فراوانی موتانتهای طبیعی YMDD در بیماران مبتلا به هپاتیت مزمن B بدون سابقه درمان با لامیوودین

آمیتیس رمضانی [۱]، آرزو آقاخانی [۲*] ، محمد بنی فضل [۳]، محمدرضا حسنجانی روشن [۴]، لطیف گچکار [۵]،حسین کیوانی [۶] ،داوود یادگاری [۵] علی اسلامی فر [۲] و علی اکبرولایتی [۷]

۱. متخصص بیماریهای عفونی و گرمسیری، استادیار انستیتو پاستور ایران و محقق مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۲. پاتولوژیست، استادیار انستیتو پاستور ایران
۳. متخصص اطفال، انجمن حمایت از بیماران عفونی کشور
۴. متخصص بیماریهای عفونی وگرمسیری، دانشیاردانشگاه علوم پزشکی بابل
۵. متخصص بیماریهای عفونی وگرمسیری، استاد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری
۶. PhD ویروس شناسی، آزمایشگاه کیوان
۷. فوق تخصص بیماریهای عفونی اطفال، استاد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، بیمارستان مسیح دانشوری

* نشانی برای مکاتبه: تهران ،خیابان پاستور، انستیتو پاستور ایران،گروه تحقیقات بالینی ، تلفن:۶۶۴۶۵۱۴۷، فاکس،۶۶۴۰۹۴۶۷، aaghakhani@pasteur.ac.ir

دریافت مقاله: اسفند هشتاد و پنج پذیرش برای چاپ: خرداد هشتاد و شش

چکیده

سابقه و هدف: *لامیوودین (LAM) به طور گسترده جهت درمان بیماران مبتلا به هپاتیت مزمن B (CHB) به کار می رود. موتاسیونهای YMDD که موجب مقاومت به LAM می شوند پس از درمان طولانی مدت با LAMمشاهده می گردند. مطالعات اخیر نشان داده اند که موتاسیونهای YMDD می توانند به صورت یک تغییر ژنتیکی در بیماران CHB که تحت درمان با لامیوودین قرار نگرفته اند نیز دیده شوند. این مطالعه با هدف تعیین فراوانی موتانتهای طبیعی YMDD در بیماران CHB درمان نشده با لامیوودین انجام شد.*

روش کار: *در این تحقیق ۷۷ بیمار مبتلا به CHB بدون سابقه درمان با LAM مورد مطالعه قرار گرفتند. سرم این بیماران توسط روش polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)از نظر وجود wild-type YMDD motif mutants مورد بررسی قرار گرفت. در تمام بیماران آنزیمهای کبدی (AST,ALT) ، HBeAg و anti-HBe نیز آزمایش شدند.*

یافته ها: *از ۷۷ بیمار مورد مطالعه، ۷۳٪ مرد و ۲۷٪ زن با میانگین سنی ۹/۳ -/+ ۲۷/۴ سال بودند.میانگین ALT و AST بیماران به ترتیب IU/L ۷۳/۴ -/+ ۱۲۴/۴ و IU/L ۸۱ -/+ ۱۰۳/۱ بود.۴۰٪بیماران از نظر HBeAg و ۶۰٪آنها از نظر HBeAb مثبت بودند. در هیچیک از بیماران، wild-type YMDD motif mutants علی رغم میزان آنزیمهای کبدی و وجود یا عدم وجودHBeAg و anti-HBe یافت نگردید.*

نتیجه گیری: *اگرچه موتاسیونهای طبیعی YMDD در بیماران CHB که تحت درمان با لامیوودین قرار نگرفته اند، گزارش گردیده است، این موتاسیونها در بیماران CHB ایرانی درمان نشده با LAM مشاهده نگردید.*

واژگان کلیدی: *هپاتیت مزمنB (CHB)،لامیوودین (LAM)، polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)، موتانتهای YMDD*

مقدمه

هپاتیت B یکی از شایعترین بیماریهای عفونی در جهان است. بیش از ۳۵۰ میلیون بیمار آلوده به هپاتیت مزمن B در خطر توسعه سیروز کبدی یا کارسینوم هپاتوسلولار هستند(۱). شیوع کلی هپاتیت مزمن B (CHB) در جهان متغیر بوده و از میزان بالا (حدود ۸٪ در آفریقا، آسیا و پاسیفیک غربی) تا متوسط(۲-۷٪ در جنوب و شرق اروپا)و پائین(حدود ۲٪ در اروپای غربی، آمریکای شمالی و استرالیا) متغیر می باشد(۲).

