

ژنوتیپ ویروس هپاتیت B در بیماران مبتلا به کارسینوم کبد

رسول همکار^۱، نسترن زمانی^۲، آمیتیس رضائی^۳، علی اسلامی فر^۴، محمد بنی فضل^۵، معصومه صوفیان^۶، لادن ادیبی^۷، علیرضا سعادت^۸، نعمت ایرانی^۹، متین مهریار^{۱۰}، ژاله تائب^{۱۱}، زهرا دلجو دخت^{۱۲} و آرزو آقاخانی^{۱۳*}

۱. PhD ویروس شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲. دانشجوی فوق لیسانس، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم

۳. متخصص بیماریهای عفونی و گرمسیری، استادیار انستیتو پاستور ایران

۴. پاتولوژیست، استادیار انستیتو پاستور ایران

۵. متخصص اطفال، انجمن حمایت از بیماران عفونی کشور

۶. متخصص بیماریهای عفونی و گرمسیری، استادیار دانشگاه علوم پزشکی اراک

۷. فوق لیسانس ویروس شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۸. فوق تخصص هماتولوژی و انکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ...

۹. دانشجوی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ...

۱۰. پزشک عمومی، انستیتو پاستور ایران

۱۱. فوق لیسانس بیوشیمی، همتراز مربی انستیتو پاستور ایران

۱۲. کارشناس آزمایشگاه، انستیتو پاستور ایران

* نشانی برای مکاتبه: تهران، خیابان پاستور، انستیتو پاستور ایران، گروه تحقیقات بالینی، تلفن: ۶۶۴۶۵۱۴۷، نمابر ۶۶۴۶۵۱۴۷

aaghakhani@pasteur.ac.ir

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

چکیده

سابقه و هدف: عفونت با ویروس هپاتیت B (HBV) عامل اصلی کارسینوم سلول کبدی (HCC) می باشد. HBV شایعترین علت HCC در ایران در نظر گرفته می شود. هدف از این مطالعه تعیین ژنوتیپهای HBV در بیماران ایرانی مبتلا به HCC می باشد. **روش کار:** بلوکهای پارافینی ۴۰ بیمار (۳۱ مرد و ۹ زن) مبتلا به HCC در اثر HBV از مراکز درمانی مختلف جمع آوری شد. ژنوتیپ HBV بوسیله سکوانسینگ در نمونه ها تعیین گردید و درخت فیلوژنتیک ترسیم شد. **یافته ها:** آنالیز فیلوژنتیک نشان داد که ژنوتیپ کلیه ایزوله های HBV، ژنوتیپ D بود. **نتیجه گیری:** این مطالعه نشان داد که ژنوتیپ D تنها ژنوتیپ هپاتیت B در بیماران ایرانی مبتلا به HCC می باشد. **واژگان کلیدی:** ویروس هپاتیت B (HBV)، کارسینوم سلول کبد (HCC)، ژنوتیپ

