el desarrollo de resistencias a éste<sup>22,23,28</sup>. B. Proporción de resistencias detectadas en los diferentes tratamientos con análogos de nucleós(t)idos<sup>23</sup>. Hay que tener en cuenta que estas proporciones dependen de la población estudiada y de la sensibilidad del método utilizado para su detección. ADN: ácido desoxirribonucleico; ADV: adefovir-dipivoxil; ETV: entecavir; IFN: interferón; LdT: telbivudina; peg: pegilado.

## RESISTENCIAS A TRATAMIENTOS ANTIVIRALES

Se han reportado sustituciones de aminoácidos en la RT del VHB asociadas a la resistencia a los tratamientos con AN utilizados como inhibidores de esta enzima. Éste es el principal problema de estos tratamientos, pero no del IFN o el IFN pegilado. La probabilidad de selección de estas variantes depende del tipo de tratamiento (AN), nivel sé-

rico de ADN del VHB pretratamiento, rapidez de la supresión viral, tratamientos previos (resistencias cruzadas), cumplimiento del tratamiento, potencia del fármaco y su barrera genética<sup>18</sup>. En la figura 1B se indican las proporciones de resistencias detectadas en los diferentes tratamientos con AN<sup>18</sup>, y en la figura 2 las principales variantes asociadas a éstas con resistencias y sus índices de resistencia, calculados mediante ensayos fenotípicos.

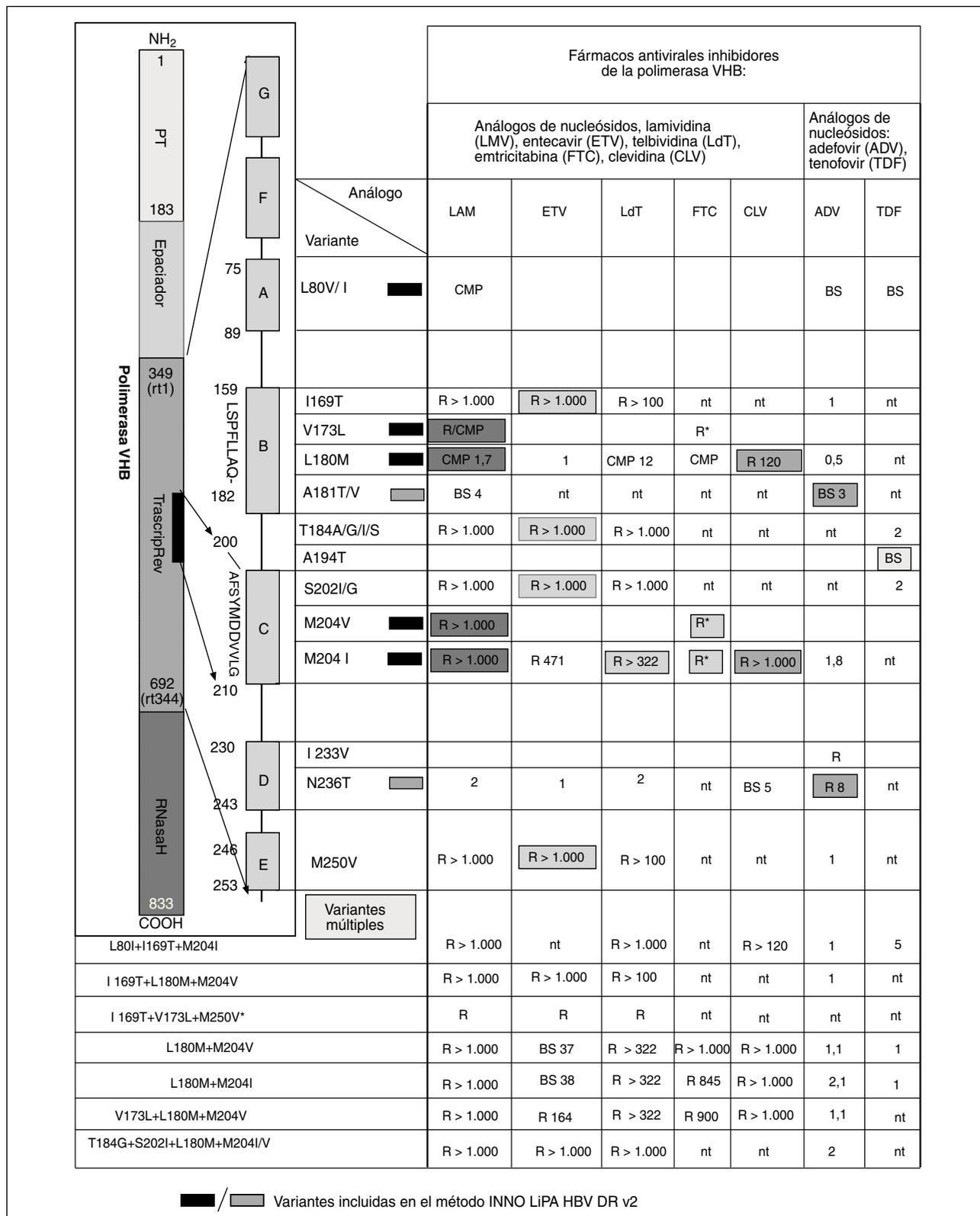


Fig. 2. Principales variantes asociadas con resistencias a diferentes tratamientos con análogos de nucleós(t)idos. Se indica su localización en los dominios A a G de la polimerasa viral, así como los índices de resistencia relativos a la forma sin mutar calculados mediante ensayos fenotípicos in vitro (IC50 de la variante mutada/IC50 de la variante sin mutar).

BS: variante con baja existencia al tratamiento; CMP: variante compensatoria (recuperación de la capacidad replicativa en presencia de variantes resistentes); nt: no testado; R: variante resistente al tratamiento; (\*): variante resistente en presencia de otras variantes, ver combinaciones de variantes en la parte inferior de la figura.

### Definiciones asociadas al estudio de resistencias antivirales<sup>20,21</sup>

En pacientes que cumplen el tratamiento se considera:

*Fallo primario al tratamiento (no respuesta).* Reducción del nivel sérico de ADN del VHB  $< 1 \log_{10}$  en U/ml, en los primeros 3<sup>21</sup> o 6<sup>20</sup> meses de tratamiento.

*Fallo secundario al tratamiento (rebote virológico).* Incremento de la actividad viral en  $> 1 \log_{10}$  del nivel sérico de ADN del VHB (en U/ml), sobre el valor más bajo obtenido durante el tratamiento (nadir) medido en 2 o más ocasiones consecutivas, separadas por 1 mes.

