

دارای رتبه علمی-پژوهشی از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

جهش های مقاومت به لامیوودین در بیماران هپاتیت B مزمن

چکیده

زمینه و هدف: لامیوودین اولین داروی خوراکی قابل استفاده برای درمان هپاتیت مزمن B می باشد. جهش ها در جایگاه های YMDD و FLLAQ در ژن پلیمراز HBV باعث مقاومت به لامیوودین می شوند. هدف از این مطالعه تعیین میزان جهش های YMDD و FLLAQ در بیماران هپاتیت B مزمن در استان گلستان می باشد.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی مقطعی، ۱۲۰ بیمار با عفونت HBV مزمن شامل ۵۵ بیمار تحت درمان با لامیوودین و ۶۵ بیمار درمان نشده با لامیوودین، مورد بررسی قرار گرفتند. HBV-DNA از پلاسما استخراج گردید و PCR برای تکثیر ناحیه جهش یافته مقاومت به لامیوودین انجام شد. تعیین توالی مستقیم و مقایسه آن با استفاده از توالی استاندارد موجود در پایگاه داده های بانک ژنی صورت گرفت.

یافته ها: در این مطالعه متوسط سنی بیماران $36/31 \pm 10/7$ سال بود که ۳۵ درصد زن و ۶۵ درصد آن ها مرد بودند. جهش در ناحیه YMDD و FLLAQ ژن پلیمراز در ۱۲ بیمار (۲۱/۸۱٪) از ۵۵ بیمار تحت درمان با لامیوودین مشاهده گردید و در ۶۵ بیماری که تحت درمان با لامیوودین نبودند هیچ جهشی مشاهده نشد. جهش های YMDD و FLLAQ به ترتیب در ۹/۱۶٪ (۱۱/۱۲۰) و ۰/۸۳٪ (۱/۱۲۰) بیماران مبتلا به HBV مزمن مشخص شد.

نتیجه گیری: جهش های HBV متداول که نقش مهمی در مقاومت به لامیوودین ایفا می کنند در این بیماران مشاهده شد که مشابه با نتایج سایر مطالعات می باشد.

واژه های کلیدی: ویروس هپاتیت B، جهش YMDD، لامیوودین، ایران

معصومه رضانژادی

دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، ایران

علیجان تیرائی

دانشیار ویروس شناسی، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

ساره ژند

کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

عبدالوهاب مرادی

استاد ویروس شناسی، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

رضا نظام زاده

استادیار ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، ایران

محمد علی وکیلی

استادیار، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

نویسنده مسئول: علیجان تیرائی

پست الکترونیک: alijant@yahoo.com

تلفن: ۰۹۱۱۲۷۳۳۳۲۱

آدرس: گرگان، بلوار هیرکان، ابتدای جاده شصت کلا، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، دانشکده پزشکی

دریافت: ۹۲/۲/۲۲

ویرایش پایانی: ۹۲/۴/۲۷

پذیرش: ۹۲/۴/۲۹

آدرس مقاله

رضانژادی م، تیرائی ع، ژند س، مرادی ع، نظام زاده ر، وکیلی م " جهش های مقاومت به لامیوودین در بیماران هپاتیت B مزمن " مجله علوم آزمایشگاهی، دوره هشتم زمستان ۹۳ (شماره ۵) ۷-۱۳