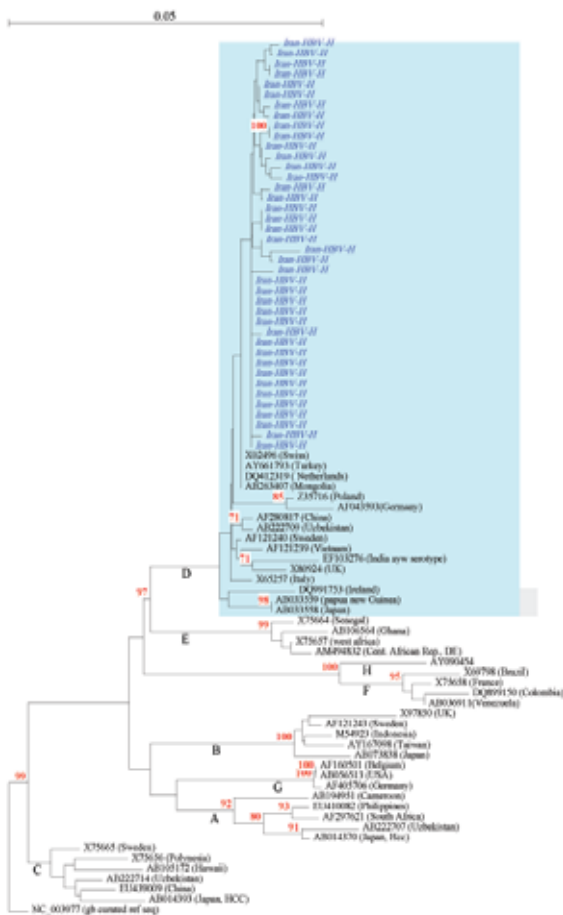
مقدمه

اختلاف بیش از ۸٪ در ژنوم کامل HBV ها مشخص می گردند (۷-۵). ژنوتیپ های مختلف HBV توزیع جغرافیایی متفاوتی دارند (۱۲-۸). نوטיפ A عمدتاً در امریکای شمالی، شمال اروپا، هند و آفریقا دیده می شود. نوטיפ B و C در آسیا به ویژه آسیای جنوب شرقی و خاور دور، نوטיפ D در جنوب اروپا، خاور میانه، مدیترانه و هند، نوטיפ E در آفریقای غربی و جنوبی، نوטיפ F در امریکای جنوبی و مرکزی و نوטיפ G در ایالت متحده و اروپا شایعترند (۱۳-۱۷). نوטיפ H اخیراً در امریکای مرکزی و کالیفرنیا مشخص شده است (۱۸). تاثیرات ژنوتیپهای مختلف HBV در ایجاد تظاهرات بالینی، شدت این تظاهرات و پاسخ به درمان شناخته شده (۲۴-۱۹) و در کشورهای مختلف در جهت تعیین این ژنوتیپها در شکلهای مختلف بالینی تلاشهای عمده ای صورت گرفته است.

عفونت با ویروس هپاتیت B (HBV) یکی از مشکلات بهداشت عمومی در سراسر جهان و عامل اصلی هپاتیت مزمن، سیروز و کارسینوم سلول کبدی (HCC) می باشد. تخمین زده می شود که حدود دو بلیون نفر شواهد سرولوژیک آلودگی قدیمی یا فعلی با HBV را داشته باشند. بیش از ۳۵۰ میلیون نفر حامل مزمن HBV می باشند و ۷۵٪ این حاملین مزمن در آسیا و غرب اقیانوس آرام زندگی می کنند (۱ و ۲). گزارش شده که ۴۰-۱۵٪ افراد آلوده به HBV به سمت سیروز، نارسایی کبدی و HCC پیش میروند و سالانه ۵۰۰۰۰ تا ۱/۲ میلیون نفر جان خود را در اثر عفونت با HBV از دست می دهند (۳، ۴). سکوانسینگ DNA در ایزوله های HBV، هشت ژنوتیپ مختلف که از A تا H نامگذاری شده اند را نشان می دهد. این ژنوتیپ ها بر اساس وجود

یافته ها

در این مطالعه ۴۰ بیمار مبتلا به HCC، HBsAg مثبت از نظر ژنوتیپ های HBV بررسی شدند. ۷۷٪ از بیماران مرد و ۲۲٪ زن بودند. سن متوسط بیماران در زمان تشخیص ۵۹/۲۵ (محدوده ۸۷-۱۸ سال) سال بود. ژنوتیپ ایزوله های HBV جدا شده از کلیه بیماران مبتلا به HCC، ژنوتیپ D بود. شکل ۱ درخت فیلوژنتیک ترسیم شده با استفاده از روش neighbor-joining با برنامه TREECON از ایزوله های HBV جدا شده از بیماران ایرانی مبتلا به HCC را نشان می دهد.



شکل ۱: درخت فیلوژنتیک ترسیم شده با استفاده از روش neighbor-joining با برنامه TREECON از ایزوله های HBV جدا شده از بیماران ایرانی مبتلا به HCC. ایزوله های مربوط به ایران با Iran-HBV-H نشان داده شده اند.

بحث

HBV عضوی از خانواده هپادناوایروس ها می باشد، که امروزه بر اساس مقایسه کل توالیهای ژنومیک به هشت ژنوتیپ که از A تا H نامگذاری شده اند، تقسیم می گردد (۱۳ و ۱۴). آلودگی با این ویروس موجب طیف وسیعی از تظاهرات بالینی از ناقل بدون علامت، هیپاتیت مزمن، سیروز و سرطان کبد می گردد (۲۵).

ژنوتیپهای HBV توزیع جغرافیایی متفاوتی دارند (۱۲-۸). این امکان وجود دارد که ژنوتیپ های مختلف با شدت های متفاوت بیماری همراه باشند (۱۸).