*Rebote bioquímico.* Reactivación de la actividad necroinflamatoria durante el tratamiento, definida como una elevación de los valores de ALT tras su normalización.

*Resistencia genotípica.* Detección durante el tratamiento antiviral de poblaciones virales con sustituciones de aminoácidos en la región de la RT del VHB, que se ha demostrado en ensayos fenotípicos que confieren resistencias al tratamiento. Se pueden detectar semanas o meses antes del rebote virológico, e incluso en pacientes sin este rebote.

*Resistencia fenotípica.* Descenso de susceptibilidad in vitro al tratamiento antiviral de una variante de la RT viral.

*Resistencia cruzada.* Descenso de susceptibilidad de una sustitución o combinación de sustituciones de aminoácidos a más de un tratamiento antiviral.

### Principales variantes del virus de la hepatitis B resistentes a tratamientos con análogos de nucleós(t)idos

Las más comunes son las sustituciones rtM204I y rtM204V, situadas en el motivo YMDD del dominio C de la RT. Son altamente resistentes al tratamiento con LAM (fig. 2) y se acompañan frecuentemente de mutaciones compensatorias (rt180M y/o rtV173L)<sup>22,23</sup>. La selección de variantes durante el tratamiento con LAM es muy frecuente, del 15-30% el primer año y hasta del 70% el quinto<sup>18</sup>. El tratamiento con ADV se asocia a una baja frecuencia de resistencias, del 0% el primer año, pero casi de un 30% al quinto, de las variantes rtN236T y rtA181V, probablemente por el bajo índice de resistencia de éstas<sup>18</sup>. Esta frecuencia aumenta en pacientes previamente resistentes a LAM (un 20% al segundo año). Las cepas virales resistentes a LAM son sensibles a ADV, y viceversa, las resistentes ADV son sensibles a LAM, lo que posibilita el rescate de pacientes resistentes a uno u otro tratamiento. En el caso de ETV, únicamente se han observado cepas resistentes con las variantes rtI169T, rtT184S, rtS202I o rtM250V junto a mutaciones resistentes a LAM<sup>22,23</sup>, con frecuencias muy inferiores a otros tratamientos (el 1, el 9 y el 17% al cabo de 1, 2 y 3 años, respectivamente)<sup>18</sup>. Las variantes resistentes a LAM suelen serlo también a otros tratamientos con AN como LdT o FTC (resistencias cruzadas). En el caso de LdT, la variante asociada a la resistencia es

rtM204I, con una frecuencia inferior a la LAM (un 5-11% el primer año frente al 15-30% de LAM)<sup>18</sup> (fig. 1B).

### Evidencias de la selección de resistencias al tratamiento antiviral y sus consecuencias clínicas

La resistencia antiviral (p. ej., selección de rtM204V/I en tratamiento con LAM) se manifiesta como un «rebote virológico» (fig. 3) con un nivel de ADN del VHB generalmente inferior al del pretratamiento. Esto se debe a que las variantes con mutaciones resistentes suelen tener menor efectividad replicativa que las formas sin mutar. Sin embargo, al prolongarse el tratamiento con AN, frecuentemente se seleccionan variantes con mutaciones compensatorias que restauran la capacidad replicativa, dando lugar a valores de ADN del VHB incluso superiores al pretratamiento (p. ej., en LAM, rtL80V/I, rtV173L y rtL180M compensan el déficit replicativo de rtM204V/I). Simultáneamente, o incluso meses después del fenómeno de reactivación viral o «rebote virológico», se puede observar un «rebote bioquímico» (p. ej., un 93% de resistencias a LAM)<sup>24</sup>. Los fenómenos de «rebote virológico» y «rebote bioquímico» se asocian con una pérdida de los beneficios (bioquímicos, serológicos e histológicos) del tratamiento, y un empeoramiento de la enfermedad hepática<sup>25</sup>. Estas consecuencias se han estudiado principalmente en tratamientos prolongados con LAM, en los que se ha observado descompensación hepática en el 40% de pacientes con resistencias a las 24 (rango 6-94) semanas de detectarse la variante resistente<sup>24</sup>. En general, en enfermedad compensada, las consecuencias son leves, como la disminución de la tasa de seroconversión a anti-HBe (el 12,5% con resistencias frente al 57,4% sin resistencias, a los 3 años de tratamiento)<sup>26</sup>, y una tendencia al empeoramiento de la lesión hepática<sup>24</sup>. Sin embargo, en pacientes con fibrosis avanzada o cirrosis, la emergencia de resistencia antivirales se asocia a episodios de descompensación clínica con insuficiencia hepática e incluso muerte (el riesgo de mortalidad de causa hepática es del 7% en pacientes con cepas resistentes y del 1% en los pacientes con la cepa sin mutar). En pacientes trasplantados, las cepas resistentes pueden provocar un empeoramiento de la función hepática, con la necesidad de trasplante y riesgo de muerte<sup>27</sup>. Teniendo en cuenta que la selección de la variante resistente o «resistencia genotípica» es anterior en el tiempo a los fenómenos de «rebote virológico» y «rebote bioquímico»<sup>24</sup> (la causa, selección de variante, es anterior al efecto, rebotes virológico y bioquímico), la detección temprana de la «resistencia genotípica» es esencial para rediseñar la estrategia terapéutica y prevenir los rebotes virológico y bioquímico y sus consecuencias clínicas negativas<sup>26,27</sup>. Esto se puede conseguir con un seguimiento óptimo de la respuesta durante el tratamiento, mediante los parámetros bioquímicos, serológicos y virológicos adecuados (ALT, HBeAg/antiHBe, ADN del VHB y ensayos de resistencias). La pauta de seguimiento debe basarse en las características propias de cada tratamiento: tipos, probabilidad de emergencia e índices de resistencia de las mutaciones seleccionadas y posibles resistencias cruzadas.

