مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۴ شماره ۳، پاییز۱۳۸۹، صفحات ۳۵- ۲۹

فراوانی ژنوتایپ و ساب تایپ‌های HBV در بیماران مبتلا به عفونت همزمان HIV/HBV و HBV به‌تنهایی

احمد فراهانی فر[۱]،محمد رضا آقاصادقی*[۲]، گلناز بهرامعلی[۲]، سید مهدی سادات[۲]، سید داور سیادت[۲]، مینو محرز[۳]، مریم فروغی[۳]، فوزیه جوادی[۲]، عباس بهزاد بهبهانی[٤]، فرزین روحوند[۲]، صفیه امینی[۲]، محمد علی داور پناه[٥]، مهین جمشیدی ماکیانی[٦]، محمد صادق خسروی[۲]، سید بهمن مومن[۲]، رامین حاجی خانی[۱]

۱) گروه میکرب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج
۲) گروه هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران
۳) مرکز تحقیقات HIV/AIDS، دانشگاه علوم پزشکی تهران
٤) مرکز تحقیقات تکنولوژی پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز
٥) مرکز تحقیقات HIV/AIDS، دانشگاه علوم پزشکی شیراز
٦) مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی دانشگاه علوم پژشکی هرمزگان.
نویسنده رابط: محمد رضا آقاصادقی، گروه هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران
تلفن:۰۲۱-٦٦٩٦٩٢٩١ mrasadeghi@pasteur.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله:۸۸/۸/۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۸/۱۲/۲۷

چکیده:

زمینه و اهداف: عفونت‌های ناشی از هپاتیت B (HBV) و HIV از جمله معضلات بهداشت جهانی هستند. حدود ۱۰ ٪ از افراد حامل ویروس HIV همزمان مبتلا به‌عفونت هپاتیت B نیز می‌باشند که جمعیتی حدود ٤ میلیون نفر را در جهان شامل می‌شوند. در این مطالعه، به‌تعیین فراوانی ژنوتایپ و ساب‌تایپ HBV در بیماران ایرانی دچار عفونت همزمان HIV/HBV و بیماران مبتلا به‌بیماری هپاتیت B به‌تنهایی پرداخته شد.

روش بررسی: سرم ۵۸ بیمار شامل ۳۰ بیمار (۵۱/۷٪) دارای عفونت HBV و ۲۸ بیمار (٤۸/۳٪) دارای عفونت همزمانHIV/HBV، از مراکز درمانی و تحقیقاتی استان‌های تهران، فارس و هرمزگان جمع‌آوری شد (۸۸-۱۳۸٦). DNA ویروس هپاتیت B در هر دو دسته از بیماران فوق استخراج وسپس ناحیه S (surface gene) با روش Nested-PCR تکثیر گردید. پس از توالی‌یابی مستقیم، نتایج توسط نرم افزارهای بیوانفورماتیکی تجزیه و تحلیل شد و درخت فیلوژنتیکی آن، رسم گردید. نتایج با آزمونchi square بررسی شد.

یافته‌ها: ژنوتایپ D به‌عنوان تنها ژنوتایپ در هر دو دسته بیمار شناسایی شد. فراوانی ساب‌تایپ‌های ayw2 (۲۷/۹۰،۳۰٪)، ayw3 (۳/۳٪، ۱/۳۰) و ayw4 (۲/٦،۳۰/۷٪) در بیماران مبتلا به‌عفونت HBV به‌تنهایی و ساب‌تایپ‌های ayw2 (۳۵/۷٪, ۱۰/۲۸)، ayw3 (۳۹/۳٪، ۱۱/۲۸) وayw4 (۲۵٪، ۷/۲۸) در بیماران دچار عفونت همزمان HIV/HBV مشاهده گردید. نتایج ارتباط معناداری را بین نوع عفونت (HBV به‌تنهایی و یا عفونت همزمان HIV/HBV) و نوع ساب تایپ HBV نشان داد ($P < 0.001$).

نتیجه گیری: احتمال آلوده بودن بیماران مبتلا به‌عفونت HBV با ساب‌تایپ‌های ayw4 و ayw3، به‌طور همزمان با عفونت HIV در ایران، بیشتر از سایر ساب تایپ‌ها است.

