



## Prevalence of YMDD mutations in patients with chronic hepatitis B and renal transplant recipient patients after prolonged using of lamivudine

Kourosh Rahimyan<sup>1,2</sup>, Maryam Vaezjalali<sup>1,2</sup>, Mehrdad Rostami<sup>2</sup>, Narjes Shokatpour<sup>2</sup>, Pedram Ahmadpour<sup>2</sup>

1. Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2. Urology and Nephrology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

### Article Information

#### Article history:

Received: 2015/07/29

Accepted: 2015/12/12

Available online: 2016/01/10

#### Article Subject:

Medical Virology

IJMM 1394; 9(4): 73-78

#### Corresponding author at:

Pedram Ahmadpour

Urology and Nephrology  
Research Center, Shahid  
Beheshti University of Medical  
Sciences, Tehran, Iran

#### Tel:

+98 21 22549011

#### Email:

hmoghimi@ut.ac.ir

### Abstract

**Background and Aim:** In hepatitis B Virus, one of major problem associate lamivudine therapy is the emergence of YMDD motif mutation in Polymerase gene leading to lamivudine resistance mutations. The aim of this study was evaluation of the incidence of the YMDD mutants among patients with chronic hepatitis B and Renal transplant recipients (RTRs).

**Materials and Methods:** In this study, 80 chronic hepatitis B patients who received renal transplants at Tehran city were selected. The patients serum samples were collected for molecular evaluation by nested PCR assays were used for the direct identification of hepatitis B Virus surface antigen (HBsAg). After laboratory tests the results were analyzed by using molecular software.

**Results:** In this study, of the 80 patients, 30 patients were positive for HBV DNA. They were between 28 to 74 years old with the mean of  $51 \pm 23$ . The frequency of lamivudine resistance mutations in YMDD region was detected in 12 (40%) of chronic hepatitis B patients.

**Conclusions:** Much is still unknown about Lamivudine therapy among chronic hepatitis B RTR patients, but most studies have confirmed Lamivudine therapy in these patients is safe and it is better to use it before renal transplantation. It is suggested to follow up patients in terms of immunosuppressive therapy and HBV molecular analysis in different status of disease. Therefore, it will be possible to investigate the effect of these mutations in chronic hepatitis B RTR patients who receive immunosuppressive drugs.

**Key Words:** Hepatitis B Virus, Transplant recipients, Mutation

Copyright © 2016 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

### How to cite this article:

Rahimyan K, Vaezjalali M, Rostami M, Sjokatpour N, Ahmadpour P. Prevalence of YMDD mutations in patients with chronic hepatitis B and renal transplant recipient patients after prolonged using of lamivudine. Iran J Med Microbiol. 2016; 9 (4) :73-78

## بررسی شیوع موتاسیون YMDD در بیماران مبتلا به عفونت مزمن هپاتیت B و دریافت کننده پیوند کلیه بدنال مصرف طولانی مدت لامیوودین

کوروش رحیمیان<sup>۱\*</sup>، مریم واعظ جلالی<sup>۲\*</sup>، مهرداد رستمی<sup>۳</sup>، نرجس شوکت پور<sup>۱</sup>، پدram احمدپور<sup>۲</sup>

۱. گروه میکروشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران  
۲. مرکز تحقیقات بیماری های کلیوی و مجاری ادراری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

### چکیده

### اطلاعات مقاله

**زمینه و هدف:** در ویروس هپاتیت B یکی از مشکلات اصلی درمان با لامیوودین، پیدایش موتاسیون در موتیف YMDD در ژن پلی مرز (P) ویروس است، که باعث موتاسیون مقاوم به لامیوودین می شود. هدف از این مطالعه، بررسی شیوع موتانت های YMDD در میان بیماران مبتلا به هپاتیت B مزمن و دریافت کنندگان پیوند کلیه بود.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه، ۸۰ بیمار دریافت کننده پیوند کلیه در شهر تهران که آلوده به عفونت مزمن HBV بودند، مورد بررسی قرار گرفتند. سرم خون جمع آوری شده از بیماران توسط آزمایشات مولکولی (Nested PCR) برای آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت B مطالعه گردید. بعد از انجام تست های آزمایشگاهی، نتایج با نرم افزارهای اختصاصی مولکولی آنالیز شدند.

