

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

آمیثیس رضانی<sup>۱</sup>، آرزو آقاخانی<sup>۲\*</sup>، محمد بنی فضل<sup>۳</sup>، محمدرضا حسنجانی روشن<sup>۴</sup>، لطیف گچکار<sup>۵</sup>، حسین کیوانی<sup>۶</sup>، داوود یادگاری<sup>۵</sup> علی اسلامی فرآ و علی اکبرولایتی<sup>۷</sup>

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 و گرمسیری، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی بابل
  ۵. متخصص بیماری‌های عفونی و گرمسیری، استاد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری
  ۶. PhD ویروس‌شناسی، 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 می‌رود. موتاسیون‌های YMDD که موجب مقاومت به LAM می‌شوند پس از درمان طولانی مدت با LAM مشاهده می‌گردند. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که موتاسیون‌های YMDD می‌توانند به صورت یک تغییر ژنتیکی در بیماران CHB که تحت درمان با لامیوودین قرار نگرفته‌اند 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 (PCR-RFLP) *polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism* 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.

**یافته‌ها:** 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 ۷۳/۴ IU/L +/- ۱۲۴/۴ و ۸۱ IU/L +/- 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* علی‌رغم میزان آنزیم‌های کبدی و وجود یا عدم وجود HBeAg و anti-HBe یافت نگردید.

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

**واژگان کلیدی:** هپاتیت مزمن B (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 مرز وابسته به RNA در ویروس هپاتیت B است که به طور موثر تکثیر ویروس هپاتیت B 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 موتاسیون‌هایی در YMDD motif در ژن پلی مرز 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 (۱۰-۱۲).

موتانت‌های HBV 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 جغرافیایی 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 روی ۷۷ بیمار مبتلا به هپاتیت مزمن B فاقد سابقه مصرف لامیوودین 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 از اخذ رضایت نامه و تکمیل فرم اطلاعاتی شامل مشخصات دموگرافیک از تمام بیماران نمونه خون گرفته شد و آزمایشات ALT و AST انجام شد.

anti-HBe و HBeAg نیز با روش ELISA با استفاده از کیت‌های مربوطه (Radim, Spain) بررسی شدند.

بر روی نمونه خون بیماران آزمایش PCR به منظور مشخص نمودن ویرومی 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-کلروفورم-ایزوامیل الکل استفاده شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سرم بیمار با ۱۵۰ میکرولیتر بافر TES حاوی ۱۵ μl سدیم دودسیل سولفات (SDS) (۱۰٪ و ۱۲۰ μl 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 میکرولیتر فنل اشباع شده به آن افزوده و پس از مخلوط نمودن ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. مایع رویی به میکروتیوب جدیدی منتقل شده و هم حجم آن محلول کلروفورم و ایزوامیل الکل به نسبت ۱:۲۴ اضافه و مخلوط شد. سپس به مدت ۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید و مایع رویی جدا گردید 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 ۱۳۰۰۰ rpm انجام گرفت و پس از تخلیه مایع رویی و خشک کردن کامل رسوب در دمای ۳۷ درجه رسوب خشک شده در ۳۰ میکرولیتر بافر TE حل گردید. ۱۰ میکرولیتر از 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 50 μl of reaction استفاده شد. برنامه PCR شامل دناتوراسیون اولیه به مدت ۳ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد، سپس ۳۵ سیکل آمپلیفیکاسیون همراه با دناتوراسیون به مدت ۳۵ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی گراد، primer annealing به مدت ۵۰ ثانیه در ۵۶ درجه سانتی گراد، extension of primer به مدت ۵۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد و در نهایت final 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 ای ۲۷۴ bp با استفاده از پرایمرهای (5'-AAA CCT TCG P4 (5'-CTG GAT CCA و P2 (GAC GGA AAC TGC-3' و (3'-GGG TTT AAA TGT ATA CCC-3') تکثیر گردید و با آنزیم Fok هضم گردید که توالیهای wild-type YMDD و YVDD variant را به قطعات ۱۴۳، ۱۰۰ و ۳۱ bp برش داده و توالی YIDD را به قطعات ۲۴۳ و ۳۱ bp برش می دهد.