کلید واژه ها: HIV/HBV، HBV، ژنوتایپ ،ساب‌تایپ، ایران

مقدمه:

عفونت‌های ناشی از ویروس هپاتیتB (HBV) و HIV از جمله معضلات بهداشت جهانی است. بیش از ۲ میلیارد نفر در جهان تاکنون، در طول زندگی‌اشان، در معرض ویروس هپاتیت B قرار گرفته‌اند. از این تعداد ٤۰۰ میلیون نفر از آنها به‌شکل مزمن بیماری مبتلا می‌باشند. حدود ۷۵ درصد از حاملین مزمن، در آسیا و غرب اقیانوس آرام زندگی می‌کنند. گزارش‌ها حاکی از آن است که ۱۵ تا ٤۰ درصد از افراد آلوده، به‌سمت سیروز، نارسایی کبد و سرطان کبد پیش می‌روند. طبق آمار سالانه ۱/۲-۰/۵ میلیون نفر به‌دلیل آلودگی با این ویروس فوت می‌کنند (۱،۲).

ویروس هپاتیت B یک ویروس پوشش‌دار از اعضای خانواده هپادنا ویریده می‌باشد. ژنوم این ویروس به‌صورت DNA دو رشته‌ای حلقوی ناقص است که رشته منفی آن حدود ۳۲۰۰ نوکلئوتید و طول زنجیره مثبت ناقص آن بین ۱۱۰۰ تا ۲٦۰۰ متغییر می‌باشد. ویروس فوق دارای چهار قالب بازخوانی (ORF) به‌نام‌های ژن P (رمزدهی پلی مراز)، ژن S (رمزدهی آنتی‌ژن سطحی HBsAg)، ژن C (رمزدهی پروتئین HBc و HBe) و ژن X (رمزدهی پروتئین X) می‌باشد (۳). قالب بازخوانی ناحیه S از نوکلئوتید۸۳۳ شروع و به ۲۸۵۰ ختم می‌شود که به‌طور کامل با ORF P همپوشانی دارد و سه نوع پروتئین (S)SHBs،(L) LHBs و (M) MHBs را رمزدهی می‌کند، که در بین آنها بیشترین فراوانی را پروتئین S (HBs) دارد. قابل ذکر است که ناحیه S رمز دهی آنتی‌ژن سطحی ویروس یا HBS Ag را هم (ناحیهalpha determinant (α)) به‌عهده دارد (٤).

یکی دیگر از ویروس‌هایی که جامعه بشری را تهدید می‌کند HIV است. طبق تخمین سازمان جهانی بهداشت (WHO) از سال ۱۹۸۱ (سال کشف ویروس) تا کنون بیش از ۲۵ میلیون نفر در اثر عفونت ناشی از آن جان خود را از دست داده‌اند (۵). ویروسHIV از خانواده رتروویریده می‌باشد که عامل سندرم نقص ایمنی اکتسابی (AIDS) است. نحوه عملکرد HIV به این صورت می‌باشد که ویروس سلول‌های حیاتی در سیستم ایمنی انسان مانند helper T cells، ماکرفاژها و سلول‌های دندریتیک را آلوده می‌کند. در این شرایط سیستم ایمنی دچار مشکل شده و عفونت‌های فرصت طلب، زندگی فرد را تهدید می‌کنند (۵).

شایان ذکر است که راه‌های انتقال هر دو ویروس (HIVو HBV) مشابه یکدیگر است. هردو از طریق تماس جنسی، سرنگ آلوده و یا از مادر به نوزاد منتقل می‌شوند(٦). به این ترتیب حدود ۱۰ در صد افراد مبتلا به‌عفونت HIV همزمان دچار عفونت هپاتیت B نیز می‌باشند. در برخی از مطالعات نشان داده شده است که ویروس HIV در سیر عفونت HBV، در بیمارانی که به‌طور همزمان درگیر هر دو ویروس می‌باشند، دخالت نموده و سبب بالا رفتن میزان DNA ویروس HBV می‌شود. این مسئله خود باعث پیشرفت بیشتر بیماری هپاتیت B به‌سمت سیروز کبدی و افزایش مرگ ناشی از آن در این دسته از بیماران است (۷). همچنین در این موارد، سرولوژی HBV غیر طبیعی است. میزان Anti HBs Ag و Anti HBe Ag (آنتی‌ژن‌های تشخیصی در عفونت HBV)، کاهش پیدا می‌کند و آنزیم کبدی ALT (آلانین آمینو ترانسفراز) شاخص قابل اطمینانی جهت پیگیری بیماری نیست (۸).