**یافته ها:** در این مطالعه از ۸۰ نفر مورد بررسی، ۳۰ نفر HBV DNA آنها مثبت شد. این افراد در محدوده سنی ۲۴-۲۸ سال با میانگین سنی  $23 \pm 51$  بودند. وجود موتاسیون های مقاوم به لامیوودین در ناحیه DDMY در میان ۱۲ بیمار (۴۰٪) هپاتیت B مزمن شناسایی شد.

**نتیجه گیری:** در مورد مصرف لامیوودین در بیماران دریافت کننده پیوند کلیه و مبتلا به عفونت مزمن HBV هنوز ناشناخته های زیادی مطرح است، ولی آنچه که بیشتر مطالعات آن را تایید کرده اند آن است که مصرف این دارو در این بیماران مطمئن می باشد و بهتر است قبل از پیوند کلیه مصرف آن آغاز شود. پیگیری (Follow up) بیماران مبتلا به HBV و دریافت کننده های پیوند کلیه که تحت درمان با لامیوودین قرار دارند، از نظر مصرف داروهای ایمنوساپرسیو و آنالیز مولکولی HBV-DNA در مراحل مختلف بیماری شان، توصیه می شود. به این ترتیب امکان بررسی تاثیر این موتاسیونها در درمان هپاتیت B در بیمارانی که دریافت کننده داروهای ایمنو ساپرسیو فراهم می شود.

**کلمات کلیدی:** ویروس هپاتیت B، دریافت کننده کلیه، موتاسیون

کپی رایت © حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروشناسی پزشکی ایران محفوظ است.

### تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۳۰

پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۱۳

انتشار آنلاین: ۱۳۹۳/۱۰/۲۰

### موضوع:

ویروس شناسی پزشکی

IJMM 1394; 9(4): 73-78

### نویسنده مسئول:

دکتر پدram احمدپور

مرکز تحقیقات بیماری های کلیوی و مجاری ادراری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تلفن: ۰۲۱۲۲۵۴۹۰۱۱

### پست الکترونیک:

hmoghimi@ut.ac.ir

### مقدمه

کبدی ممکن است افزایش می یابد. از سوی دیگر همین تکثیر بالای ویروس، خود زمینه ای را برای بروز موتانت های مقاوم به درمان HBV فراهم می کند (۳). از آنجا که ابتلا به عفونت HBV به صورت معناداری عمر بیمار و نیز عمر پیوند را کاهش می دهد، توصیه می شود بیمارانی که دچار بیماری پایانی کلیه هستند و از نظر HBsAg مثبت می باشند، درمانهای مناسب ضد ویروسی دریافت کنند (۳). لامیوودین که یک آنالوگ نوکلئوزیدی است که می تواند با تاثیر بر روی تکثیر DNA ویروسی، سبب کاهش تیترو ویروس به کم تر از حد آستانه لازم برای ایجاد علائم بالینی گردد (۴). ناحیه YMDD (ناحیه کاتالیک در دومن C آنزیم پلی

در ایران ۹۴ درصد بیماران مبتلا به بیماری پایانی کلیه (End stage Renal Disease) مورد پیوند کلیه قرار می گیرند که رقم قابل توجهی از جامعه می باشند. ابتلا به ویروس هپاتیت B (HBV) در این بیماران، منجر به افزایش احتمال مزمن شدن بیماری و نیز مرگ و میر این بیماران می شود (۱،۲). در بیماران دریافت کننده پیوند کلیه (Renal transplant recipients: RTR) سابقه طبیعی بیماری تغییر می کند، زیرا بدلیل مصرف داروهای مهار کننده سیستم ایمنی، تکثیر ویروس HBV و بدنال آن صدمات

HBV بودند و به صورت دوره ای برای دریافت داروهای مورد نیاز به بیمارستان مراجعه می‌کردند، نمونه خون گرفته شد. DNA ویروسی از ۲۰۰ µl نمونه های سرمی بیماران با استفاده از کیت Roche. Diagnostics) High Pure Viral Nucleic Acid (GmbH, Mannheim, Germany) استخراج گردید. به منظور تعیین جهش موتیف YMDD، قطعه ژنی مربوط به ژن S ویروسی با روش Nested PCR تکثیر شد. بر اساس ۳'-۵' قطعه مورد نظر از ژن S ویروسی دو جفت پرایمر (۹) تعیین و سپس به شرکت تکاپوزیست بر اساس جدول شماره ۱ جهت سنتز سفارش داده شد.