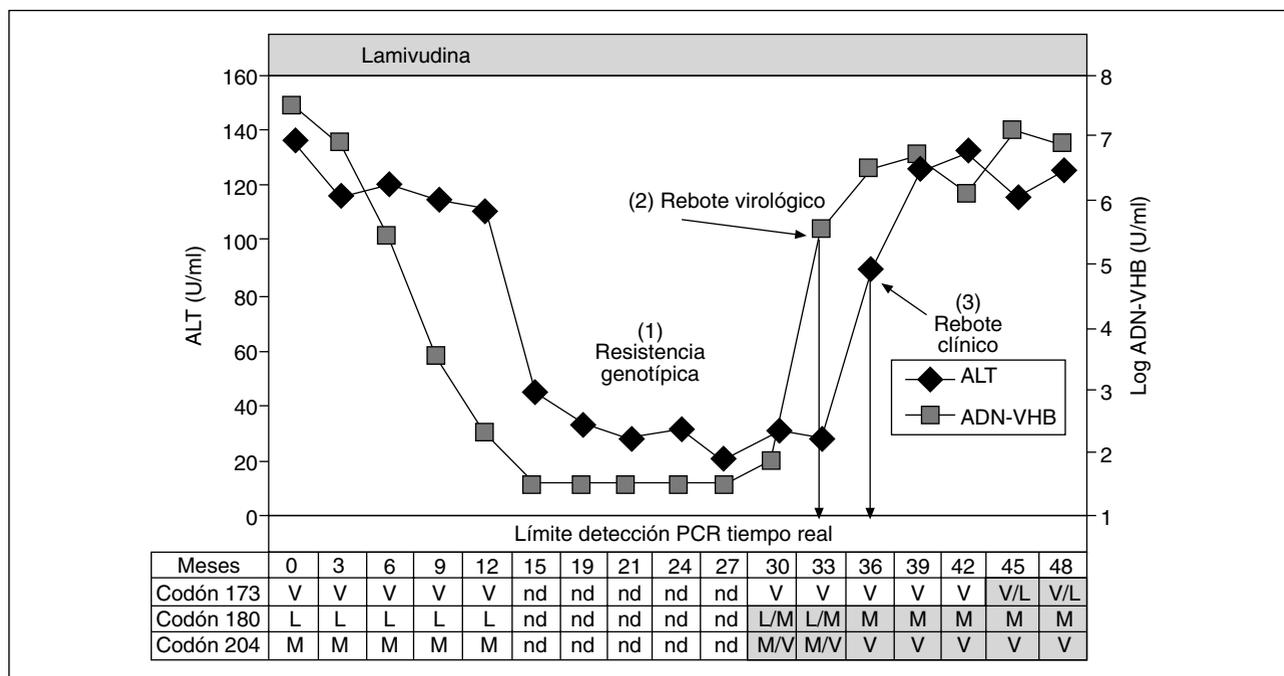


Fig. 3. Ejemplo de caso de infección crónica por el virus de la hepatitis B (HCB) tratado con lamivudina en el que se produce un fallo secundario a este tratamiento con la emergencia de variantes resistentes. En primer lugar, se observa la resistencia genotípica (variante rtL180L/M y rtM204M/V) (1), seguida del rebote virológico (aumento del ácido desoxirribonucleico [ADN]-virus de la hepatitis B [VHB]) (2) y el rebote bioquímico (aumento de los valores de alanina-aminotransferasa [ALT]) (3). PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

## SEGUIMIENTO DEL TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN CRÓNICA POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS B

Para valorar el éxito del tratamiento, se utilizan básicamente los mismos parámetros que para controlar el curso de la infección en ausencia de tratamiento antiviral: evaluación de la actividad necroinflamatoria de la infección mediante la determinación de los valores de ALT, de la posible resolución de la infección y la respuesta inmunitaria del huésped, mediante determinaciones serológicas (HBsAg, HBeAg/anti-HBe) y de la actividad y características de la cepa viral mediante determinaciones virológicas (ADN del VHB y quizás el genotipo viral al inicio del tratamiento). La posibilidad de selección de cepas virales resistentes durante el tratamiento con AN, con posibles consecuencias clínicas negativas, justifica la detección de estas variantes lo más tempranamente posible. Por este motivo, el estudio de estas resistencias se debe añadir a las determinaciones analíticas de seguimiento de la infección<sup>28</sup>.

### Principales parámetros analíticos en el seguimiento de la infección crónica. Metodologías e interpretación

#### Ensayos bioquímicos: ALT

La normalización de valores de ALT se considera como «respuesta bioquímica» al tratamiento, mientras que su elevación, en pacientes que cumplen el tratamiento, indi-

ca el aumento de la actividad necroinflamatoria hepática asociada a la selección de variantes resistentes. La aparición de episodios con «picos de ALT» es más común en casos con variantes resistentes y aumenta su frecuencia con el tiempo de permanencia de estas variantes. En ocasiones, estos episodios coinciden con elevaciones de la bilirrubina, hecho que no ocurre en pacientes con cepas salvajes<sup>29</sup>.

#### Ensayos serológicos

**HBsAg.** Principal marcador en el diagnóstico de la infección por el VHB, se encuentra tanto en partículas virales como en partículas no infecciosas, por lo que su presencia indica la producción de la envuelta viral, pero no replicación viral, siendo positivo en todos los portadores crónicos de la infección independientemente de la actividad de ésta. En el futuro su determinación cuantitativa podría ser útil en el seguimiento de tratamientos antivirales, debido a su correlación con el ADNccc hepático<sup>30</sup>. La negativización de HBsAg y la aparición de anticuerpos anti-HBs, aunque infrecuente (3-8% con IFN y < 2% con an)<sup>17</sup>, se considera como la respuesta completa al tratamiento.

**HBeAg y anti-HBe.** La detección del antígeno HBeAg puede indicar replicación viral activa, y su desaparición, con detección de anti-HBe (seroconversión), se asocia con la remisión bioquímica e histológica y una significativa supresión de la replicación viral. Sin embargo, hay una importante prevalencia de pacientes HBeAg negati-

vos con HCB<sup>31</sup> (con variantes pre-*core* o PBC). La aparición de anticuerpos anti-HBe se considera como respuesta virológica en pacientes HBeAg positivos, de forma que a los 4-12 meses de esta seroconversión y con ADN viral  $< 2 \times 10^4$  U/ml, se puede parar el tratamiento<sup>32,33</sup>. La probabilidad de aclaramiento de HBeAg depende del tratamiento aplicado, siendo mayor con IFN que con AN. La emergencia de resistencias a los AN es poco frecuente tras la seroconversión<sup>29</sup>.

### Ensayos virológicos

#### ADN del VHB

*Utilidad y significado de la determinación de ADN del VHB.* La cuantificación del ADN del VHB en sangre periférica es la técnica de referencia para controlar la actividad replicativa del VHB<sup>34</sup>. Su determinación se recomienda en todas las guías clínicas y documentos consenso<sup>16,35-37</sup> para la evaluación inicial y seguimiento de la HCB, especialmente ante la decisión de iniciar un tratamiento antiviral y en su seguimiento.