ویروس هپاتیت B از نظر تفاوت ژنتیکی، به هشت ژنوتایپ (A تا H) تقسیم بندی شده است (۹). ژنوتایپ-های HBV دارای توزیع جغرافیایی متمایزی هستند. به‌طوریکه ژنوتایپ A به‌طور عمده در شمال اروپا، آمریکای شمالی و آفریقا، ژنوتایپF در بیمارانی در امریکای جنوبی و مرکزی، ژنوتایپC و B در شرق دور و ژنوتایپ G در ایالات متحده و فرانسه مشاهده می‌شوند. ژنوتایپD گسترش جهانی دارد ولی بیشترین فراوانی را در جنوب اروپا، خاورمیانه، شمال آمریکا، هند و آفریقا دارد. بر اساس این طبقه‌بندی، ژنوتایپ غالب در ایران و خاورمیانه ژنوتایپ نوع D می‌باشد (۱۰). ژنوتایپینگ HBV برای تعیین ارتباطات همه‌گیری‌شناسی در بین سویه‌های مختلف ویروس و ناحیه مورد مطالعه و همچنین برای شروع برنامه درمانی حائز اهمیت است (۱۱). همچنین ویروس HBV بر اساس شاخص آنتی ژنیک (alpha determinant) به ٤ ساب‌تایپ اصلی به‌نام‌های ayr, ayw, adr, adw تقسیم می‌شود (۱۱و۱۲) الگوی فراوانی نوع ژنوتایپ و سروتایپ در مناطق مختلف جهان با توجه به‌نوع انتقال و مهاجرت همواره در حال تغییر است. فرم‌های آللیک در گروه d یا y اسید آمینه ۱۲۲ و در گروه r یا w اسید آمینه ۱٦۰ است، که به‌ترتیب می‌تواند لیزین یا آرژنین باشند. همچنین با توجه به اسید

امینه ۱۲۷ به آلل w اندیس‌های ٤-۱ (w_1,w_2,w_3,w_4) تعلق می‌گیرد (۱۳).

نوع ژنوتایپ و ساب‌تایپ در مدیریت درمان بیماران مبتلا به هپاتیت B و بیماران دچار عفونت همزمان HIV/HBV، حائز اهمیت است. در این مطالعه فراوانی ساب تایپ و ژنوتایپ HBV در دو دسته از بیماران مبتلا به‌عفونت HBV به‌تنهایی و یا عفونت همزمان HIV/HBV، همچنین ارتباط انواع ساب‌تایپ‌های موجود در ژنوتایپ بدست آمده با میزان آلودگی همزمان HIV/HBV تعیین شد.

مواد و روش‌ها:

جمعیت مورد مطالعه: جمعیت مورد مطالعه شامل ۵۸ بیمار حامل HBs Ag بود که در سال‌های ۸۸-۱۳۸٦ به‌مراکز درمانی و تحقیقاتی استان‌های تهران، فارس و هرمزگان، مراجعه نموده بودند. نمونه‌های انتخاب شده شامل ۳۰ بیمار (۵۱/۷٪) دارای عفونت HBV به‌تنهایی و ۲۸ بیمار(٤۸/۳٪)، دارای عفونت همزمان HIV/HBV بود. ۵۰۰µl از سرم خون بیماران جدا شد و در شرایط ^{oC} ۸۰- جهت ارزیابی‌های آتی نگهداری شدند. کلیه اطلاعات سرولوژی و بالینی بر اساس پرسشنامه مربوطه به‌همراه سرم بیماران، دریافت شد.

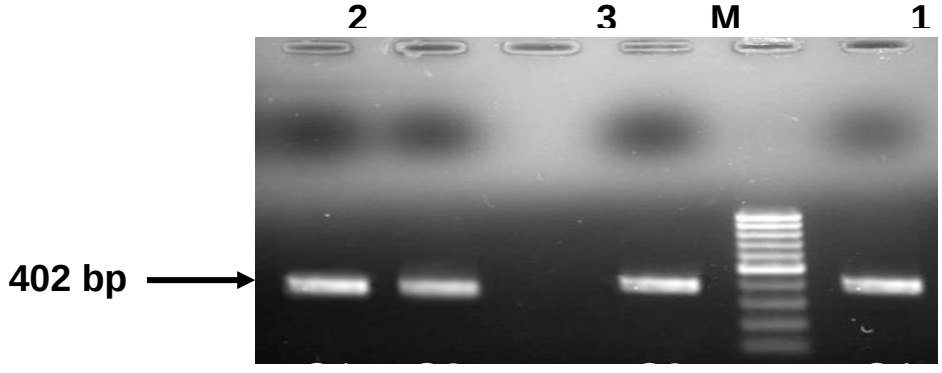
استخراج DNA ویروس و PCR: DNA ویروس HBV از µl ۲۰۰ سرم بیماران با استفاده از کیت تخلیص DNA (Roche) و بر طبق پروتکل شرکت سازنده استخراج و قطعهbp ٤۰۲ از ناحیه S ژنوم HBV با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (۱۱) به‌روش Nested PCR تکثیر شد. در تمام مراحل از سرم بیمار مبتلا به‌عفونت HBV که قبلا به اثبات رسیده بود، به‌عنوان شاهد مثبت استفاده شد. محصول PCR با استفاده از ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز شد و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، زیر نور ماوراء بنفش مشاهده گردید.