لامیوودین(LAM) یک مهار کننده قوی DNA پلی مراز وابسته به RNA در ویروس هپاتیت Bاست که به طور موثر تکثیر ویروس هپاتیتB را سرکوب کرده، فعالیت بیماری را کاهش میدهد، هیستولوژی کبد را بهبود می بخشد و پیشرفت بیماری را به تاخیر می اندازد(۳،۴). مهمترین محدودیت بالینی لامیوودین انتخاب سریع موتانت های مقاوم به دارو می باشد که به مدت درمان بستگی دارد . موتانتهای مقاوم به LAM در ۱۴ تا ۳۲٪ بیماران، یکسال پس از درمان مشاهده می شود(۵،۶). با ادامه درمان این میزان به ۶۵٪ در ۵ سال می رسد(۷). HBV مقاوم به LAM در اثر موتاسیونهائی در YMDD motif در ژن پلی مراز ایجاد می گردد. موتاسیونهای اصلی جایگزینی متیونین در rtM204 (domain C) با ایزولوسین (rtM204I, YIDD variant) یا والین(rtM204V, YVDD variant) می باشد(۸،۹). rtM204V variant همیشه با موتاسیون اضافی rtL180M در domain B همراه است(۱۲-۱۰).

موتانتهایHBV دارای موتاسیون YMDD در بیماران آلوده به HBV که تحت درمان با LAM قرار نگرفته اند، گزارش شده است(۱۳،۱۴). ظهور زود هنگام این موتانتها نشاندهنده این حقیقت است که مقاومت به LAM از قبل از شروع درمان در کبد این بیماران وجود داشته است. این بدان معناست که سویه های موتاسیون یافته در جمعیت وجود داشته و لذا تعدادی از حاملین HBV و یا بیماران CHB در نقاط جغرافیائی مختلف ممکن است دارای این اشکال جهش یافته باشند(۱۵).

وجود اشکال مقاوم به داروی HBV قبل از درمان میتواند دلیلی برای انتخاب داروی جایگزین باشد. بنابراین آزمایش روتین مقاومت به دارو ممکن است در بیماران کاندیدای درمان مفید باشد(۱۵). برای قضاوت در این مورد اطلاع قبلی از شیوع این اشکال در جمعیت مورد نظر لازم می باشد. این مطالعه با هدف تعیین فراوانی موتانتهای طبیعی YMDD در بیماران CHB درمان نشده با لامیوودین در ایران انجام شده است.

روش کار

این مطالعه توصیفی- مقطعی بر روی۷۷ بیمار مبتلا به هپاتیت مزمن B فاقد سابقه مصرف لامیودین انجام شد. بیماران انتخاب شده بر اساس مندرجات پرونده فاقد عفونت هم زمان با HCV و HDV بوده و هپاتیت اتوایمیون و الکلی نداشته و بر مبنای گزارش آزمایشگاه فاقد آنتی بادی بر علیه HIV بودند.

در این مطالعه معیار تشخیص هپاتیت مزمن B یکی از دو شاخص مثبت بودن HBsAg به مدت بیش از ۶ ماه همراه با افزایش آنزیم های کبدی (ALT و AST) به میزان حداقل ۱/۵ برابر طبیعی یا مثبت بودن HBsAg به مدت بیش از ۶ ماه همراه با یافته های بیوپسی منطبق بر هپاتیت مزمن B در زمان انجام مطالعه بود.