La presencia de ADN del VHB se asocia con un riesgo significativo de progresión de la infección crónica a CH y CHC, riesgo que se incrementa con el aumento de estos valores<sup>2</sup>. El ADN del VHB es detectable en la HCB, con valores que dependen de la fase de la enfermedad<sup>16,32</sup>, generalmente elevados en las fases de reactivación, aunque puede ser indetectable en las fases de latencia, dependiendo de la sensibilidad del ensayo utilizado. En todas las fases de la infección crónica se detectan ADN del VHB y ADNccc en tejido hepático<sup>38</sup>. No hay un consenso sobre el valor de ADN del VHB por debajo del cual se puede considerar la enfermedad como inactiva<sup>36,38</sup>. Sin embargo, en pacientes con HCB HBeAg positivo, se ha propuesto el valor de  $2 \times 10^4$  U/ml como indicativo de replicación viral activa, puesto que el 90% de estos pacientes tiene valores superiores a este índice, mientras que el 98% de los portadores inactivos de HBsAg tiene valores  $< 2 \times 10^3$  U/ml<sup>39</sup>. En pacientes con HCB HBeAg negativo, la medida del valor de ADN del VHB es el único indicador de actividad viral, y el 40-60% de estos pacientes con valores normales de ALT tienen cifras de ADN del VHB  $< 10^5$  U/ml. El comportamiento fluctuante de esta infección hace difícil distinguirla de los portadores inactivos; no obstante, un valor de ADN del VHB  $> 2 \times 10^3$  U/ml permite distinguir ambas situaciones con un valor predictivo del 90%<sup>39,40</sup>. Este valor se ha incluido en los algoritmos de seguimiento y decisión de tratamiento de la HCB<sup>16,33,35</sup>. Debido al perfil fluctuante habitual en la hepatitis crónica HBeAg negativa, la diferenciación entre actividad y no actividad de la infección debe establecerse a partir de determinaciones seriadas del ADN del VHB.

La decisión de iniciar un tratamiento antiviral se basa en la demostración de replicación viral activa, y se recomienda como criterio de tratamiento valores de ADN del VHB  $> 2 \times 10^4$  U/ml en HBeAg positivos y  $> 2 \times 10^3$  U/ml para HBeAg negativo, y la presencia de enfermedad moderada o grave, evidenciada por la elevación persisten-

te (de 3 a 6 meses) de los valores de ALT y/o la demostración histológica. En el caso de enfermedad avanzada (cirrosis compensada o descompensada), el tratamiento está indicado incluso con valores de ADN del VHB detectable, incluso  $< 2 \times 10^3$  U/ml<sup>14,16,35,36</sup>.

Una vez iniciado el tratamiento antiviral, la cuantificación del ADN del VHB es la base del control del tratamiento. La mayoría de las guías clínicas propone como principal objetivo terapéutico la supresión de la replicación viral (indetectabilidad del ADN del VHB). Se recomienda su determinación cada 3-6 meses, dependiendo del tratamiento y la situación clínica: cada 3 meses para pacientes con alta probabilidad de desarrollar resistencias (p. ej., tratamiento con LAM) o con enfermedad hepática avanzada y cada 6 meses en pacientes con baja probabilidad de desarrollar resistencias (p. ej., tratamiento con ADV o ETV) y enfermedad moderada<sup>14,28,35</sup>. Los pacientes no respondedores muestran cambios muy pequeños o nulos en el valor de ADN del VHB (fallo primario), mientras que, en respondedores, este valor se reduce significativamente, aunque no hay ningún acuerdo sobre el valor por debajo del cual se puede asegurar una respuesta virológica sostenida. El tratamiento con IFN tiene una duración limitada, pero ésta no se ha definido para los tratamientos con AN. En este sentido, se ha indicado que el ADN viral  $< 2 \times 10^4$  U/ml<sup>16,36</sup> o indetectable ( $< 40$  U/ml)<sup>35</sup> a los 4-12 meses de la seroconversión a anti-HBe permite discontinuar el tratamiento con AN en pacientes HBeAg positivos. En el caso de los pacientes HBeAg negativo por la probabilidad de reactivación no hay criterios para detener el tratamiento tras la respuesta virológica. La identificación de pacientes no respondedores mediante el descenso de la carga viral en un tiempo de tratamiento determinado (cinética viral), utilizada en la infección por el virus de la hepatitis C (VHC), no se aplica en la infección por VHB. Sin embargo, datos preliminares indican su posible aplicación futura<sup>41</sup>.

*Métodos de cuantificación de los valores de ADN del VHB.* La cuantificación de los valores de ADN del VHB (fig. 4) se basa en 2 metodologías: amplificación de la señal de detección tras la hibridación directa del ADN viral (bADN) y su amplificación por PCR. Los ensayos de última generación utilizan la PCR a tiempo real con sondas fluorescentes, de elevada sensibilidad, rango de detección muy amplio y excelente precisión, que mejoran significativamente esta determinación. Los métodos de primera generación, basados en tecnología de hibridación, daban resultados en pg/ml y, posteriormente, en copias de genoma VHB/ml. En la actualidad, los valores de ADN del VHB están referidos al estándar internacional de la Organización Mundial de la Salud y se expresan en unidades internacionales (U) con una equivalencia media de 1 U = 5,4 copias de genoma VHB (esta equivalencia depende de cada método)<sup>32</sup>. A pesar de la estandarización, se observan diferencias significativas en resultados obtenidos por varias técnicas, por lo que un paciente debe ser controlado con el mismo ensayo. Los rangos de detección varían considerablemente y, aunque ninguno de ellos cubre la totalidad de valores observados en la infección, los ensa-