توالی‌یابی مستقیم (Direct Sequencing): جهت انجام توالی‌یابی، محصولات PCR بر روی ژل آگارز الکتروفورز شد و با استفاده از کیت تخلیص DNA (High pure DNA،BIONEER) از ژل استخراج و به آزمایشگاه Seqlab آلمان ارسال گردید. با استفاده از پرایمرهای مرحله دوم Nested PCR توالی‌یابی انجام شد. نتایج توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیک شامل Mega4 و BioEdit (The BioEdit Sequence Alignment Editor Software) ارزیابی شد (۱۲).

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های حاصل از توالی‌یابی مستقیم و اطلاعات پرسشنامه‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 و بر اساس آزمون chi square بررسی شد. همچنین درخت فیلوژنیکی با استفاده از نرم‌افزار Mega4، به‌روش Neihbor-joinig (J) و با تخمین فواصل ژنتیکی به‌کمک ماتریکس دو پارامتری Kimura رسم گردید.

یافته ها:

تکثیر ناحیهS ژن HBV : در این مطالعه از تمام ۵۸ نمونه سرم بیماران حامل HBs Ag، DNA استخراج شد و به‌وسیله Nested PCR ژن ناحیه S به‌اندازه bp ٤۰۲ تکثیر گردید و با استفاده از ژل آگاروز ۲ درصد الکتروفورز شد (شکل ۱).



شکل۱: محصول واکنش PCR نمونه بیماران بر روی ژل آگارز ۱٪.

ردیف ۱و۳: نمونه بیماران مبتلا به‌عفونت HBV

ردیف۲و٤: نمونه بیماران مبتلا به‌عفونت همزمان HIV/HBV.

ردیف M : سایز مارکر (1kb ladder, Fermentas)

تجزیه و تحلیل اطلاعات پرسشنامه بیماران: میانگین سنی ۳۰ بیمار مبتلا به‌عفونت HBV به‌تنهایی ۱۲/۵٦ ± ۳۷/٦۳ و ۲۸ بیمار مبتلا به‌عفونت همزمان HIV/HBV ۹/۷۵۸ ± ۳٤/۳٤ بود.

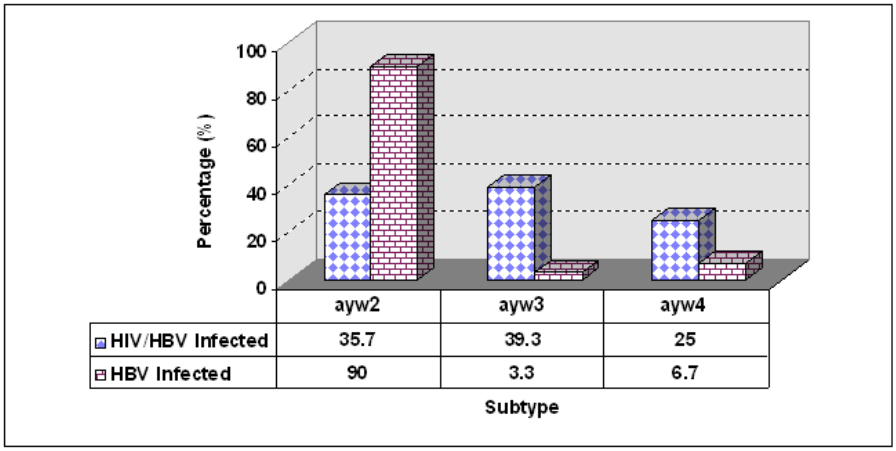
با توجه با اطلاعات گرفته شده از مراکز درمانی ۱۹ نفر(٦۳/۳٪) از ۳۰ بیمار مبتلا به هپاتیت B و ۱۷ نفر (٦۰/۷٪) از ۲۸ بیمار دچار عفونت همزمان (HIV/HBV)، HBe Ag منفی بودند. ارتباط معناداری بین نوع عفونت (عفونتHBV به‌تنهایی و یا عفونت همزمان HIV/HBV)و نتیجه تست HBe Ag در این بیماران مشاهده نگردید (P> 0.05). میانگین میزان آنزیم ALT در بیماران دچار عفونت HBV به‌تنهایی، U/lit ٦۲/٦٦ و در بیماران دچار عفونت همزمان HIV/HBV ، U/lit ۵۸/۲۸ بود(جدول ۱).