YMDDD (تیروزین، متیونین، آسپاراتات، آسپاراتات)، محلی جایگاه فعال پلیمر (ناحیه C) و جایگزینی متیونین با لوسین (rtL180M) در جایگاه فعال (ناحیه B) می باشد (۱۱). واریانت rtM204V تقریباً همیشه با جهش اضافی rtL180M در ناحیه B همراه است (۱۲). شایع ترین جهش، جایگزینی متیونین به ایزولوسین YIDD است و این جایگزینی آشکار می کند که YIDD به طور طبیعی رخ می هد و در حاملان HBV که با لامیوودین درمان نشده اند نیز وجود دارد (۱۳). موتانت های HBV با جهش هایی در جایگاه YMDDD پلیمرز ویروس در بیماران آلوده به HBV که درمان لامیوودین را دریافت نکرده اند، نیز دیده شده است (۱۷). همچنین مواردی از وقوع زود هنگام این موتانت ها نشان می دهد که جهش های مقاومت به لامیوودین قبل از شروع درمان در کبد این بیماران وجود داشته است. این بدین معنی است که این سویه های موتانت در میان جمعیت وجود داشته و تعدادی از حاملان HBV یا بیماران هپاتیت B مزمن در نواحی جغرافیایی مختلف ممکن است دارای این اشکال جهش یافته باشند (۱۸). آنالوگ های نوکلئوزیدی باعث طبیعی شدن ALT، کاهش یا حذف بار ویروسی، ناپدید شدن یا سروکانورژن HBeAg و گسترش هیستولوژی کبد می شوند. متأسفانه توقف درمان یا افزایش نیاز به درمان طولانی مدت، باعث بازگشت بیماری در تعداد زیادی از بیماران می شود (۱۶). تفاوت گسترده ای در میزان شیوع HBsAg در استان های مختلف ایران وجود دارد. میزان شیوع آن در تهران، هرمزگان و گلستان به ترتیب ۲/۷، ۲/۳ و ۵/۱ درصد گزارش شده است (۱۷). با توجه به اهمیت جهش های مقاومت به لامیوودین (YMDDD و FLLAQ) و عدم اطلاع از ایجاد مقاومت در طی مصرف دارو و یا وجود سویه های مقاوم در جامعه، این مطالعه با هدف تعیین میزان جهش های YMDDD و FLLAQ در میان بیماران هپاتیت B مزمن صورت گرفت.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی-مقطعی (Cross-Sectional) نمونه های سرمی ۱۲۰ بیمار مبتلا به هپاتیت B مراجعه کننده به آزمایشگاه ویروس شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم

امروزه هپاتیت B مزمن (CHB) مشکلی جدی برای بهداشت جهانی است که میزان شیوع آن به ویژه در آسیا به حدود ۷۰ درصد می رسد. بیشتر از ۳۵۰ میلیون بیمار مزمن آلوده به ویروس هپاتیت B (HBV) در جهان وجود دارد که ۱۵ تا ۴۰ درصد آن ها مبتلا به سیروز پیشرفته، نارسایی کبد و هپاتوسلولار کارسینوما (HCC) می باشند (۱). میزان شیوع آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت B (HBsAg) در نواحی هایپراندمیک، اندمیک و هایپواندمیک به ترتیب بیش از ۸ درصد، ۲-۷ درصد و کمتر از ۲ درصد می باشد (۳). میزان شیوع HBsAg در ایران ۲-۷ درصد گزارش گردیده، بنابراین ایران به عنوان یک منطقه HBsAg مثبت متوسط طبقه بندی شده است (۴). در مطالعه ای که توسط علویان و همکاران بر روی بیماران هپاتیت B صورت گرفت میزان شیوع هپاتیت B در ایران ۲/۱۴ درصد گزارش گردید (۵). بر اساس واگرایی ۸ درصدی یا بیشتر ژنوم کامل HBV به هشت ژنوتیپ (A-H) تقسیم می شود. ژنوتیپ های HBV از توزیع جغرافیایی ویژه ای برخوردار هستند (۶). ژنوتیپ شایع HBV در بیماران مبتلا به هپاتیت مزمن در ایران ژنوتیپ D می باشد (۷). مطالعات قبلی که در دانشگاه علوم پزشکی گلستان بر روی بیماران آلوده به ویروس هپاتیت B صورت گرفت نیز نشان می دهد که همه جدا به جدا HBV متعلق به ژنوتیپ D است (۸). درمان رایج توصیه شده برای بیماران CHB شامل آنالوگ های نوکلئوزیدی / نوکلئوتیدی و اینترفرون ها است (۹). آنالوگ نوکلئوزیدی شامل لامیوودین (LAM)، تلیدین (LdT) و انتکاویر (ETV) می باشد در حالی که آنالوگ های نوکلئوتیدی شامل آدفویر (ADV) و تنوفویر (TFN) است (۱۰). لامیوودین آنالوگ نوکلئوزیدی مؤثری است که برای درمان عفونت ویروس هپاتیت B مزمن استفاده می شود. نیاز به درمان های طولانی مدت با لامیوودین با وقوع جهش های مقاومت به لامیوودین در ارتباط است بیشتر این جهش ها بر روی ترانس کریپتاز معکوس ویروس هپاتیت B اثر می گذارند. اغلب جهش هایی که برای مقاومت به لامیوودین گزارش می شوند جایگزینی والین (rtM204V, YVDD) یا ایزولوسین (rtM204I, YIDD) با متیونین در جایگاه در