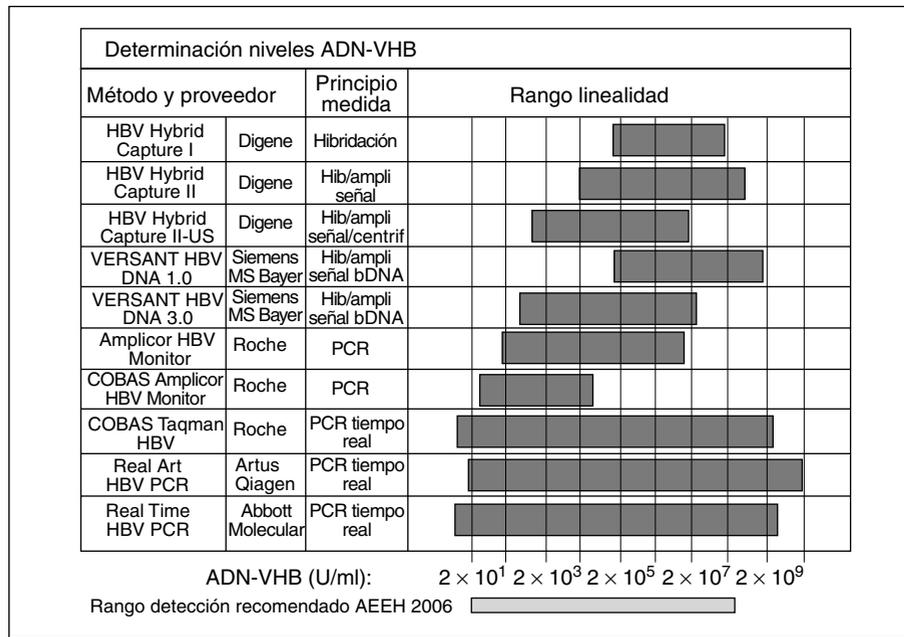


Fig. 4. Comparación de las diferentes técnicas de cuantificación de los valores de ácido desoxirribonucleico (ADN) del virus de la hepatitis B (VHB). En la parte inferior se indica el rango de detección recomendado por la conferencia consenso de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH)<sup>14</sup>.

yos de PCR a tiempo real son los de rango más amplio (p. ej.,  $20-10^8$  U/ml en COBAS Taqman) y permiten la mejor valoración de la replicación viral<sup>32</sup>. El genotipo viral puede influir en la cuantificación por PCR convencional (p. ej., COBAS Amplicor de Roche), pero no por PCR a tiempo real, ni con Hybrid Capture II; no hay datos del ensayo VERSANT HBV ADN 3.0<sup>32</sup>. Los métodos de hibridación presentan problemas de especificidad para valores de ADN del VHB cerca del límite de detección<sup>32</sup>. Diferencias de  $< 0,5$  logaritmos en los valores de ADN del VHB no son valorables, y pueden deberse a la variabilidad intrapaciente<sup>21</sup> o de la propia técnica de detección<sup>32</sup>.

Detección de variantes resistentes a tratamientos antivirales con análogos de los nucleós(t)idos. Ensayos genotípicos y fenotípicos

*Ensayos genotípicos.* Hay múltiples tecnologías para analizar la secuencia del genoma viral: secuenciación directa,

análisis de fragmentos de restricción (RFLP), hibridación inversa (LIPA), *microarrays* de ADN y espectrometría de masas MALDI-TOF<sup>32,42</sup>. Todas ellas permiten el estudio de variantes del VHB resistentes a tratamientos antivirales (resistencia genotípica). En la práctica, únicamente la secuenciación directa de fragmentos PCR (comercial o de diseño propio *in house*), RFLP e hibridación inversa con oligonucleótidos específicos fijados a un soporte sólido (LIPA), son aplicables al estudio sistemático de estas resistencias (tabla I)<sup>42</sup>. Todas ellas son muy sensibles (del orden de  $10^2$  U/ml), pero con diferente capacidad para detectar poblaciones mixtas (porcentaje de población minoritaria que puede detectarse). En este sentido, la hibridación inversa (INNO-LIPA HBV DR Innogenetics) es mejor que la secuenciación (el 5 frente al 10-20%). Sin embargo, la secuenciación es capaz de detectar cualquier variante, conocida o no, mientras que las técnicas de RFLP o LIPA sólo detectan las ya descritas, para las que hay patrones de restricción, en el caso de RFLP, o de sondas de oligonucleótidos, en el caso de LIPA<sup>42</sup>. Las técni-

TABLA I. Características de las diferentes técnicas de genotipado para el estudio de las variantes del virus de la hepatitis B (VHB) resistentes a tratamientos con análogos de nucleós(t)idos

Método genotipado	Proveedor	Sensibilidad (%) población	Información suministrada	Automatización	Complejidad interpretación
Secuenciación directa <i>in house</i>		$10^2$ U/ml	Alta (nuevas variantes)	Parcial	Alta
Secuenciación directa TRUGENE-HBV genotyping	Siemens MS-Bayer	$4 \times 10^2$ U/ml	Alta (nuevas variantes)	Alta	Baja (automática)
RFLP <i>in house</i>		$10^2$ U/ml	Baja (solo variantes con dianas restricción)	No	Media (visual)
LIPA HBV-DR v2	Innogenetics	$4 \times 10$ U/ml	Media (sólo variantes conocidas LAM, ADV)	Parcial	Baja (visual patrones bandas sencillos)

Modificada de Sablon y Saphiro<sup>42</sup>.

cas de RFLP no son recomendables para el trabajo sistemático por su complejidad y falta de estandarización. Hay 2 ensayos comerciales para estudiar las variantes resistentes a tratamientos con AN: TRUGENE HBV GENOTYPING™ (Siemens Medical Diagnostics Solutions), basado en la secuenciación directa de los productos de PCR de la región catalítica de la RT viral, y un método de hibridación inversa, INNO-LIPA HBV DR Innogenetics. La metodología TRUGENE automatiza el proceso de secuenciación y análisis de datos, reportando tanto las variantes de la polimerasa como el genotipo viral. La tecnología LIPA produce patrones de bandas de hibridación fácilmente interpretables por valoración visual, pero únicamente permiten detectar las principales variantes asociadas a los tratamientos con LAM y ADV. La hibridación inversa, más sensible para detectar subpoblaciones virales, facilita la detección de la resistencia genotípica más tempranamente que la secuenciación. Sin embargo, esta última permite detectar nuevas mutaciones asociadas a los tratamientos antivirales con AN recientemente comercializados (como ETV o TDF), así como otras variantes potencialmente resistentes o compensatorias (fig. 2). La especificidad de la hibridación está influida por la variabilidad de las secuencias vecinas a la mutación de interés, lo que dificulta el diseño de los ensayos LIPA<sup>42</sup>.

*Ensayos fenotípicos.* Permiten establecer la susceptibilidad in vitro a un tratamiento antiviral de variantes del VHB, por lo que se utilizan para caracterizar estas variantes como resistentes. Entre las estrategias existentes<sup>20,43,44</sup>, la más extendida consiste en la transfección de cultivos de líneas de hepatoma (HepG2 y Huh7) mediante vectores que contienen secuencias completas del VHB con las sustituciones que estudiar, obtenidas mediante amplificación por PCR del genoma completo del VHB proveniente de pacientes en los que se ha observado la resistencia al tratamiento<sup>44</sup>. Por su complejidad estos ensayos sólo se utilizan en centros muy especializados.