واکنش PCR با حجم نهایی ۲۰ µl بهینه سازی شد. در این پروسه از BioNer, PCR PreMix AccuPower ساخت Korea استفاده شد، میزان غلظت پرایمر برای هر واکنش ۰/۲ و حجم DNA، ۳۰۰-۱۵۰ ng می باشد. برنامه حرارتی مورد استفاده واکنش زنجیره های پلیمرز در جدول شماره ۲ و ۳ می باشد.

محصول PCR را بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با بافر TBE (Tris-Boric Acid-EDTA) الکتروفورز و با استفاده از دستگاه ژل داگ (Gel Doc) خوانده شد. حضور قطعه ۹۷۰ bp راند اول و قطعه ۷۲۰ bp راند دوم در شکل شماره ۱ نشان دهنده

مرز که شامل تیروزین، متیونین، آسپارتات، آسپارات) اصلی ترین ناحیه در ایجاد مقاومت بر علیه داروهای ضد ویروسی خصوصاً لامیوودین است که تمایل اتصال سویه های جهش یافته به دارو را کاهش می دهد (۴،۵). پس از یک سال لامیوودین تراپی میزان موتاسیون در موتیف YMDD در ژن پلی مرز ۳۲-۱۴٪، در دو سال ۳۸٪، در سه سال ۵۰٪ و در چهار بیشتر به ۶۷٪ افزایش پیدا می کند. موتیف YMDD در اثر تعویض اسید آمینه متیونین به والین، ایزولوسین (۶،۷) و ندرتاً سرین در آمینواسید ناحیه ۲۰۴ به موتیف (YVDD rtM۲۰۴V)، (YIDD rtM۲۰۴V) و (YSDD rtM۲۰۴V) تبدیل می شود و در اثر این تغییرات ساختمانی مانع باند شدن دارو به ناحیه شده و باعث بروز مقاومت به دارو می گردد (۸). لذا با توجه به اهمیت بالینی سویه های جهش یافته موتیف YMDD، این مطالعه با تعیین فراوانی چنین رخدادی در بیماران مبتلا به عفونت مزمن هپاتیت B و دریافت کننده پیوند کلیه بدنال مصرف طولانی مدت لامیوودین صورت گرفت.

### مواد و روش ها

در این مطالعه توصیفی- مقطعی (Cross-sectional) از ۸۰ بیمار دریافت کننده پیوند کلیه در بیمارستان لبافی نژاد که از نظر Follow up قابل پیگیری باشند، آلوده به عفونت مزمن

جدول ۱: پرایمرهای مرحله اول و دوم جهت تکثیر ژن S ویروس هپاتیت B

1S	۳'- CCTGCTGGTGGCTCCAGTTC-۵'	مرحله اول
2S	۳'- CCACAATTCKTTGACATACTTTCCA-۵'	
6S	۳'- GCACACGGAATCCGAGGACTGGGGACCCTG-۵'	مرحله دوم
7S	۳'- GACACCAAGCTTGGTTAGGGTTTAAATGTATAACC-۵'	

جدول ۲: چرخه دمایی در مرحله اول Nested PCR

تعداد سیکل	مراحل	زمان	دما
۱	دنا توارسیون اولیه	۵ دقیقه	۹۴°C
	دنا توارسیون	۳۰ ثانیه	۹۴°C
۳۵	اتصال	۳۰ ثانیه	۵۶°C
	تکثیر	۱ دقیقه	۷۲°C
۱	تکثیر نهایی	۱۰ دقیقه	۷۲°C