کارسینوم سلول کبد (HCC) شایعترین بدخیمی اولیه کبد می باشد که سالانه موجب یک میلیون مرگ در سراسر جهان می گردد (۲۵). در ایران ۸۰٪ موارد HCC برای حداقل یکی از نشانگرهای HBV مثبت بوده و HBV شایعترین علت HCC در ایران در نظر گرفته می شود (۲۶). امروزه بر نقش ژنوتیپ های مختلف HBV در پیشرفت بیماران آلوده به این ویروس به سمت HCC تاکید شده و مطالعات مختلفی در این مورد صورت می گیرد. هدف از این مطالعه تعیین ژنوتیپهای HBV در بیماران ایرانی مبتلا به HCC می باشد.

روش کار

این مطالعه به صورت توصیفی مقطعی بر روی ۴۰ بیمار مبتلا به HCC، HBsAg مثبت صورت گرفته است. بلوکهای پارافینی این بیماران از مراکز درمانی مختلف جمع آوری شده و پرونده آنها از نظر anti-HbsAg، anti-HIV، HCV و anti-HIV بررسی گردید. بیمارانی که از نظر HBsAg مثبت بوده ولی anti-HIV و anti-HCV آنها منفی بودند وارد مطالعه شدند. بلوکهای این بیماران برش داده شد و لامهای تهیه شده برای تعیین بهترین بلوک از نظر وضوح HCC و عدم وجود نکروز، توسط پاتولوژیست بررسی گردیدند و بلوکهای انتخاب شده جهت استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفتند. برشهای ۵ تا ۱۰ میکرومتر از بلوکهای انتخاب شده جهت استخراج DNA تهیه شد. سپس این برشها توسط گزبلول دیپارافینه شدند. DNA با روش فنل/کلروفرم از نمونه ها استخراج گردید. کیفیت DNA توسط PCR با استفاده از پرایمرهای PCO3/PCO4 که یک قطعه ۱۱۰-bp از محصول ژن بتا گلوبین انسانی را تکثیر می نمایند مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس روی نمونه های β-Globin مثبت با پرایمرهای 5'-GGGACACCATATTCTTGG-3' و PrS2-F و بعنوان S1-R: 5'-TTAGGGTTTAAATGTATACCCA-3' جهت پرایمرهای خارجی PCR انجام شد. محصول PCR فوق با پرایمرهای 5'-GCGGGGTTTTTCTTGTGTTGA-3' و YS1-F و YS2-R: 5'-GGGACTCAAGATGTTGTACAG-3' و Nested PCR مورد بررسی قرار گرفت. با روش Nested PCR یاد شده یک قطعه ۵۸۵bp از نوکلئوتید ۲۰۳ تا ۷۸۷ ژن S ویروس هیپاتیت B تکثیر داده می شود. سپس محصولات PCR توسط کیت تخلیص محصول PCR (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) خالص شده و برای تعیین توالی (سکوانسینگ) ارسال شدند. سکانس های بدست آمده بعد از ویرایش ابتدایی توسط برنامه Chromas در برنامه DNA Star و Bioedit و در مقایسه با سکانس پرایمرها مورد ویرایش قرار گرفتند. سپس بررسی مقایسه ای (Aligned) در مورد آنها و سکانسهای رفرنس دریافت شده از بانک ژن با استفاده از نرم افزار DNA Star و Bioedit و با روش CLUSTAL W انجام گردید. آنالیز فیلوژنتیک با استفاده از نرم افزار TREECON انجام شد. فواصل ژنتیکی با استفاده از روش matrix Kimura 2-parameter با برنامه TREECON برآورد شد و درخت فیلوژنتیک با استفاده از روش neighbor-joining با برنامه TREECON ترسیم شد. برای اثبات اعتبار درخت فیلوژنتیک bootstrap Resampling ۱۰۰۰ بار انجام گرفت.

بیماران در بین دو ژنوتیپ مشاهده نشد. در این مطالعه به این نتیجه رسیدند که ژنوتیپ C با میزان بالاتر HBeAg و پیشرفت سریعتر به سمت سیروز و HCC در مقایسه با ژنوتیپ B همراه می باشد ولی تفاوت واضحی بین پیش آگهی HCC در این دو ژنوتیپ مشاهده نمی شود (۳۰)

در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۳ در جنوب تایوان توسط Lee و همکارانش صورت گرفت ژنوتیپ C با فرمهای شدیدتر بیماری کبدی همراه بود (۳۱).