جدول۱: توزیع فراوانی ساب تایپ‌های HBV ، وجود HBeAg و میزان آنزیم کبدی ALT به تفکیک نوع عفونت (عفونتHBV تنهایی و عفونت همزمان HIV/HBV)

متغییر	بیمار دچار عفونت همزمان HIV/HBV	به تنهایی HBV بیمار دچار عفونت	(P Value)
تعداد	۲۸	۳۰	-
میانگین سن	۳۷ /٦۳ ± ۱۲/۵٦	۳٤/۳٤ ±۹/۷۵	>0. 05*
HBe Ag منفی	۱۹ بیمار (٦۳/۳۳٪)	۱۷بیمار (٦۰/۷۱٪)	>0. 05*
ALT (U/lit) میزان آنزیم کبدی	۵۸/۲۸	٦۲/٦٦	>0. 05*
ساب‌تایپ ayw2	۱۰ بیمار (۳۵/۷٪)	۲۷ بیمار (۹۰٪)	<0.001**
ساب تایپayw3	۱۱ بیمار(۳۹/۳٪)	۱ بیمار (۳/۳٪)	
ساب‌تایپ ayw4	۷ بیمار(۲۵٪)	۲ بیمار (٦/۷٪)	

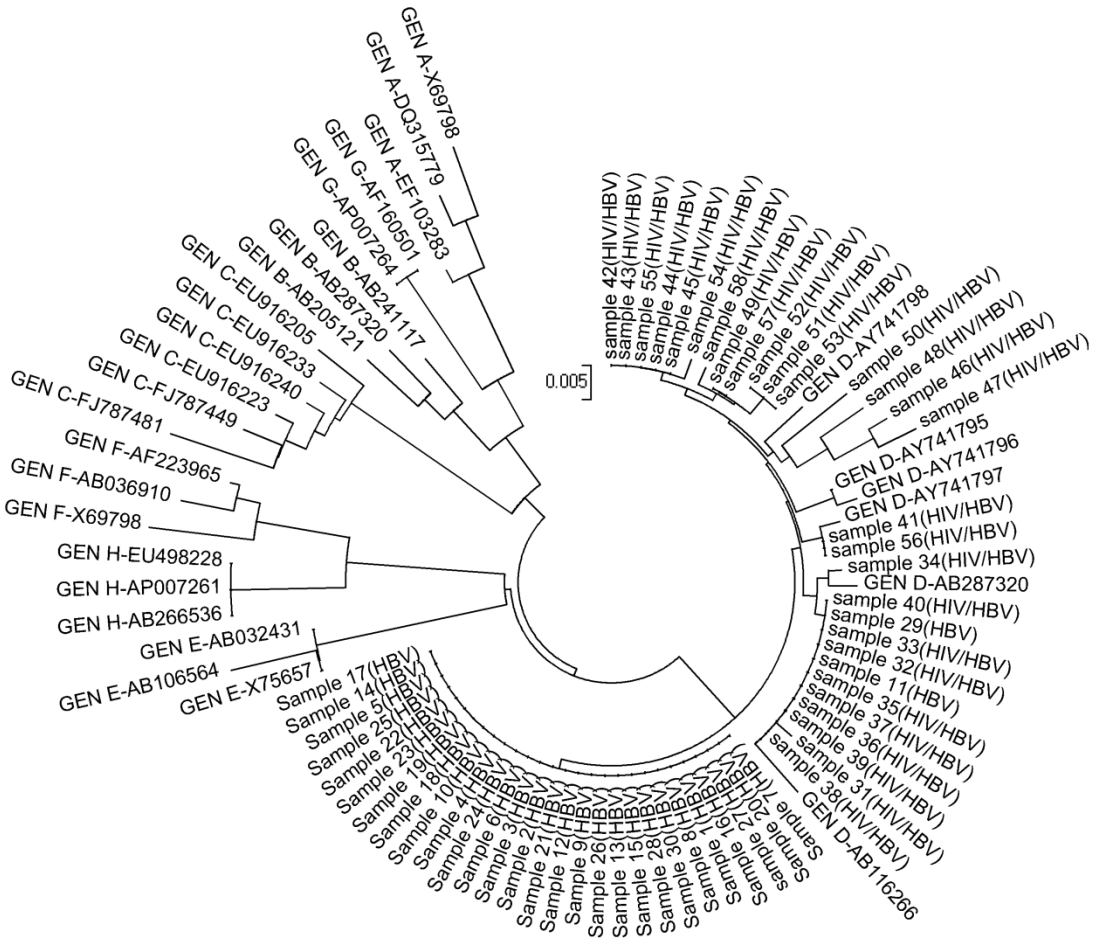
*- فاقد ارتباط معنادار می‌باشد. **- دارای ارتباط معنادار می‌باشد.