پس ازاخذ رضایت نامه و تکمیل فرم اطلاعاتی شامل مشخصات دموگرافیک از تمام بیماران نمونه خون گرفته شد و آزمایشات ALT و AST انجام شد. HBeAg و anti-HBe نیز با روش ELISA با استفاده از کیتهای مربوطه (Radim, Spain) بررسی شدند.

بر روی نمونه خون بیماران آزمایش PCR به منظور مشخص نمودن ویرمی انجام شد و نمونه های Sensitive برای بررسی wild- type YMDD motif mutants تحت آزمایش با PCR-RFLP قرار گرفتند.

جهت استخراج DNA از ویروس از روش فنل-کلروفرم-ایزوامیل الکل استفاده شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سرم بیمار با ۱۵۰ میکرولیتر بافر TES حاوی ۱۵µl سدیم دودسیل سولفات (SDS) ۱۰٪ و ۲۰µl پروتئیناز K(۱۰ mg/ml) مخلوط گردید.سپس به مدت ۱ ساعت در حرارت ۶۰ درجه انکوبه گردید. پس از هضم توسط پروتئیناز K ،۱۰۰ میکرولیترفنل اشباع شده به آن افزوده و پس از مخلوط نمودن ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰rpm سانتریفوژ گردید. مایع رویی به میکروتیوپ جدیدی منتقل شده و هم حجم آن محلول کلروفرم و ایزوامیل الکل به نسبت ۲۴:۱ اضافه و مخلوط شد. سپس به مدت ۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰rpm سانتریفوژ گردید و مایع رویی جداگردیده و به نسبت ۷۰٪ حجم آن ایزوپروپانول و سپس استات سدیم ۳ مولار افزوده شد و ۲۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه قرار گرفت.سپس سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰rpmانجام گرفت و پس از تخلیه مایع رویی و خشک کردن کامل رسوب در دمای ۳۷ درجه رسوب خشک شده در ۳۰ میکرولیتربافر TE حل گردید. ۱۰ میکرولیتراز نمونه استخراج شده DNA جهت PCR استفاده شد.

جهت PCR از 20 mmol Tris (pH 8.3) 0.2 mmol KCl, 1.5 mmol MgCl2, 18 mmol NaCl, 0.2 mmol dNTPS, 0.5 µmol each primer, 2.5U Tag polymerase per 50µl of reaction استفاده شد. برنامه PCR شامل دناتوراسیون اولیه به مدت ۳ دقیقه در ۹۴درجه سانتی گراد، سپس ۳۵سیکل آمپلیفیکاسیون همراه با دناتوراسیون به مدت ۳۵ثانیه در ۹۴درجه سانتی گراد ،primer annealing به مدت ۵۰ ثانیه در ۵۶درجه سانتی گراد ، extension of primer به مدت ۵۰ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد و در نهایتfinal extension به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد بوده است.

برای هر نمونه بیمار ۳ PCR-RFLP جداگانه به شرح زیر انجام شد:

الف- قطعه ای۲۷۴ bp با استفاده از پرایمرهای(5'-AAA CCT TCG GAC GGA AAC TGC-3' P2) و P4 (5'-CTG GAT CCA GGG TTT AAA TGT ATA CCC-3')تکثیر گردیده و با انزیمI Fok هضم گردید که توالیهای wild-typeYMDD و YVDD variant را به قطعات ۱۴۳،۱۰۰و ۳۱bp برش داده و توالی YIDD را به قطعات ۲۴۳ و ۳۱bpبرش می دهد.

ب- قطعه ۱۸۱bpبا استفاده از پرایمرهای P6 (5'-CAG ACT TGG CCC CCA ATA CCA CAT CGT GCA-3')و P5(5'-TGG AAT TCA CCT GTA TTC CCA TCC CAT-3') تکثیر گردیده و با انزیم Alw441هضم گردید که توالی YVDD را به قطعات ۱۵۸ و ۲۳bp برش می دهد .