آب مقطر استریل به حجم ۵۰ µl رسید. تکثیر ناحیه مورد نظر از DNA ویروس طی ۳۰ سیکل در دستگاه ترموسایکلر انجام گرفت و هر سیکل شامل: دناتوراسیون DNA در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه، جفت شدن پرایمرها با ناحیه مورد نظر در ۵۵/۹ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، سنتز رشته DNA در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵۰ ثانیه و در پایان سنتز نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه بود. سپس محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد که با سایرگرین رنگ آمیزی شده الکتروفورز گردید. برای نشان دادن اندازه باند از سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی استفاده شد. اندازه باند بدست آمده با استفاده از پرایمرهای ویژه، ۶۴۵ جفت باز بود. به منظور آنالیز و بررسی موتاسیون در سطح نوکلئوتید و در سطح اسیدآمین، با استفاده از نرم افزارهای Choromase, Blast و Gene Runner توالی های ژنومی به دست آمده از نمونه ی بیماران با توالی ژن پلیمرز موجود در بانک ژنی (NCBI) مقایسه، و جهش ها و تغییرات ژنومی بررسی گردید. داده ها با استفاده از برنامه نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها

در مجموع در ۱۲ نمونه از افرادی که لامیوودین مصرف می کردند (۲۱/۸۱٪) در جایگاه های ۱۸۰ و ۲۰۴ جهش مشاهده شد. (جدول ۱). در هیچ یک از افرادی که این دارو را مصرف نکرده بودند جهش مشاهده نشد. آنالیز داده ها عدم ارتباط بین وقوع جهش YMDD با سن و جنس بیماران را نشان داد و هیچ اختلاف معنی داری مشاهده نشد.

پزشکی گلستان، جمع آوری گردید. با اخذ مجوز از کمیته اخلاق دانشگاه و پس از کسب رضایت نامه و تکمیل فرم اطلاعات فردی و بالینی، از تمام بیماران نمونه خون گرفته شد. در این مطالعه معیار تشخیص هپاتیت مزمن B، مثبت بودن HBsAg به مدت بیش از ۶ ماه بود که برای تمامی نمونه ها در هنگام نمونه گیری تست HBsAg گذاشته شد و تمامی آن ها از نظر این آزمایش مثبت بودند. بیماران انتخاب شده بر اساس اطلاعات پرونده فاقد عفونت همزمان HCV و HIV بودند. از این تعداد بیمار، ۵۵ بیمار تحت درمان با لامیوودین قرار داشتند و ۶۵ بیمار تحت درمان با لامیوودین نبودند. برای استخراج ژنوم ویروس از کیت تجاری QIA amp (QIAGEN, Hamburg, Germany) DNA Mini Kit استفاده شد. به منظور تعیین جهش، قطعه ژنی مربوطه از ژن پلیمرز ویروسی به وسیله واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) تکثیر شد. یک جفت پرایمر مناسب (Forward, Reverse) برای این قطعه ژنی به طول حدود ۶۴۵ جفت باز انتخاب شد که بصورت زیر بود (۳).