جدول ۳: چرخه دمایی در مرحله دوم Nested PCR

تعداد سیکل	مراحل	زمان	دما
۱	دنا توارسیون اولیه	۵ دقیقه	۹۴°C
	دنا توارسیون	۳۰ ثانیه	۹۴°C
۳۵	اتصال	۳۰ ثانیه	۶۲°C
	تکثیر	۱ دقیقه	۷۲°C
۱	تکثیر نهایی	۱۰ دقیقه	۷۲°C

ولی این موتاسیون های مقاوم به دارو با سن بیمار ارتباط معنی داری داشت ( $P=0/04$ ) (جدول شماره ۳).

### بحث

درمان کوتاه مدت با لامیوودین در پاک سازی کامل ویروس از سرم بیمار کافی نمی باشد و درمان طولانی مدت نیز با موتاسیون مقاومت به دارو همراه است. بر اساس مطالعات پیشین این مقاومت با تغییر در موتیف YMDD مرتبط می باشد. در حال حاضر لامیوودین به طور رایج در درمان بیماران هپاتیت B مزمن تجویز می شود (۱۰). در این مطالعه، توالی ژنتیکی پروتئین سطحی ویروس هپاتیت B جدا شده از بیماران دریافت کننده کلیه با توالی ژنتیکی سایر ویروس های هپاتیت B جدا شده از دنیا مقایسه شد. در این مقایسه وجود موتاسیون های مقاوم به لامیوودین در موتیف YMDD در میان ۱۲ بیمار دیده شد (۴۰٪ بیماران).

با مطالعه مقالات مختلف در مورد درمان بیماری مزمن هپاتیت B در بیماران دریافت کننده پیوند کلیه، به روشنی می توان دریافت که همگی آنها به درمان موثر داروی لامیوودین

صحت Nested PCR بوده است. سپس محصول PCR که در الکتروفورز مثبت شده بود را برای تعیین سکانس توسط دستگاه ABI sequencer به کشور مالزی فرستادیم برای تعیین سکانس از پرایمر ۶S از جدول ۱ استفاده شد. نتایج حاصل از تعیین توالی ناحیه پلیمراز ژنوم ویروس را با BioEdit، align جهت ورود داده ها به کامپیوتر و تحلیل آماری از نرم افزار SPSS نسخه ۱۷ استفاده شد. برای تعیین ارتباط (معنی دار بودن) از آزمون  $\chi^2$  square استفاده شد. اختلاف معنی دار  $p > 0/05$  در نظر گرفته شد.

یافته ها

در این مطالعه از ۸۰ نفر مورد بررسی آزمایشات مولکولی، ۳۰ نفر HBV-DNA آنها مثبت شد. ۹۰٪ مرد (۷۲ نفر) و ۱۰٪ زن (۳ نفر) که میانگین سنی آنها  $23 \pm 51$  سال بود. وجود موتاسیون های مقاوم به لامیوودین در موتیف YMDD در میان ۱۲ بیمار دیده شد (۴۰٪ بیماران). در این مطالعه بین وجود موتاسیون های YMDD (مقاوم به لامیوودین) و مدت مصرف داروهای سرکوب کننده سیستم ایمنی (سیکلوسپورین، پردنیزولون و آزاتیوپرین) و مدت زمان پیوند عمر بیمار ارتباط معنی داری یافت نشد ( $P=0/04$ ).

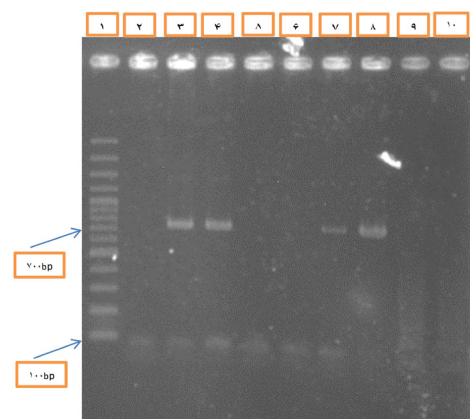
جدول ۴: فراوانی مقاومت لامیوودین در مقایسه با سن و عمر گرفت بیمار در بیماران مورد مطالعه