ج- قطعه ای ۱۳۸bp با استفاده از پرایمرهای P3(5'-TTT CCC CCA CTG TTT GGC TTT CAG TAA TAT-3')و P4(5'-CTG GAT CCA GGG TTT AAA TGT ATA CCC-3') ، تکثیر گردیده و باآنزیم SspIبرش داده شد که درتوالی YIDD ، قطعات ۱۳۸ و ۲۹bp ایجاد می گردد .

سپس محلهای برش آنزیمهای SspI و Alw441 به ترتیب به پرایمرهای P3 و P6 معرفی گردید(۱۶).

یافته ها با استفاده از نرم افزار SPSS 11.5 و آزمونهای آماری t و chi-square (یا تست دقیق فیشر) تجزیه و تحلیل شد و مرز معنی داری اختلافات روی $P < ۰/۰۵$ قرار داده شد. داده ها به صورت means ± standard deviations و در صورت لزوم عدد مطلق یا در صد گزارش شدند.

یافته ها

در این مطالعه ۷۷ بیمار مبتلا به هپاتیت مزمن B بررسی شدند. ۷۳٪ آنها مرد و ۲۷٪ آنها زن با میانگین سنی ۹/۳ -/+ ۲۷/۴ سال (حداقل ۱۱ و حداکثر ۵۰ سال)بودند. میانگین ALT و AST بیماران به ترتیب IU/L ۷۳/۴ -/+ ۱۲۴/۴ (حداقل ۲۸ و حداکثر ۵۰۰) IU/L ۸۱ -/+ ۱۰۳/۱ (حداقل ۲۲ و حداکثر ۵۰۰) بود. ۴۰٪بیماران از نظر HBeAg و ۶۰٪آنها از نظر HBeAb مثبت بودند.

تشخیص هپاتیت مزمن در ۴۶ نفر بر اساس بیوپسی کبدی و در بقیه بر اساس یافته های بالینی و آزمایشگاهی انجام گرفت. میانگین Knodal Score ،Grade وStage بافت بیوپسی شده به ترتیب ۲/۴-/+ ۵/۹ (حداقل ۲ و حداکثر ۱۳) ، ۲/۳ -/+ ۳/۶ (حداقل صفر و حداکثر ۹) و ۱/۱ -/+ ۱/۲ (حداقل صفر و حداکثر ۳) بود. از ۷۷ بیمار بررسی شده ۴۰ نفر (۵۲٪) دارای PCR مثبت بوده و ویرمی داشتند. در آزمایش RFLP این بیماران نشانی از wild-typeYMDD motif mutants دیده نشد.

بحث

درمان بیماران CHB با LAM در کاهش تکثیر HBV و طبیعی شدن میزان ALT موثر می باشد(۱۵). با این حال ظهور موتانتهای ویروسی مقاوم به درمان نگرانی اصلی در مصرف LAM می باشد(۱۷). میزان مقاومت بستگی به طول درمان داشته واز ۱۷٪ در یکسال تا۳۹٪ در سال دوم و ۵۷٪ در سال سوم متغیر است(۱۸،۱۹).HBV مقاوم به LAM در اثر موتاسیونهائی در YMDD motif در ژن پلی مراز ایجاد می گردد (۲۰،۲۱). شایعترین موتاسیونی که سبب مقاومت به LAM می شود در موتیف متیونین, تیروزین, اسپارتات, اسپارتات است که ناحیه فعال در ژن پلی مراز HBVمی باشد،جایی که متیونین در امینواسید ۲۰۴ با ایزولوسین یا والین rtM204I (or rtM204V)جایگزین می شود(۲۴-۲۲).