P1-F: 5'-GATGTGTCTGCGGCGTTTTA-3'
P2-R: 5'-CAGCAAAGCCCCAAAAGACCCAC-3'

سپس این ناحیه انتخابی از ژن پلیمرز با به کارگیری پرایمرهای فوق به روش PCR تقویت شد. در این روش ۴۵ میکرولیتر از مخلوط اصلی واکنش (Master Mix) شامل: ۵µl (۲۵mM) dNTP (۱۰mM) ۱µl, PCR buffer (۱۰X) ۵µl, MgCl₂ ۱µl پرایمرهای (۱۰pmol/µl) Forward و Reverse ۰/۵µl DNA (۱۰۰ng) ۵µl با Taq DNA polymerase (۵U/µl) استخراج شده از نمونه ترکیب و با

جدول ۱ - انواع جهش در جایگاه ۲۰۴ و ۱۸۰ ژن پلیمرز ویروس هپاتیت B

تعداد	نوع جهش	گروه
۲	rtL180M/M204V	بیماران دارای جهش
۲	rtL180M/M204I	
۷	rtM204I	
۱	rtL180M	

بحث

مطالعات زیادی در سال های اخیر نشان می دهد که درمان طولانی مدت (بیش از ۶ ماه) با لامیوودین می تواند باعث جهش های YMDD (۱۸) و بازگشت بیماری و در برخی موارد باعث بدتر شدن بیماری و در نهایت مرگ شود (۱۹). افزایش مدت درمان با لامیوودین با میزان بالای مقاومت به لامیوودین ارتباط دارد. این مقاومت به میزان ۱۴-۳۲ درصد در یک سال و بیش از ۷۰ درصد بعد از ۴ سال درمان افزایش پیدا می کند (۲۵). مقاومت به لامیوودین با جهش ها در جایگاه YMDD که بخشی از جایگاه فعال پلیمرز HBV است، ارتباط دارد (۲۱، ۲۲). سویه های HBV مقاوم دارای جایگزینی متیونین در rtM204 (ناحیه C) به ایزولوسین (M204I, YIDD variant) یا والین (rtM204V, YVDD variant) در این جایگاه می باشند (۱۲). در مطالعه ای در چین میزان جهش YMDD در بیماران CHB تحت مطالعه آن ها ۲۶/۲ درصد گزارش گردید (۲۳). در اردن میزان این جهش ۳۱ درصد گزارش شد (۲۴). همچنین مطالعه دیگری در چین گزارش کرد که تمام بیماران تحت درمان با لامیوودین دارای جهش مقاومت می باشند. نتایج مطالعه ای در ایران نشان داد که شیوع این جهش ۲۵/۷ درصد در میان HBV مزمن می باشد (۳۱). نتایج این بررسی نشان می دهد که جهش های YMDD و FLAQ در ۱۲ بیمار (۲۱/۸۱٪) از ۵۵ بیمار تحت درمان با داروی لامیوودین وجود دارد، که نشان می دهد مقاومت در بیماران هپاتیت مزمن تحت درمان با داروی لامیوودین در ایران رایج است. این یافته با مطالعات صورت گرفته در مطالعات دیگر (۲۳-۲۵) همخوانی دارد. گذشته از جهش هایی که به وسیله درمان با لامیوودین ایجاد می شوند، برخی گزارشات بیان می کنند جهش های YMDD می تواند به طور خود به خودی در بیماران CHB درمان نشده با لامیوودین اتفاق بیافتند. از آنجائیکه آنزیم نسخه برداری معکوس HBV فعالیت تصحیح را در طی فرایند همانندسازی ندارد، جهش ها می توانند به طور طبیعی به علت اتصال بد نوکلئوتید انتخابی ایجاد شوند (۲۶). مطالعه ای در کره میزان جهش YMDD را در بیماران دارای عفونت هپاتیت B مزمن