مقدار (P)	انحراف معیار	میانگین (سال)	تعداد	مقاومت به لامیوودین	
۰/۰۴	۱۰/۸	۴۳/۴	۱۳	ندارد	سن بیمار
	۱۲/۱	۵۳/۹	۱۰	دارد	
۰/۰۶	۶/۲۱	۹/۲۳	۱۳	ندارد	عمر گرفت
	۷/۷	۱۰/۷۳	۱۱	دارد	
۰/۰۶	۶/۲۰	۹/۲۳	۱۳	ندارد	مدت مصرف داروهای ایمنوساپرسیو
	۷/۶۱	۱۰/۷۳	۱۱	دارد	

قبل از دریافت پیوند کلیه و سپس ادامه آن، حتی با وجود بروز موتاسیون های مقاوم به لامیوودین اشاره کرده اند (۱۱). برخی محققان تا آنجا پیش رفته اند که تغییر درمان با داروی لامیوودین را به داروهای دیگر تنها در صورتی مجاز دانسته اند که نشانه های پیشرفت بیماری کبدی در بیمار ظاهر شود (۱۱).

در مطالعه حاضر نیز مشخص گردید، داروی لامیوودین در همه بیماران داروی انتخابی بوده است و در برخی موارد، پزشکان از داروهای دیگر همانند آدفوویر نیز برای درمان HBV استفاده کرده اند.

در این مطالعه بین وجود موتاسیون های YMDD (مقاومت به لامیوودین) و مدت زمان مصرف داروهای ایمنوساپرسیو و عمر گرفت بیمار ارتباط معنی داری یافت نشد، ولی این مقاومت با سن بیمار ارتباط معنی داری داشت ( $P=0/04$ ). به عبارت دیگر هر قدر



تصویر شماره ۱: ژل الکتروفورز محصول ژن S از ویروس HBV. ردیف یک Ladder با فاصله ۱۰۰ bp باند با طول ۷۲۰ bp محصول واکنش زنجیره ای پلی مرز ژن S ویروس HBV می باشد. ردیف های ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰ نمونه های منفی، ردیف های ۳، ۴، ۷، ۸ دارای ژن S، ردیف ۸ کنترل مثبت، ردیف های ۱، ۲، ۹، ۱۰ کنترل منفی

سن بیمار افزایش می یافت، احتمال بروز این موتاسیون ها نیز بیشتر می شد.

مصرف آن آغاز شود (۱۴، ۱۱).

طبق نتایج این مطالعه جهش های موتیف YMDD نسبت به داروی لامیوودین در ۴۰٪ بیماران دریافت کننده پیوند کلیه مورد مطالعه وجود داشت. از آنجا که ویروس ممکن است بصورت خود بخودی و قبل از تماس با دارو، دارای این موتاسیون باشد، تشخیص مقاومت دارویی نسبت به این دارو با استفاده از تکنیک های مولکولی در مراحل اول پیدایش، می تواند با اهمیت باشد. همچنین پیگیری (Follow up) بیماران مبتلا به HBV و دریافت کننده های پیوند کلیه که تحت درمان با لامیوودین قرار دارند، از نظر مصرف داروهای ایمنوساپرسیو و آنالیز مولکولی HBV-DNA در مراحل مختلف بیماری شان، توصیه می شود. به این ترتیب امکان بررسی تاثیر این موتاسیونها در درمان هپاتیت B در بیمارانی که دریافت کننده داروهای ایمنو ساپرسیو فراهم می شود.

### تقدیر و تشکر

این پروژه با همکاری مرکز تحقیقات کلیوی و مجاری ادراری (قرارداد شماره ۴۱۵/۴۹۷) انجام شده است. محققان این طرح از پرسنل محترم آزمایشگاه بیمارستان لبافی نژاد به خصوص جناب آقای میکائیلی، به خاطر همکاری صمیمانه ایشان در تهیه نمونه از بیماران تشکر می کنند.