موتانتهای YMDD در عرض چند هفته بعد از درمان با LAM در کره جنوبی گزارش شده اند که نشان میدهد که این موتانتها ممکن است حتی قبل از درمان با LAM وجود داشته اند(۲۵). گزارشاتی از ظهور طبیعی موتانتهای مقاوم به درمان در بیماران CHB از ژاپن و فرانسه انتشار یافته است (۲۳،۲۶). برخی محققین گزارش کردند که سویه های جهش یافته YMDD در سرم بیماران CHB درمان نشده با LAM وجود دارند(۱۴،۲۳،۲۷). Yan و همکارانش نشان دادند که ۱۹ بیمار از ۱۱۰ بیمار CHB که با LAM درمان نشده بودند دارای موتاسیون YMDD بودند(۲۷). در مطالعه ای در اسپانیا گزارش شد که این موتانتها در ۴٪ حاملین مزمن هپاتیت B وجود دارند(۱۵). Fontaine و همکاران گزارش کردند که از ۱۸ بیمار ناقل بدون علامت هپاتیت B ۵ نفر دارای موتاسیون YMDD بوده اند(۲۸). در مطالعه ای در ژاپن این موتاسیونها در ۵ بیمار از ۱۸ بیمارCHBدرمان نشده یافت شدند(۲۳). به علاوه Zhang و همکارانش گزارش کردند که ۲۶/۲٪ از بیماران CHB تحت مطالعه آنها دارای موتاسیون YMDD بوده اند(۲۹). Matsuda این میزان را ۲۶/۹٪ در بیماران CHB گزارش کرد (۱۳).

از سوی دیگر در برخی مطالعات این موتانتها یافت نشده اند(۲۲). این واریانهای طبیعی به جز یک موردر عفونت حاد اولیه HBV در فرانسه(۲۶) و میزان ۴٪ در حاملینHBV در اسپانیا(۱۵) ،در سایر کشورهای اروپائی گزارش نشده اند . در مطالعه ای در چین نیز این موتانتها در هیچیک از بیماران CHB گزارش نگردیده اند(۳۰).

Kobayashi و همکارانش گزارش کردند که anti-HBeدر تمام بیماران دارای موتاسیون YMDD مثبت بوده است (۲۳).Ye و همکارانش نیزدریافتند که anti-HBe در اغلب بیماران دارای موتاسیون YMDD مثبت می باشد (۳۱). در مطالعه ای در چین میزان موتاسیون YMDD در بیماران HBeAg مثبت ۲۷/۱٪ و در بیماران HBeAg منفی و anti-HBe مثبت ۲۶/۷٪ گزارش گردید که اختلاف معنی داری بین دو گروه وجود نداشت(۳۲). Lee و همکارانش گزارش کردند در ۸ بیمار از ۱۲ بیمار HBeAg مثبت و در ۸ بیمار از ۱۶ بیمار HBeAg منفی موتاسیون YMDD قبل از درمان وجود دارد (۱۲).

درمطالعه ما در هیچیک از بیماران، wild-type YMDD motif mutants علی رغم میزان آنزیمهای کبدی و وجود یا عدم وجود HBeAg و anti-HBe یافت نگردید. این یافته با برخی مطالعات همخوانی نداشته (۲۳،۲۷،۲۸) ولی مشابه برخی مطالعات دیگر می باشد(۲۲،۳۰). بر اساس یافته های این مطالعه بنظر می رسد انجام تست روتین موتاسیون YMDD قبل از درمان بیماران هپاتیت B در ایران ضروری نباشد. یافت نشدن wild-type YMDD motif mutantsدر این بررسی، ممکن است به علت شرایط اپیدمیولوژیک و یا شرایط مطالعه مانند تعداد بیماران و یا روش مورد استفاده برای یافتن wild-type YMDD motif mutantsنیز باشد. از آنجا که موتانتهای YMDD قابلیت تکثیر پائینی داشته و تنها قسمت بسیار کوچکی از ژنوم HBV را اشغال می نمایند ، لذا روشهای بسیار حساس برای اثبات وجود آنها لازم می باشد(۱۹). RFLP غالبا در نمونه هائی که جمعیتهای ویروسی مختلف در آنها وجود دارند و یا در مورد ویروسهای با قدرت تکثیر پائین به خوبی عمل نمی نماید (۳۳).