در بررسی که در پاکستان انجام گرفت ژنوتیپ D شایعترین ژنوتیپ در بیماران HCC بود و پس از آن ژنوتیپ A و ترکیب A/D قرار داشتند (۳۲). در مطالعه Abdo و همکاران در عربستان نیز شایعترین ژنوتیپ HBV در بیماران ژنوتیپ D گزارش شد (۳۳).

در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۵ در ایران بر روی ۲۶ بیمار هپاتیت مزمن انجام شده، تنها HBV ژنوتیپ D گزارش شده است (۳۴). در مطالعه دیگری که بر روی ۵ مورد ناقل مزمن هپاتیت B صورت گرفت نیز تنها ژنوتیپ D، ساب ژنوتیپ D1 گزارش شد (۳۵). در مطالعات دیگر نیز که در ایران انجام گرفته تنها ژنوتیپ HBV گزارش شده ژنوتیپ D بوده است (۳۸-۳۶).

در این مطالعه که ژنوتیپ HBV را در بیماران مبتلا به HCC تعیین می نماید، ژنوتیپ ایزوله های HBV بدست آمده ژنوتیپ D بود. این بررسی یافته های سایر مطالعات بر روی فرمهای دیگر بیماریهای ناشی از HBV در کشور (۳۸-۳۴) را که در آنها نیز تنها ژنوتیپ HBV گزارش شده، ژنوتیپ D بوده را تأیید می نماید. به نظر می رسد تمام فرمهای بیماریهای ناشی از HBV در کشور از ناقل بدون علامت تا کارسینوم کبد تنها توسط ژنوتیپ D ایجاد می شود که این امر می تواند بدلیل عوامل جغرافیایی و یا فاکتورهای خاص نژادی باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از انستیتو پاستور ایران برای حمایت مالی از این تحقیق و قایان دکتر سید محمد توانگر، دکتر پورحیاط و دکتر اکبری برای همکاری در تهیه نمونه ها تشکر می نمایند.

در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۱ توسط Orito و همکارانش در ژاپن صورت گرفت، در ۷۲۰ بیمار آلوده به HBV که در آنها ژنوتایپینگ صورت گرفت ۱/۱۷٪ ژنوتیپ A، ۱۲/۲٪ ژنوتیپ B، ۸۴/۷٪ ژنوتیپ C، ۰/۴٪ ژنوتیپ D و ۱٪ دارای ژنوتیپ ترکیبی بوده اند. این مطالعه نشان داد که ژنوتیپ های B و C در ژاپن غالب هستند و تفاوت های چشمگیری در علائم بالینی بیماران با ژنوتیپ های مختلف وجود دارد (۲۷). در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۰۳ توسط همین فرد صورت گرفت ژنوتیپ غالب در آسیای جنوب شرقی B و C گزارش شدند ولی بین بیماران مبتلا به HCC آلوده به این دو ژنوتیپ در ژاپن و تایوان تفاوت هایی مشاهده شد. در ژاپن بیماران مبتلا به HCC با HBV/Ba سن متوسط ۷۰ سال یا بیشتر داشتند در حالیکه سن متوسط بیماران مبتلا به HCC با HBV/C ۵۵ سال گزارش شد. در حالیکه در تایوان عکس این مطلب مشاهده گردید (۲۸).

در مطالعه ای که در چین صورت گرفت، ژنوتیپ غالب B و C بودند ولی توزیع آنها در نقاط مختلف این کشور متفاوت بود. در Mainland و شمال چین ژنوتیپ C غالب بوده (به ترتیب ۵۲/۵ و ۸۵/۱٪)، در حالیکه در جنوب چین ژنوتیپ B غالب بوده است (۵۵٪). ژنوتیپ های A و D نیز در چین گزارش شده اند ولی ژنوتیپ های E تا H گزارش نشده اند، و گزارشاتی از ترکیب ژنوتیپ های C/D و B/C نیز وجود دارند. در این مطالعه حاملین HBeAg در ژنوتیپ C بیشتر از ژنوتیپ B بوده و حاملین مزمن HBV در ژنوتیپ B فعالیت هیستولوژیک کمتری از خود نشان داده اند (۲۹).