که با لامیوودین درمان نشده اند، ۷/۵ درصد گزارش کردند (۲۷). در مطالعه ای در ترکیه میزان جهش YMDD در بیماران HBeAg مثبت ۱۲/۵ درصد و در بیماران anti-HBe مثبت ۵/۳۵ درصد گزارش گردید که از قبل درمان ضد ویروسی نداشتند (۲۸). گزارش نتایج مطالعه ای در اسپانیا نشان داد که شیوع این جهش حدود ۴ درصد در میان حاملان HBV مزمن وجود دارد (۲۹). در مطالعه ای در ژاپن جهش در ۵ بیمار از ۱۵ بیمار هپاتیت مزمن B که با لامیوودین درمان نشده اند، مشخص شد (۲۲) که با نتایج مطالعات ما همخوانی ندارد. در مطالعات صورت گرفته در ایران این جهش ها در هیچ یک از بیماران درمان نشده گزارش نشد (۳۱، ۳۰). بر اساس یافته های این مطالعه جهش در هیچ یک از ۶۵ بیمار درمان نشده با لامیوودین یافت نشد. یافته های این مطالعه مشابه با مطالعات صورت گرفته در ایران می باشد (۳۱، ۳۰). جهش YSDS برای اولین بار توسط Nister در سال ۲۰۰۰ گزارش شد (۳۲). در این جهش متیونین به سرین، در کدون ۲۰۴ در ناحیه C مربوط به DNA پلیمرز، تبدیل شده است (rtM204S). در مطالعه دیگر Bozdayi نشان دادند که ترکیب واریانت YSDS پلیمرز HBV با rtL180M باعث تغییر مقاومت به لامیوودین در شرایط *in vitro* پیشرفت بیوشیمیایی و ویرولوژی و بازگشت توانایی همانندسازی ویروس می شود (۳۳). نتایج مطالعه ای در ایران نشان داد که شیوع جهش YSDS، ۵/۳ درصد در میان بیماران درمان نشده با لامیوودین وجود دارد (۳۸). در مطالعه ما موتانت YSDS در هیچ یک از بیماران هپاتیت B مزمن مشاهده نشد. نتایج این مطالعه مطابق با مطالعات صورت گرفته نمی باشد. موتانت rtL180M به تنهایی به میزان خیلی کمی در ایجاد مقاومت به لامیوودین شرکت می کند اما ترکیب rtL180M با جهش های rtM204V یا rtM204I مقاومت بیشتری را نسبت به جهش های تکمی rtM204V یا rtM204I ایجاد می نماید. البته این نوع جهش جدید بوده و به مطالعات بیشتری به منظور بررسی اهمیت بالینی آن، نیاز است (۳۵). جهش rtM204V همیشه در ترکیب با جهش rtL180M است.

ژنوتیپ D_1 و ساب تایپ ayw_2 می باشند (۸). تفاوت در نتایج مطالعه ما با مطالعات دیگر شاید می تواند به علت تعداد افراد در برخی از مطالعات، روش های تشخیص، عدم تصحیح توالی ها، عدم اطلاع از وجود جهش های طبیعی و یا ویژگی های ناشناخته گروه مورد مطالعه از قبیل بار ویروسی یا تغییرات اسید آمینه از ژنوم ویروس باشد.

نتیجه گیری

برای ارزیابی درمان ضد ویروسی نظارت بر این دو جایگاه جهش، دارای اهمیت است و می تواند اطلاعات مفیدی را جهت اتخاذ شیوه های درمانی مناسب توسط پزشکان در اختیار آن ها قرار دهد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از حمایت مالی معاونت تحقیقات و فن آوری و مرکز تحقیقات بیماری های عفونی دانشگاه علوم پزشکی گلستان با شماره ۳۵/۲۲۸ و تاریخ ۹۱/۲/۲ سپاسگزاری می نمایند.