#### Determinación de los genotipos del virus de la hepatitis B

La asociación entre genotipo viral y eficiencia del tratamiento con IFN<sup>9</sup>, y posiblemente con AN<sup>11,45</sup>, hace prever la futura inclusión de esta determinación en el pretratamiento. Se estudia mediante metodologías análogas a las comentadas para las variantes resistentes. La técnica más adecuada es la secuenciación directa (p. ej., el método TRUGENE HBV Genotyping, utilizado para el estudio de variantes resistentes), pero también resulta la más compleja. También hay un ensayo LIPA (INNO-LIPA HBV Genotyping Assay, Innogenetics) que permite la genotipificación rápida de los 8 genotipos conocidos. Las técnicas de RFLP no detectan todos los genotipos<sup>6,7</sup>.

#### CONSIDERACIONES PRÁCTICAS PARA EL SEGUIMIENTO DEL TRATAMIENTO ANTIVIRAL

El seguimiento es necesario para estimar la respuesta al tratamiento antiviral de la infección por el VHB, a partir

del descenso de los valores de ADN viral, lo que permite el reconocimiento temprano del desarrollo de resistencias mediante el incremento de la carga viral tras una reducción inicial, o por la detección de mutaciones en la RT viral. Aunque no hay recomendaciones universales, la estrategia del seguimiento debe plantearse en función del fármaco o grupo de fármacos utilizados, del tipo de hepatitis B (HBeAg positivo o negativo) y del grado de deterioro de la enfermedad hepática. En todo caso, la valoración del tratamiento debe permitir la estimación de su eficacia mediante determinaciones seriadas de ADN del VHB, ALT y ensayos genotípicos para la detección de variantes virales resistentes, e incluir pruebas para valorar la seguridad del tratamiento<sup>28</sup>. En los pacientes HBeAg positivo, el objetivo del tratamiento es disminuir los valores de ADN del VHB, así como conseguir la seroconversión, por lo que en el seguimiento hay que realizar determinaciones seriadas del sistema HBeAg/anti-HBe.

La cuantificación de ADN del VHB debe realizarse antes del inicio del tratamiento, al menos en 2 muestras de suero consecutivas. Esto es importante en el caso de los pacientes anti-HBe positivo, debido a la fluctuación observada en los valores de ADN del VHB. La valoración de la respuesta primaria es importante, ya que un valor de ADN del VHB residual a los 6-12 meses de inicio del tratamiento antiviral está asociado a un riesgo de resistencia. Para evaluar la eficacia del tratamiento antiviral se recomienda realizar periódicamente determinaciones cuantitativas de ADN del VHB mediante un método que cubra en lo máximo posible el rango dinámico de viremia de la infección por el VHB, que detecte todos los genotipos, con sensibilidad del orden de 20 U/ml (unas 100 copias/ml) y una linealidad superior a 10<sup>8</sup> U/ml<sup>14</sup>. Estas condiciones actualmente sólo las cumplen los ensayos basados en la PCR a tiempo real. Para el seguimiento de un paciente se debe utilizar siempre el mismo método de determinación. Las variaciones < 0,5 log en la concentración de ADN del VHB en el mismo paciente no deben tenerse en cuenta, por la oscilación natural de la propia replicación viral o a la variabilidad del método.

En cuanto a la frecuencia adecuada de seguimiento de los parámetros virológicos, diferentes revisiones recientes indican la determinación de los valores de ADN del VHB cada 3 o 6 meses<sup>46</sup>, y cada 3 en enfermedad avanzada o tratamientos con alta frecuencia de mutaciones<sup>35</sup>. En cualquier caso, es necesaria la determinación de ADN del VHB basal y a los 3 meses de instaurar el tratamiento para estudiar la eficacia del tratamiento, y excluir el fallo primario de ésta<sup>21</sup>. Estas recomendaciones se recogen en el documento consenso de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH)<sup>14</sup>:

1. Pacientes con baja probabilidad de resistencia y enfermedad hepática leve: seguimiento semestral con ALT y cuantificación de ADN del VHB (p. ej., tratamientos con ADV o ETV).
2. Pacientes con alta probabilidad de resistencia (p. ej., en tratamiento con LMV) o enfermedad hepática avanzada: seguimiento trimestral con ALT y cuantificación de ADN del VHB.