در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۰ توسط Kao و همکارانش در تایوان صورت گرفت ژنوتیپ C در بیماران سیروتیک و مبتلا به HCC در سنین بالاتر از ۵۰ سال دیده شد، در حالیکه ژنوتیپ B در بیماران کمتر از ۵۰ سال مشاهده گردید و به این نتیجه رسیدند که ژنوتیپ C با بیماریهای شدیدتر کبد همراه بوده و در افراد جوانتر فاقد سیروز ژنوتیپ B بیشتر دیده می شود (۲۳).

در مطالعه ای که در تایلند انجام شد، ژنوتیپ های B و C به ترتیب در ۷۳٪ و ۲۱٪ موارد مشاهده شدند. ژنوتیپ C در بیماران مبتلا به HCC زیر ۴۰ سال شایعتر از ژنوتیپ B بوده ولی در بیماران بالای ۶۰ سال شیوع کمتری داشته است ولی تفاوتی بین staging تومور و بقا متوسط

REFERENCES

- Hepatitis B: World Health Organization Fact Sheet 204. 2000: World Health Organization. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>
- Gust ID. Epidemiology of hepatitis B infection in the Western Pacific and South East Asia. Gut. 1996; 38 (suppl 2):S18-S23
- Mahoney FJ. Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. Clin Microbiol Rev. 1999; 12 :351-366
- Lee WM. Hepatitis B infection. N Engl J Med. 1997; 337 :1733-1745
- Lindh M, Gonzalez JE, Norkrans G, Horal P. Genotyping of hepatitis B virus by restriction pattern analysis of pre-S amplicon. J Virol Methods 1998; 72:163-74

6. Stuyver L, Gendt SD, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF, et al. A new genotype of hepatitis B virus: Complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol* .2000; 81:67-74.
7. Bowyer SM, van Staden L, Kew MC, Sim JG. Aunoqe segment of the hepatitis B virus group a genotype identified in isolates from South Africa. *J Gen Virol* 2002; 83:2059-73
8. Bae SH, Yoon SK, Jang JW, Kim CW, Nam SW, Choi JY, et al. Hepatitis B virus genotype C prevails among chronic carriers of the virus . *J Korean Med Sci*. 2005; 20(5):816-20.
9. Hannoun C, Soderstrom A, Norkrans G, Lindh M. Phylogeny of African complete genomes reveals a West African genotype a subtype of hepatitis B virus and relatedness between Somali and Asian A1 sequences. *J Gen Virol*. 2005; 86(Pt 8):2163-7.
10. Huy TT, Abe K. Molecular epidemiology of hepatitis B and C virus infections in Asia. *Pediatr Int*. 2004 Apr; 46(2):223-30.
11. Sugauchi F, Ohno T, Orito E, Sakugawa H, Ichida T, Komatsu M, et al. Influence of hepatitis B virus genotypes on the development of preS deletions and advanced liver disease. *J Med Virol*. 2003 Aug; 70(4):537-44.
12. Truong BX, Seo Y, Kato M, Hamano K, Ninomiya T, Katayama M, et al. Long-term follow-up of Japanese patients with chronic hepatitis B treated with interferon-alpha. *Int J Mol Med*. 2005 Aug; 16(2):279-84.
13. Kidd-Ljunggren K, Miyakawa Y, Kidd AH. Genetic variability in hepatitis B viruses. *J Gen Virol*. 2002 Jun; 83(Pt 6):1267-80
14. Arauz-ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnius LO. Genotype HP: A new American genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* 2002; 83:2059-2073
15. Chu CJ, Keeffe EB, Han SY, Perrillo RP, Min AD, Soldevila-Pico C, et al. Prevalence of HBV precore/core promoter variants in the United States. *Hepatology*. 2003 ;38 :619-628
16. Merican I, Guan R, Amarapuka D, Alexander MJ, Chutaputti A, Chien RN, et al. Chronic hepatitis B virus infection in Asian countries. *J Gastroenterol Hepatol*. 2000 ;15 :1356-1361
17. Alter M. Epidemiology of hepatitis B in Europe and worldwide. *J Hepatol*. 2003; 39 : 64-69
18. Pan CQ, Zhang JX. Natural History and Clinical Consequences of Hepatitis B Virus Infection. *Int J Med Sci* 2005 ;2:36-40
19. Sumi H, Yokosuka O, Seki N, Arai M, Imazeki F, Kurihara T, et al. Influence of hepatitis B virus genotypes on the progression of chronic type B liver disease. *Hepatology* 2003; 37:19-26.
20. Chu CJ, Lok ASF. Clinical significance of hepatitis B virus genotypes. *Hepatology*. 2002; 35 :1274-1276
21. Bortolotti F, Cadrobbi P, Crivellaro C, Guido M, Rugge M, Noventa F, et al. Long-term outcome of chronic type B hepatitis in patients who acquire hepatitis B virus infection in childhood. *Gastroenterology*. 1990; 99 :805-10
22. Bellentani S, Dal Molin G, Miglioli L, et al. Natural history of HBV infection: a 9 years follow-up of the diagnosis cohort. *J Hepatol*. 2002 ;36 (Suppl. 1):228- 9
23. Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2000; 118: 554-559.