References

1. Awan Z, Idrees M, Rafique S, Rehman I, Akbar H, Butt S, et al. *Hepatitis B virus YMDD-motif mutations with emergence of lamivudine-resistant mutants: a threat to recovery*. Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench. 2010; 3(3): 108-114.
2. Alavian SM. *Hepatitis B virus infection in Iran; Changing the epidemiology*. Iran J Clin Infect Dis. 2010; 5(1): 51-6.
3. Shakeri MT, Foghanian B, Nomani H, Ghayour-Mobarhan M, Nabavinia MS, Rostami S, et al. *The Prevalence of Hepatitis B Virus Infection in Mashhad, Iran: A Population-Based Study*. Iran Red Crescent Med J. 2013; 15(3): 245-248.
4. Zali MR, Mohaghegh SH. *The changing epidemiology of hepatitis B in Iran*. Gastroenterolog Hepat. 2009; 3(1): 1-4.
5. Alavian SM, Hajarizadeh B, Ahmadzad-Asl M, Kabir A, Bagheri-Lankarani K. *Hepatitis B Virus Infection in Iran*. Hepat Mon. 2008; 8(4): 281-94.
6. Miyakawa Y, Mizokami M. *Classifying hepatitis B virus genotypes*. Intervirology. 2003; 46(6): 329-338.
7. Alavian SM, Keyvani H, Rezai M, Ashayeri N, Sadeghi HM. *Pre-liminary report of hepatitis B virus genotype prevalence in Iran*. World J Gastroenterol. 2006; 12(32): 5211-3.
8. Moradi M, Zhand S, Ghaemi A, Javid N, Tabarraei A. *Mutations in the S gene region of hepatitis B virus genotype Din Golestan Province-Iran*. Virus Genes. 2012; 44(3): 382-387.
9. Sonneveld MJ, Rijckborst V, Boucher CAB, Hansen BE, Janssen HLA. *Predict-on of sustained response to peginterferon alfa 2-b for HBe-Ag positive chronic hepatitis B using on treatment hepatitis B surface antigen decline*. Hepatology. 2010; 52(4): 1251-7.

میزان شیوع این نوع جهش ترکیبی ۱۰۰ درصد می باشد. در حالی که جهش rtM204I می تواند به تنهایی نیز وجود داشته باشد (۳۶). در مطالعه ای در چین از ۶۳ بیمار ۲۶ بیمار (۴۱/۳٪) دارای جهش rtL180M/M204V و ۱۴ بیمار (۲۲/۲٪) دارای جهش rtL180M/M204I گزارش شد (۳۷). همچنین در مطالعه دیگری در چین از ۱۰۹ بیمار ۴۵ بیمار (۴۱/۲۸٪) دارای جهش rtL180M/M204V و ۲۸ بیمار (۲۵/۷۰٪) دارای جهش rtL180M/M204I گزارش گردید (۳۶). نتایج بررسی حاضر نشان می دهد که از ۱۲۰ بیمار دارای جهش مقاومت به لامیوودین، ۲ بیمار (۱/۶۶٪) دارای جهش ترکیبی rtL180M/M204I ۲ بیمار (۱/۶۶٪) دارای جهش ترکیبی rtL180M/M204V می باشند. در ایران، ژنوتیپ D تنها نوع ژنوتیپ گزارش شده می باشد (۷). مطالعات قبلی ما بر روی ژن S ویروس هپاتیت B در دانشگاه علوم پزشکی گلستان نشان می دهد که همه جدایه های HBV در استان گلستان متعلق به ژنوتیپ D، ساب