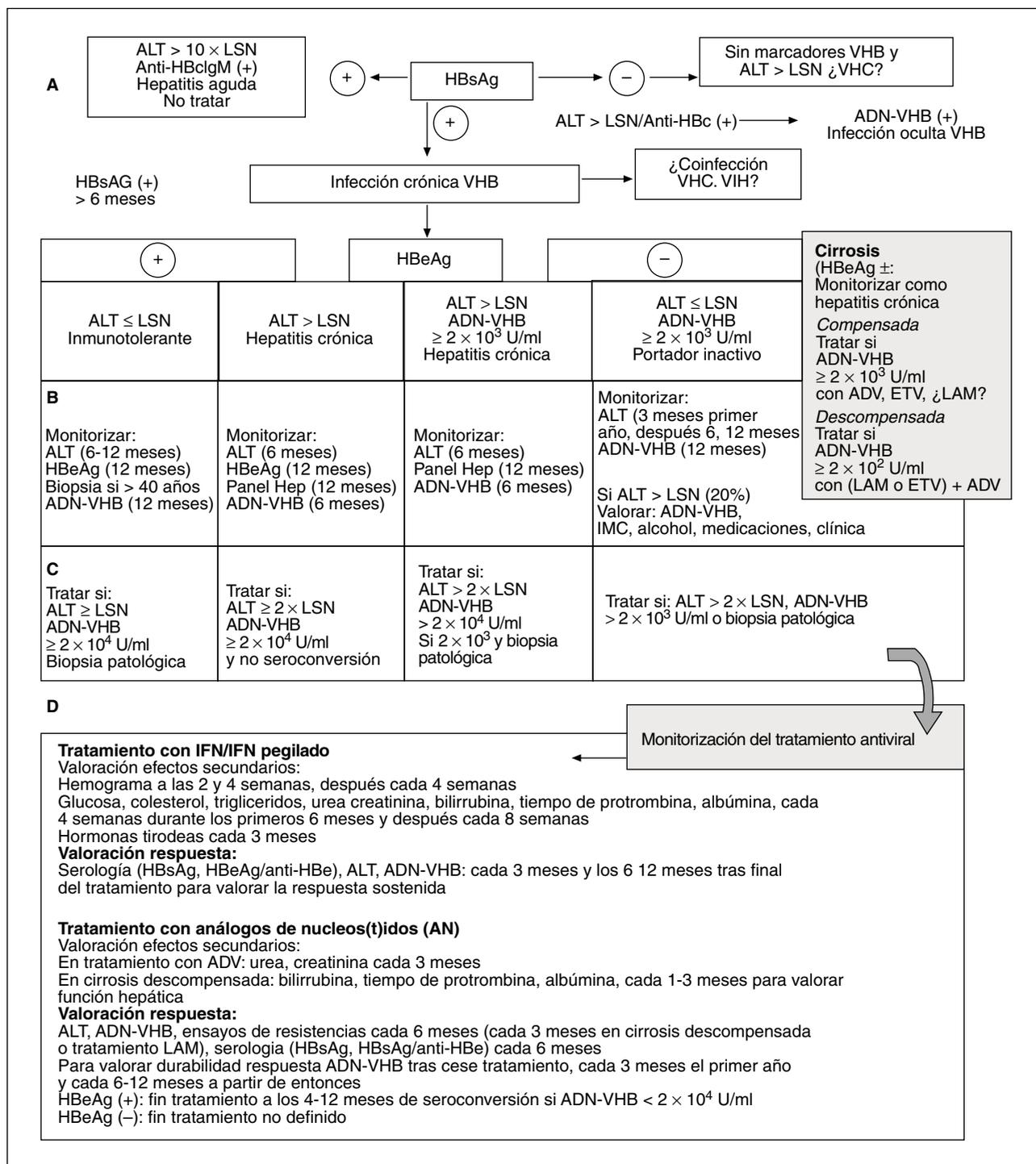


Fig. 5. Infección por el virus de la hepatitis B (VHB): posible algoritmo para el diagnóstico (A), seguimiento (B), indicación de tratamientos (C) y seguimiento de los éstos (D). Incluye las recomendaciones incluidas en las guías clínicas y las revisiones más recientes<sup>14,16-18,20-21,28,32-33,35-37</sup>. ADV: adefovir; AN: análogos de nucleos(t)idos; ETV: entecavir; IFN: interferón; IMC: índice masa corporal; LAM: lamivudina; LSN: límite superior del rango de normalidad; Panel Hep: pruebas analíticas de funcionalidad hepática<sup>28</sup>; peg: pegilado.

Estas recomendaciones no hacen referencia a la periodicidad de aplicación de las pruebas genotípicas de detección y caracterización de variantes resistentes. En este sentido, la falta de respuesta al tratamiento se inicia con la elevación aislada de ADN del VHB seguida de la elevación de

ALT, pero la selección de la variante resistente antecede al incremento significativo de la carga viral (rebrote virológico), y ésta a su vez antecede al incremento de valores de ALT (rebrote bioquímico). Teniendo en cuenta las graves consecuencias clínicas del incremento de la actividad,

el análisis de resistencias antivirales debe realizarse lo antes posible para conocer el patrón de mutación correspondiente, y proceder a los cambios pertinentes en la pauta de tratamiento y evitar los rebrotes virológico y bioquímico, así como sus consecuencias<sup>20</sup>. Por estos motivos, es recomendable incluir los ensayos genotípicos de detección de resistencia en la pauta de seguimiento recomendada por la AEEH<sup>14</sup>, incluso en ausencia de incrementos significativos de la carga viral o de los valores de ALT. Al tener en cuenta las frecuencias de emergencia de variantes resistentes en los diferentes tratamientos antivirales, el seguimiento de éstas mediante ensayos genotípicos, con las periodicidades indicadas por la AEEH<sup>14</sup>, asegura una probabilidad superior al 90% de su detección temprana.

Tras finalizar el tratamiento, y para controlar la respuesta sostenida, se recomienda la determinación de los valores de ADN viral junto a los de ALT y la serología HBeAg/anti-HBe cada 1-3 meses durante el primer año postratamiento, y cada 6-12 meses en los años posteriores. En el caso de no respondedores, para detectar respuestas tardías o la necesidad de reiniciar un tratamiento, se recomienda una determinación cada mes durante los 3 primeros postratamiento y, después, cada 6<sup>36,37</sup>.

El panel analítico básico de seguimiento del tratamiento antiviral, resultante de la inclusión de las determinaciones virológicas de los valores de ADN del VHB y ensayo genotípico de resistencias antivirales con las pautas indicadas (cada 3 meses para LAM y cada 6 meses en los demás), representa un incremento de coste anual del orden del 7% en todos los tratamientos con AN, con la excepción del caso de la LAM, en que puede ser del 30%. En cualquier caso, estos incrementos parecen asumibles, dada la importancia de la detección temprana de la emergencia de resistencias para evitar en lo posible las consecuencias negativas de ésta. En la figura 5 se muestra un posible algoritmo que incluye las recomendaciones en las guías clínicas y las revisiones más recientes para el seguimiento de la infección por el VHB, indicación de tratamientos y seguimiento de éstos<sup>14,16,18,20-21,28,32-33,35-37</sup>.