24. Benvegne L, Fattovich G, Noventa F, Tremolada F, Chemello L, Cecchetto A, et al. Concurrent hepatitis B and C virus infection and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Cancer* 1994 ;74 :2442-8
25. Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection- natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 2004;350:1118-1129
26. Malekzadeh R, Mohammad Nejad M. Commented summaries from current medical literatures. *Arch Iranian Med* 2003; 69(1):72-75
27. Orito E, Ichida T, Sakugawa H, Sata M, Horiike N, Hino K, et al. Geographic distribution of hepatitis B virus (HBV) genotype in patients with chronic HBV infection in Japan. *Hepatology*. 2001 Sep; 34(3):590-4.
28. Orito E, Mizokami M. Hepatitis B virus genotypes and hepatocellular carcinoma in Japan. *Intervirology*. 2003; 46(6):408-12.
29. Fang ZL, Zhuang H, Wang XY, Ge XM, Harrison TJ. Hepatitis B virus genotypes, phylogeny and occult infection in a region with a high incidence of hepatocellular carcinoma in China. *World J Gastroenterol*. 2004 Nov 15;10(22):3264-8
30. Tangkijvanich P, Mahachai V, Komolmit P, Fongsarun J, Theamboonlers A, Poovorawan Y. et al. Hepatitis B virus genotypes and hepatocellular carcinoma in Thailand. *World J Gastroenterol*. 2005; 11(15):2238-43
31. Lee CM, Chen CH, Lu SN, Tung HD, Chou WJ, Wang JH, et al. Prevalence and clinical implications of hepatitis B virus genotypes in southern Taiwan. *Scand J Gastroenterol*. 2003 Jan; 38(1):95-101.
32. Baig S, Siddiqui AA, Ahmed W, Qureshi H, Arif A. The association of complex liver disorders with HBV genotypes prevalent in Pakistan. *Virology* 2007 Nov 27; 4:128
33. Abdo AA, Al-Jarallah BM, Sanai FM, Hersi AS, Al-Swat K, Azzam NA, et al. Hepatitis B genotypes: relation to clinical outcome in patients with chronic hepatitis B in Saudi Arabia. *World J Gastroenterol* 2006 Nov 21; 12(43):7019-24.
34. Amini-Bavil-Olyae S, Sarrami-Forooshani R, Mahboudi F, Sabahi F, Adeli A, Noorinayer B, et al. Genotype Characterization and phylogenetic analysis of Hepatitis B virus isolates from Iranian patients. *J Med Virol* 2005; 75: 227-34.
35. Amini-Bavil-Olyae S, Sarrami-Forooshani R, Adeli A, Sabahi F, Abachi M, Azizi M, et al. Complete genomic sequence and phylogenetic relatedness of hepatitis B virus isolates from Iran. *J Med Virol* 2005; 76: 318-326.
36. Alavian SM, Keyvani H, Rezai M, Ashayeri N, Sadeghi HM. Preliminary report of hepatitis B virus genotype prevalence in Iran. *World J Gastroenterol* 2006 Aug 28; 12(32):5211-3.
37. Amini-Bavil-Olyae S, Hosseini SY, Sabahi F, Alavian SM. Hepatitis B virus (HBV) genotype and YMDD motif mutation profile among patients infected with HBV and untreated with lamivudine. *Int J Infect Dis* 2008 Jan; 12(1):83-7.
38. Mojiri A, Behzad-Behbahani A, Saberifirozi M, Ardabili M, Beheshti M, Rahsaz M, et al. Hepatitis B virus genotypes in southwest Iran: Molecular, serological and clinical outcomes. *World J Gastroenterol* 2008 Mar 14; 14(10):1510-3.