10. Ayoub SB, Keefe EB. *Review article: current antiviral therapy of chronic hepatitis B*. Aliment Pharmacol Ther. 2011; 34(10): 1145-8.
11. Chen CH, Lee CM, Lu SN, Changchien CS, Eng HL, Huang CM, et al. *Clinical significance of hepatitis B virus (HBV) genotypes and precore and core promoter mutations affecting HBV e antigen expression in Taiwan*. J Clin Microbiol. 2005; 43(12): 6000-6006.
12. Lee CZ, Lee HS, Huang GT, 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; 12(33): 5301-5305.
13. Xiao ZX, Xiao J, Jiang Y, Zhang S, Yu M, Zhao J, et al. *A novel method based on ligase detection reaction for low abundant YIDD mutants detection in hepatitis B virus*. Hepatology Research. 2006; 34(3):150-5.
14. 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; 74(2): 361-6.
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 Clin. 2004; 22(3): 133-7.
16. Chien RN, Yeh CT, Tsai SL, Chu CM, Liaw YF. *Determinants for sustained HBeAg response to lamivudine therapy*. Hepatology. 2003; 38(5): 1267-73.
17. Merat S, Rezvan H, Nouraie M, Jamali A, Assari S, Abolghasemi H, et al. *The prevalence of hepatitis B surface antigen and anti-hepatitis B core antibody in Iran: a population-based study*. Arch Iran Med. 2009; 12(3): 225-31.
17. Merat S, Rezvan H, Nouraie M, Jamali A, Assari S, Abolghasemi H, et al. *The prevalence of hepatitis B*

- antigen and anti-hepatitis B core antibody in Iran: a population-based study. Arch Iran Med. 2009; 12(3): 225-31.
18. Xu D, Tian DY, Wang WH, Chen HY, Xing MY, Guo W, et al. Emergence and clinical significance of YMDD and HBeAg-related mutations during lamivudine treatment. Zhonghua Neike Zazhi. 2004; 43(2): 121-124.
19. Manolakopoulos S, Karatapanis S, Elefsiniotis J, Mathou N, Vlachogiannakos J, Iliadou E, et al. Clinical course of lamivudine monotherapy in patients with decompensated cirrhosis due to HBeAg negative chronic HBV infection. Am J Gastroenterol. 2004; 99(1): 57-63
20. Rapti I, Dimou E, Mitsoula P, Hadziyannis SJ. Adding-on ver-sus switching-to adefovir therapy in lamivudine-resistant HBeAg-negative chronic hepatitis B. Hepatology. 2007; 45(2): 307-313.
21. 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(2): 259-265.
22. Kobayashi S, Ide T, Sata M. Detection of YMDD motif mutations in some lamivudine-untreated asymptomatic hepatitis B virus carriers. J Hepatol. 2001; 34(4): 584-6.
23. 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(6): 459-462.
24. Masaadeh HA, Hayajneh MA, Alqudah EA. Hepatitis B Virus Genotypes and Lamivudine Resistance Mutations in Jordan. World J Gastroenterol. 2008; 14(47): 7231-4.
25. Afshar MR, Mollaie HR. Use of ALLGIO Probe Assays for Detection of HBV Resistance to Adefovir in Patients with Chronic Hepatitis B, Kerman, Iran. Asian Pacific J Cancer Prev. 2012; 13(11): 5463-5467.
26. Tsubota A. How do naturally occurring YMDD-motif mutants influence the clinical course of lamivudine-naïve patients with chronic hepatitis B virus infection? J Gastroenterol Hepatol. 2006; 21(12): 1783-1788.
27. 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; 19(4): 541-6.
28. Tuncbilek S, Kose S, Elaldi A, Akman S. Lamivudine Resistance in Untreated Chronic Hepatitis B Patients in Turkey. Turk J Gastroenterol. 2008; 19(2): 99-103.
29. 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; 22(3): 133-7.
30. 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. International Journal of Infectious Diseases. 2008; 12(1): 83-87.
31. Ramezani A, Velayati AA, Hasanjani Roshan MR, Gachkar, Banifazl M, Keyvani H, et al. Rate of YMDD motif mutants in lamivudine-untreated Iranian patients with chronic hepatitis B virus infection. International Journal of Infectious Diseases. 2008; 12(3): 252-255.
32. Nisters HG, de Man RA, Pas SD, Fries E, Qsterhaus AD. Identification of a new variant in the YMDD motif of the hepatitis B virus polymerase gene selected during lamivudine therapy. J med micrbiol. 2002; 51(8): 695-699.
33. Bozdayi AM, Uzunalimoglu O, Turkyilmaz AR, Aslan N, Sezgin O, Sahin T, et al. YSDD: a novel mutation in HBV DNA polymerase confers clinical resistance to lamivudine. J Viral Hepatol. 2003; 10(4): 256-265.
34. 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. Medical Journal of Islamic Republic of Iran. 2011; 25(4): 186-193.
35. Lok ASF, Hussain M, Cursano C, Margotti M, Gramenzi A, Grazi GL, et al. Evolution of Hepatitis B Virus Polymerase Gene Mutations in Hepatitis B e Antigen-Negative Patients Receiving Lamivudine Therapy. Hepatology. 2000; 32(5): 1145-1153.
36. Li MW, Hou W, Wo JE, Liu KZ. Character of HBV (hepatitis B virus) polymerase gene rtM204V/I and rtL180M mutation in patients with lamivudine resistance. J Zhejiang Univ SCI. 2005; 6(7): 664-667.
37. Liu KZ, Hou W, Zumbika E, Ni Q. Clinical features of chronic hepatitis B patients with YMDD mutation after lamivudine therapy. J Zhejiang Univ Science B. 2005; 6(12): 1182-1187.