نتیجه گیری

اگرچه موتاسیونهای طبیعی YMDD در بیماران CHB که تحت درمان با لامیوودین قرار نگرفته اند، گزارش گردیده است، این موتاسیونها در بیماران CHB ایرانی درمان نشده با LAM مشاهده نگردید. بنابر این به نظر می رسد انجام تست روتین موتاسیون YMDD قبل از درمان بیماران هپاتیت B در ایران ضروری نباشد. مطالعات بیشتر بر روی تعداد بیشتری از بیماران و با استفاده از روشهای حساستر لازم می باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی برای حمایت مالی از این تحقیق تشکر می نمایند.

REFERENCES

1. Lee WM. Hepatitis B virus infection. N Engl J Med 1997; 337: 1733-1745.

2. Maddrey WC. Hepatitis B--an important public health issue. Clin Lab. 2001; 47(1-2):51-5.

3. 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: 1714-1722.

4. Liaw YF Sung JJ, Chow WC, Farrell G, Lee CZ, Yuen H, et al .Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. N Engl J Med 2004; 351: 1521-1531.

5. Heathcote J. Treatment of HBe antigen-positive chronic hepatitis B. Semin Liver Dis 2003; 23: 69-80.

6. Hadziyannis SJ, Papatheodoridis GV, Vassilopoulos D. Treatment of HBeAg-negative chronic hepatitis B. Semin Liver Dis2003; 23: 81-88.

7. Wright TL. Clinical trial results and treatment resistance with lamivudine in hepatitis B. Semin Liver Dis 2004; 24 Suppl 1: 31-36.

8. 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; 27:1670-1677.

9. Tipples GA, Ma MM, Fischer KP, Bain VG, Kneteman NM, Tyrrell DL. Mutation in HBV RNA-dependent DNA polymerase confers resistance to lamivudine in vivo. Hepatology 1996; 24: 714-717.

10. Fu L, Cheng YC. Role of additional mutations outside the YMDD motif of hepatitis B virus polymerase in L (-) SddC (3TC) resistance. Biochem Pharmacol 1998; 55: 1567-1572.

11. Niesters HG, Honkoop P, Haagsma EB, de Man RA, Schalm SW, Osterhaus AD. Identification of more than one mutation in the hepatitis B virus polymerase gene arising during prolonged lamivudine treatment. J Infect Dis 1998; 177: 1382-1385.

12. Lee CZ, Lee HS, Huang GT, Yang PM, Sheu JC. Detection of YMDD mutation using mutant-specific primers in chronic hepatitis B patients before and after lamivudine treatment.World J Gastroenterol 2006 September 7; 12(33):5301-5305.

13. Matsuda M, Suzuki F, Suzuki Y, Tsubota A, Akuta N, Hosaka T, et al.YMDD mutants in patients with chronic hepatitis B before treatment are not selected by lamivudine. J Med Virol. 2004 Oct; 74(2):361-6.

14. Shin YM, Heo J, Kim GH, Kang DH, Song GA, Cho M, et al. Natural YMDD motif mutations of HBV polymerase in the chronic hepatitis B virus infected patients. Taehan Kan Hakhoe Chi. 2003 Mar;9(1):1-9.

15. Leon P, Pozo F, Echevarria JM. Detection of hepatitis B virus variants resistant to lamivudine and famciclovir among randomly selected chronic carriers from Spain. Enferm Infecc MicrobiolEnferm Infecc Microbiol Clin. 2004 Mar; 22(3):133-7.

16. Yang DH, Liang WF, Xie YJ, Zhao NF and Fan J. PCR restriction fragment length polymorphism in detection of YMDD variants of viral polymerase in hepatitis B virus patients treated with lamivudine .Hepatobiliary Pancreat Dis Int 2002 May ;1:232-7.

17. Chayama K, Suzuki Y, Kobayashi M, Tsubuta A, Hashimoto M, Miyano Y, et al. Emergence and take over of YMDD motif mutant hepatitis B virus during long term lamivudine therapy and re-takeover by wild type after cessation of therapy. Hepatology 1998; 27: 1711-6.

18. Leung NW, Lai CL, Chang TT, Guan R, Lee CM, Ng KY, et al. On behalf of the Asian Lamivudine study group. Extended lamivudine treatment with chronic hepatitis B enhances hepatitis B e antigen seroconversion rates: results after 3 years therapy. Hepatology 2001; 33:1527-32.