### Reference

1. Tsai MC, Chen YT, Chien YS, Chen TC, Hu TH. Hepatitis B virus infection and renal transplantation. *World J Gastroenterol*. 2010 21;16(31):3878-87.
2. Gane E, Pilmore H. Management of chronic viral hepatitis before and after renal transplantation. *Transplantation*. 2002 27;74(4):427-37.
3. Hosseini Moghadam S, Iran Pour E. Adefovir as a Novel Drug for the Treatment of Chronic Hepatitis B in Patients with End-Stage Renal Disease and Kidney Recipients. *Hepat Mon* 2008 2008;8(2):135-9.
4. Zhang X, Liu C, Gong Q, Zhang S, Zhang D, Lu Z, et al. Evolution of wild type and mutants of the YMDD motif of hepatitis B virus polymerase during lamivudine therapy. *J Gastroenterol Hepatol*. 2003;18(12):1353-7.
5. Corsa AC, Liu Y, Flaherty JF, Mitchell B, Fung SK, Gane E, et al. No resistance to tenofovir disoproxil fumarate through 96 weeks of treatment in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B. *Clin Gastroen-*

در مطالعه ای در سال ۲۰۰۵ (۲۲ نفر) ۶۰٪ بیماران بیماراران دریافت کننده پیوند کلیه در طول مدت ۶ سال مصرف این دارو، دچار موتاسیون YMDD شدند (۱۲). مطالعه ای در سال ۲۰۰۷ با هدف موتاسیون در ناحیه YMDD در بیماران پیوند کلیه تحت درمان با لامیوودین به فاصله ۹-۹۸ ماه انجام گرفت. ۷ نفر (۲۸٪) از ۲۵ نفر مورد مطالعه در ناحیه موتیف YMDD موتاسیون داشتند (۱۳). در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۹ بر روی بیماران دریافت کننده پیوند کلیه و مبتلا به عفونت مزمن HBV در هندوستان که لامیوودین مصرف کرده بودند، انجام شد مشخص گردید که مصرف لامیوودین در این گروه از بیماران پیوندی بسیار مطمئن است و به خوبی تحمل می شود، زیرا این بیماران هیچ گونه عوارضی را نشان نمی دهند (۱۴). در مطالعه ای دیگر Masaadeh در سال ۲۰۰۸ ، با بررسی فراوانی مقاومت دارویی بیماران هپاتیت B مزمن در کشور اردن که تحت درمان با لامیوودین در فاصله زمانی ۱-۱۳ سال بودند، نشان دادند که ۳۱٪ این بیماران در موتیف YMDD دارای جهش و مقاومت به لامیوودین هستند (۱۵). Bahramali و همکاران در سال ۲۰۰۸ بر روی ۶۲ بیمار هپاتیت B مزمن مطالعه ای انجام دادند که در ۱۱ نفر (۱۷/۷۷٪) موتاسیون YMDD مشاهده شد و ارتباط معنی داری نیز بین مصرف دارو و تغییرات مربوطه بر روی این ناحیه از ژن یافت گردید (۱۶).

نتیجه این مطالعه (۴۰٪ مقاومت به لامیوودین) و روش بررسی استفاده شده (ژن S و متد Nested PCR) مشابه سایر مطالعات دیگر است (۱۵-۱۲). ولی در یک پژوهش روش انجام آزمایش (LCR) و نتیجه آن با مطالعه حاضر متفاوت بود (۱۶) و همچنین در این بررسی موتاسیون مقاومت به لامیوودین با طول مصرف داروی ایمنوساپرسیو ارتباط نداشته است برخلاف مطالعه Bahrami و همکاران می باشد. این نکته به ذهن می رسد که احتمال دارد این بیماران از سالهای اولیه زندگی خود با ویروس در تماس بوده اند و دچار موتاسیون خودبخودی مقاومت به داروی لامیوودین شده اند یا اینکه به دلیل سن بالاتر و مدت زمان زیاد درگیری با ویروس و مصرف طولانی مدت لامیوودین دچار این تغییرات شده اند که این نکته در مطالعات دیگر نیز اشاره شده است و صرفا در ارتباط با بیماران مبتلا به HBV مزمن و بیماران دریافت کننده پیوند کلیه نبوده است (۱۷، ۱۸).