YMDD and FLLAQ Mutations in Chronic Hepatitis B Patients

Rezanezhadi, M. (BSc)

MSc of microbiology, Golestan
University of Medical Sciences, Iran

Tabarraei, A. (PhD)

Associate Professor of Virology,
Infectious Diseases Research Centre,
Golestan University of Medical
Sciences, Gorgan, Iran

Zhand, S. (MSc)

PhD Student of Microbiology,
Department of Microbiology, Golestan
University of Medical Sciences,
Gorgan, Iran

Moradi, A. (PhD)

Professor of Virology, Infectious
Diseases Research Centre, Golestan
University of Medical Sciences,
Gorgan, Iran

Nezamzade, R. (PhD)

Assistant Professor of Genetics,
Islamic Azad University, Damghan
Branch, Iran

Vakili, MA. (PhD)

Assistant Professor of epidemiology,
Infectious Diseases Research Centre,
Golestan University of Medical
Sciences, Gorgan, Iran

Abstract

Background and Objective: Lamivudine is the first orally available drug approved for treatment of chronic hepatitis B. Mutations at the YMDD and FLLAQ motifs in the domains of HBV polymerase gene contribute resistance to lamivudine. This study was aimed to determine the rate of YMDD and FLLAQ mutants in hepatitis B patients in Golestan Province, Iran.

Material and methods: In this cross sectional study, 120 patients with chronic HBV infection were recruited. Of them, 55 were treated and 65 untreated with Lamivudine. HBV DNA extractions from plasma and polymerase chain reaction (PCR) were performed. For detection of Lamivudine mutants direct sequencing and alignment of products were applied using reference sequence from Gene Bank database.

Results: the average age of patients was 36.31 ± 10.07 , which 35% of them were female and 65% were male. Mutations at the YMDD and FLLAQ motifs in the domains of HBV polymerase gene were detected in 12 of 55 patients (21.81%) treated with Lamivudine while no mutation was observed in untreated patients. The YMDD and FLLAQ mutants were detected in 9.16% (11/120) and 0.83% (1/120) of chronic HBV patients, respectively.

Conclusion: Usual HBV mutations, which play an important role in lamivudine resistance, detected in this study are similar to other studies.

Key words: Hepatitis B Viruse, YMDD Mutation, Lamivudine, Iran.

Corresponding Author: Tabarraei, A.

Email: alijant@yahoo.com

Received: 12 May 2013

Revised: 19 July 2013

Accepted: 20 Jul 2013