ب- قطعه ۱۸۱ bp با استفاده از پرایمرهای (5'-CAG ACT TGG P6 (5'-TGG و P5 (CCC CCA ATA CCA CAT CGT GCA-3' و (3'-AAT TCA CCT GTA TTC CCA TCC CAT-3') تکثیر گردید و با آنزیم Alw441 هضم گردید که توالی YVDD را به قطعات ۱۵۸ و ۲۳ bp برش می دهد.

ج- قطعه ای ۱۳۸ bp با استفاده از پرایمرهای (5'-TTT CCC CCA P3 (5'-CTG و P4 (CTG TTT GGC TTT CAG TAA TAT-3' و (3'-GAT CCA GGG TTT AAA TGT ATA CCC-3') تکثیر گردید و با آنزیم SspI برش داده شد که در توالی YIDD، قطعات ۱۳۸ و ۲۹ bp 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  $P < 0.05$  قرار داده شد. داده ها به صورت  $\text{means} \pm \text{standard deviations}$  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 ۷۳/۴ IU/L +/- ۱۲۴/۴ ( حداقل ۲۸ و حداکثر ۵۰۰ IU/L ) و 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 Grade, Score و Stage 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 موتانت های ویروسی مقاوم به درمان نگرانی اصلی در مصرف LAM می باشد (۱۷). میزان مقاومت بستگی به طول درمان داشته و از ۱۷٪ در یکسال تا ۳۹٪ در سال دوم و ۵۷٪ در سال سوم متغیر است (۱۸، ۱۹). HBV مقاوم به LAM در اثر موتانت های YMDD motif در ژن پلی مرز ایجاد می گردد (۲۰، ۲۱). شایعترین موتانتی که سبب مقاومت به LAM می شود در موتیف متیونین، تیروزین، اسپاراتات، اسپاراتات است که ناحیه فعال در ژن پلی مرز HBV می باشد، جایی که متیونین در آمینواسید ۲۰۴ با ایزولوسین یا والین (rtM204I or rtM204V) جایگزین می شود (۲۴-۲۲).

موتانت های YMDD در عرض چند هفته بعد از درمان با LAM در کره جنوبی گزارش شده اند که نشان می دهد که این موتانتها ممکن است حتی قبل از درمان با LAM وجود داشته اند (۲۵). گزارشی از ظهور طبیعی موتانت های 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 موتانت های 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 موتانت های YMDD بوده اند (۲۸). در مطالعه ای در ژاپن این موتانتها در ۵ بیمار از ۱۸ بیمار CHB درمان نشده یافت شدند (۲۳). به علاوه Zhang و همکارانش گزارش کردند که ۲۶/۲٪ از بیماران CHB تحت مطالعه آنها دارای موتانت های 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 مورد در عفونت حاد اولیه HBV در فرانسه (۲۶) و میزان ۴٪ در حاملین HBV در اسپانیا (۱۵)، در سایر کشورهای اروپایی 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-HBe در تمام بیماران دارای موتانت های YMDD مثبت بوده است (۲۳). Ye و همکارانش نیز دریافتند که anti-HBe در اغلب بیماران دارای موتانت های YMDD مثبت می باشد (۳۱). در مطالعه ای در چین میزان موتانت های 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 موتانت های YMDD قبل از درمان وجود دارد (۱۲).

در مطالعه 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 موتانت های YMDD قبل از درمان بیماران هپاتیت B در ایران ضروری نباشد. یافت نشدن wild-type YMDD motif mutants در این بررسی، ممکن است به علت شرایط اپیدمیولوژیک و یا شرایط مطالعه مانند تعداد بیماران و یا روش مورد استفاده برای یافتن 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 غالباً در نمونه هایی که جمعیت های ویروسی مختلف در آنها وجود دارند و یا در مورد ویروسهای با قدرت تکثیر پائین به خوبی عمل نمی نماید (۳۳).

## نتیجه گیری

اگرچه موتانت های طبیعی YMDD در بیماران CHB که تحت درمان با لامیوودین قرار نگرفته اند، گزارش گردیده است، این موتانتها در بیماران CHB ایرانی درمان نشده با LAM مشاهده نگردید. بنابر این به نظر می رسد انجام تست روتین موتانت های 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 Dis* 2003; 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 Microbiol Enferm 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 takeover 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. *Hepatology* 1998; 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 GanzangbingZazhi* 2003; 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 polymerase. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2003; 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.