بر اساس تمام این یافته ها معلوم می شود که در مورد مصرف لامیوودین در بیماران دریافت کننده پیوند کلیه و مبتلا به عفونت مزمن HBV و بروز مقاومت نسبت به مصرف آن و تاثیر آن در درمان بیماران، هنوز ناشناخته های زیادی مطرح است، ولی آنچه که بیشتر این مطالعات آن را تایید کرده اند آنست که مصرف این دارو در این بیماران مطمئن است و بهتر است قبل از پیوند کلیه



- terol *Hepatol*. 2014;12(12):2106-12. e1.
6. Bottecchia M, Souto FJ, Kycia M, Amendola M, Brandão CE, Niel C, et al. Hepatitis B virus genotypes and resistance mutations in patients under long term lamivudine therapy: characterization of genotype G in Brazil. *BMC Microbiol*. 2008;8(1):11.
  7. Moosavy SH, Froutan H, Andrabi Y, Toosi MN, Ghofrani H, Vahedi H, et al. Frequency of YMDD mutations in patients with chronic hepatitis B untreated with antiviral medicines. *Med J Islam Repub Iran*. 2011;25(4):186-93.
  8. Kobayashi M, Suzuki F, Akuta N, Yatsuji H, Hosaka T, Sezaki H, et al. Correlation of YMDD mutation and breakthrough hepatitis with hepatitis B virus DNA and serum ALT during lamivudine treatment. *Hepatol Res*. 2010;40(2):125-34.
  9. Ghaziasadi A, Alavian SM, Norouzi M, Fazeli Z, Jazayeri SM. Mutational Analysis of HBs Ag-Positive Mothers and Their Infected Children despite Immunoprophylaxis. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2013;12(4):352-60.
  10. Mohebbi S, Amini-Bavil-Olyae S, Zali N, Noorinayer B, Derakhshan F, Chiani M, et al. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Iran. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14(9):858-66.
  11. Perrillo RP, Hann H-W, Schiff E, Mutimer D, Willems B, Leung N, et al. Extended treatment with lamivudine and adefovir dipivoxil in chronic hepatitis B patients with lamivudine resistance. *Hepatol Int*. 2011;5(2):654-63.
  12. Durlík M, Lewandowska D. Lamivudine therapy for chronic hepatitis B in renal transplant recipients. *Int J Artif Organs*. 2004;16(12):1261-4.
  13. Gwak G-Y, Huh W, Lee D, Choi M, Lee J, Koh K, et al., editors. The incidence and clinical outcome of YMDD mutants in hepatitis B surface antigen-positive renal allograft recipients after prolonged lamivudine therapy. *Transplant Proc*; 2007: Elsevier.
  14. Cho JH, Lim JH, Park GY, Kim JS, Kang YJ, Kwon O, et al. Successful withdrawal of antiviral treatment in kidney transplant recipients with chronic hepatitis B viral infection. *Transpl Infect Dis*. 2014;16(2):295-303.
  15. Masaadeh HA, Hayajneh WA, Alqudah EA. Hepatitis B virus genotypes and lamivudine resistance mutations in Jordan. *World J Gastroenterol*. 2008;14(47):7231.
  16. Bahramali G, Sadeghizadeh M, Amini-Bavil-Olyae S, Alavian SM, Behzad-Behbahani A, Adeli A, et al. Clinical, virologic and phylogenetic features of hepatitis B infection in Iranian patients. *World J Gastroenterol*. 2008 21;14(35):5448-53.
  17. Tan Y, Ding K, Su J, Trinh X, Peng Z, Gong Y, et al. The naturally occurring YMDD mutation among patients chronically infected HBV and untreated with lamivudine: a systematic review and meta-analysis. *PloS one*. 2012;7(3):e32789.
  18. Hsu CW, Yeh CT. Emergence of hepatitis B virus S gene mutants in patients experiencing hepatitis B surface antigen seroconversion after peginterferon therapy. *Hepatol Res*. 2011;54(1):101-8.