## BIBLIOGRAFÍA

- Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat*. 2004;11:97-107.
- Iloeje UH, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Cen CJ. Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load. *Gastroenterology*. 2006;130:678-86.
- Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000;64:51-68.
- Zhu Y, Yamamoto T, Cullen J, Saputelli J, Aldrich CE, Miller DS, et al. Kinetics of hepatitis B virus loss from the liver during inhibition of viral DNA synthesis. *J Virol*. 2001;75:311-22.
- Wai CT, Fontana RJ. Clinical significance of hepatitis B virus genotypes, variants and mutants. *Clin Liver Dis*. 2004;8:321-52.
- 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.
- Sanchez-Tapias JM, Costa J, Mas A, Bruguera M, Rodes J. Influence of hepatitis B virus genotypes on the long-term outcome of chronic B hepatitis in western patients. *Gastroenterology*. 2002;123:1848-56.
- 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.
- Janssen HLA, Van Zonneveld M, Senturk H, Zeuzem S, Akarca US, Cakaloglu Y, et al (for the HBV 99 -01 Study Group). Pegylated interferon alfa 2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomised trial. *Lancet*. 2005;365:123-9.
- Perrillo RP. Current treatment of chronic hepatitis B: benefits and limitations. *Seminars Liv Dis*. 2005;25 Suppl 2:20-8.
- Buti M, Elefsiniotis I, Jardí R, Vargas V, Rodríguez-Frías F, Schapper M, et al. Viral genotype and baseline load predict the response to adefovir treatment in lamivudine-resistant chronic hepatitis B patients. *J Hepatol*. 2007;47:366-72.
- Zoulim F. New insight on hepatitis B virus persistence from the study of intrahepatic viral cccDNA. *J Hepatol*. 2005;42:302-8.
- Revilla J, Pons F, Calleja JL. Resistencias al virus B y terapias combinadas. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007;7:7-24.
- Bruguera M, Bañares R, Córdoba J, Jardí R, González-Lahoz J, Ladero JM, et al. Documento consenso de la AEEH sobre el tratamiento de las infecciones por los virus de las hepatitis B y C. *Gastroenterol Hepatol*. 2006;29 Suppl 2:S216-S230.
- Hadziyannis S, Tassopoulos N, Chag TT, Heathcote J, Kitis G, Rizzetto M, et al. Long-term adefovir dipivoxil treatment induces regression of liver fibrosis in patients with HBeAg negative chronic hepatitis B: results after 5 years of therapy. *Hepatology*. 2005;42:754A.
- Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology*. 2007;45:507-39.
- Hoofnagle J, Doo E, Liang T, Fleischer R, Lok AS. Management of hepatitis B: Summary of a clinical research workshop. *Hepatology*. 2007;45:1057-75.
- Lok AS. Navigating the maze of hepatitis B virus treatments. *Gastroenterology*. 2007;132:1586-94.
- Hadziyannis S, Tassopoulos N, Heathcote J, Chag TT, Kitis G, Rizzetto M, et al. Adefovir Dipivoxil 438 Study Group. Long-term therapy with adefovir dipivoxil for HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med*. 2005;352:2673-81.
- Lok AS, Zoulim F, Locarnini S, Bartholomeusz A, Ghany M, Pawlosky J. Antiviral drug-resistant HBV: Standardization of nomenclature and assays and recommendations for management. *Hepatology*. 2007;46:254-65.
- Locarnini S, Hatzakis A, Heathcote J, Keeffe EB, Liang TJ, Multimer D, et al. Management of antiviral resistance in patients with chronic hepatitis B. *Antivir Ther*. 2004;9:679-93.
- Sheldon J, Rodes B, Zoulim F, Bartholomeusz A, Soriano V. Mutations affecting the replication capacity of the hepatitis B virus. *J Viral Hepat*. 2006;13:427-34.
- Baumert TF, Thimme R, Von Weizsäcker. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol*. 2007;13:82-90.
- Leung NW, 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.
- Lok AS, Lai CL, Leung N, Yao GB, Cui ZY, Schiff ER, et al. Long-term safety of lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology*. 2003;125:1714-22.
- Paik YH, Han KH, Hong SP, Lee HW, Lee KS, Kim SO, et al. The clinical impact of early detection of the YMDD mutant on the outcomes of long term lamivudine therapy in patients with chronic hepatitis B. *Antivir Ther*. 2006;11:447-55.
- Multimer D, Pillay D, Shields P, Cane P, Ratcliffe D, Martin B, et al. Outcome of lamivudine resistant hepatitis B virus infection in the liver transplant recipient. *Gut*. 2000;46:107-13.
- Suárez-García E. Monitorización del tratamiento y definición de la respuesta. *Gastroenterol Hepatol*. 2006;29 Suppl 2:23-6.
- Zoulim F. Virology of Hepatitis B: Capítulo 5 Management of antiviral resistance in clinical practice. Paris: Elsevier SAS; 2004. p. 61-71.
- 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.

31. Funk ML, Rosenberg DM, Lok ASF. World-wide epidemiology of HBeAg negative chronic hepatitis B and associated pre-core and core promoter variants. *J Viral Hepat.* 2002;9:52-61.
32. Valsamakis A. Molecular testing in the diagnosis and management of chronic hepatitis B. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20:426-39.
33. Osborn M, Lok AS. Antiviral options for the treatment of chronic hepatitis B. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57:1030-4.
34. 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.
35. Keeffe EB, Dieterich DT, Han SHB, Jacobson IM, Martin P, Schiff ER, et al. A treatment algorithm for the management of chronic hepatitis B virus infection in the United States: An update. *Clin Gastroenterol.* 2006;4:936-62.
36. European Association for the Study of the Liver. Proceeding of the European Association for the Study of the Liver (EASL). International Consensus Conference on Hepatitis B. September 14-16, 2002. Geneva, Switzerland. *J Hepatol.* 2003;39 Suppl 1:S1-S235.
37. Liaw YF, Leung N, Guan R, Lu K, Merican I, Mc Caughan G, et al. Asian-Pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B: a 2005 update. *Liver Int.* 2005;25:472-89.
38. Pawlotsky JM. Hepatitis B virus (HBV) DNA assays (methods AN practical use) and viral kinetics. *J Hepatol.* 2003;39:S31-S35.
39. Martinot-Peignoux M, Boyer N, Colombat M, Akreimi B, Pham BM, Ollivier S, et al. Serum hepatitis B DNA levels and liver histology in inactive HBsAg carriers. *J Hepatol.* 2002;36:543-6.
40. 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.
41. Van de Eijk AA, Niesters HG, Hansen BE, Heijtkink RA, Janssen HL, Schalm SW, et al. Quantitative HBV DNA levels as an early predictor of non response in chronic HBe antigen positive hepatitis B patients treated with interferon alfa. *J Viral Hepat.* 2006;13:96-103.
42. Sablon E, Saphiro F. Advances in Molecular Diagnosis of HBV infection and drug resistance. *Int J Med Sci.* 2005;2:8-16.
43. Zoulim F. In Vitro models for studying hepatitis B virus drug resistance. *Semin Liver Dis.* 2006;26:171-80.
44. Durantel D, Brunelle MN, Gros E, Carrouée-Durantel SD, Pichoud C, Villet S, et al. Resistance of human hepatitis B virus to reverse transcriptase inhibitors: from genotypic testing. *J Clin Virol.* 2005;34 Suppl 1:S34-S43.
45. Zollner B, Peteersen J, Puchhammer-Stockl E, Kletzmayer J, Sternecker M, Fischer L, et al. Viral features of lamivudine resistant hepatitis B genotypes A and D. *Hepatology.* 2004;39:42-50.
46. Tillman HL. Antiviral therapy and resistance with hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol.* 2007;13:125-40.