19. Heo J, Cho M, Kim HH, Shin YM, Jang HJ, Park HK, et al. Detection of YMDD motif mutants by oligonucleotide chips in lamivudine-untreated patients with chronic hepatitis B virus infection.J Korean Med Sci. 2004 Aug; 19(4):541-6.

20. Allen MI., Gauthier J., DesLauriers M., Bourne EJ., Carrick KM., Baldanti F., et al.. Two sensitive PCR-based methods for detection of hepatitis B virus variants associated with reduced susceptibility to lamivudine. J.Clin.Microbiol 1999; 37:3338-3347.

21. Chayama K, Suzuki Y, Kobayashi M, Kobayashi M, Tsubota A, Hashimoto M, et al. Emergence and takeover of YMDD motif mutant hepatitis B virus during long-term lamivudine therapy and re-takeover by wild type after cessation of therapy. Hepatology1998; 27:1711-1716.

22. Kirishima T, Okanoue T, Daimon Y, Itoh Y, Nakamura H, Morita A, et al. Detection of YMDD mutant using a novel sensitive method in chronic liver disease type B patients before and during lamivudine treatment. J. Hepatol. 2002. 37:259-265.

23. Kobayashi S, Ide T, and Sata M. Detection of YMDD motif mutations in some lamivudine-untreated asymptomatic hepatitis B virus carriers. J. Hepatol. 2001; 34:584-586.

24. Hyunjung J, Mong C, Jeong H, Hyunghoi K, Hongki J Woowon S, et al. Oligonucleotide Chip for Detection of Lamivudine-Resistant Hepatitis B Virus. J Clin Microbiol. 2004 September; 42(9): 4181–4188.

25. Paik YH, Chung HY, Ryu WS, Lee KS, Lee JS, Kim JH, et al. Emergence of YMDD motif mutant of hepatitis B virus during short-term lamivudine therapy in South Korea. J Hepatol. 2001 Jul; 35(1):92-8.

26. Thibault V, Aubron-Olivier C, Agut H, Katlama C. Primary infection with a lamivudine-resistant hepatitis B virus. AIDS 2002; 16:131-3.

27. Yan MH, Zhang C, Ling Q, Zhou RF. Detection of YMDD motif mutations in lamivudine-untreated patients with chronic hepatitis B. Zhonghua GanzangbingZazhi2003;11:430-431.

28. Fontaine H, Thiers V, Chretien Y, Zylberberg H, Poupon RE, Brechot C, et al. HBV genotypic resistance to lamivudine in kidney recipients and hemodialyzed patients. Transplantation 2000; 69: 2090-2094.

29. Zhang XH, Zhang YX, Sun LR, Wen Q, Zhou LQ, Fan GX, et al. Study of gene chips in the detection of YMDD mutations in the region of HBV polymeras.ZhonghuaYixueZazhi2003;83:459-462.

30. Zhang X, Liu C, Gong Q, Zhang S, Zhang D, Lu Z, Wang Y .Evolution of wild type and mutants of the YMDD motif of hepatitis B virus polymerase during lamivudine therapy. J Gastroenterol Hepatol. 2003 Dec; 18(12):1353-7.

31. Ye XG, Wang RL, Guo HB. Detection and analysis of YMDD mutate genes in patients of chronic hepatitis B before being treated. Zhonghua Jianyan Yixue Zazhi 2002; 25: 248.

32. Huang ZM, Huang QW, Qin YQ, He YZ, Qin HJ, Zhou YN, et al. YMDD mutations in patients with chronic hepatitis B untreated with antiviral medicines World J Gastroenterol 2005 February 14 ;11(6):867-870.

33. Ou ZY, Liu N, Chen CJ, Cheng G, and He YS. Rapid and Accurate Genotyping of YMDD Motif Variants in the Hepatitis B Virus Genome by an Improved Reverse Dot Blot Method. Journal of Clinical Microbiology, 2005 November; 43(11). 5685-5689.