تعیین ژنوتایپ و ساب‌تایپ‌ها: بر اساس تجزیه و تحلیل داده‌های توالی یابی، کلیه بیماران HBV مورد مطالعه دارای ژنوتایپ D بودند (جدول۱). در ۲۸ بیمار دچار عفونت همزمان HIV/HBV، ۱۰ بیمار (۳۵,۷٪) ساب‌تایپ ayw2 ، ۱۱ بیمار(۳۹,۳٪) ساب تایپayw3 و ۷ بیمار(۲۵٪) ساب تایپ ayw4 را داشتند. از۳۰ بیمار دچار عفونت HBV به‌تنهایی، ۲۷ نفر (۹۰٪) ساب‌تایپ ayw2 ، ۱ نفر (۳,۳٪) ساب‌تایپ ayw3 و ۲ نفر (٦,۷٪) ساب‌تایپ ayw4 را دارا بودند. بین نوع عفونت (عفونت HBV به‌تنهایی و یا عفونت همزمان(HIV/HBV) و نوع ساب‌تایپ HBV ارتباط معنادار (P <0.001) بود (نمودار۱).



نمودار۱: توزیع فراوانی درصد ساب‌تایپ‌های HBV در بیماران مبتلا به‌عفونت همزمان HIV/HBV و بیماران مبتلا به‌عفونت HBV به‌تنهایی.

همچنین نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل اطلاعات، به‌صورت درخت فیلوژنیک نمایش داده شد (شکل۲).



شکل۲: درخت فیلوژنیکی با استفاده از روش NJ بر روی ۵۸ نمونه جدا شده از بیماران ایرانی دارای عفونت HBV و یا عفونت همزمان HIV/HBV به‌همراه تعدادی ژنوم HBV به‌عنوان رفرانس (نمایش داده شده) رسم گردید. (تخمین فواصل ژنتیکی با استفاده از ماتریکس دو پارامتری Kimura محاسبه و مقادیر Bootstrap با ۱۰۰۰ بار تکرار محاسبه گردیده است).

بحث:

عفونت‌های HBV و HIV از جمله معضلات بهداشت جهانی می‌باشند که از طریق راه‌های مشترک سبب آلودگی افراد می‌گردند. ژنوتایپ‌های HBV دارای توزیع جغرافیایی متمایزی هستند. ژنوتایپ D گسترش جهانی دارد ولی بیشترین فراوانی آن در جنوب اروپا، خاورمیانه، شمال آمریکا، هند و آفریقا است. این ژنوتایپ در تمام مطالعات انجام شده بر روی بیماران ایرانی تنها ژنوتایپ موجود، گزارش شده است (۱۳، ۱٤). همچنین مطالعات انجام شده در سال‌های اخیر حاکی از وجود رابطه معنادار بین نوع ژنوتایپ HBV با شدت بیماری، مقاومت در برابر داروهای ضد ویروسی وسرولوژی بیماری است (۱۵). تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی ژنوتایپ و ساب‌تایپ

HBV ابزارهای مناسبی برای مشخص کردن اپیدمیولوژی هپاتیت B هستند (۱۶). از میان هشت ژنوتایپ (A-H) و ۹ ساب تایپ ویروس هپاتیت B(ayw1، ayw2، ayw3، ayw4، adw2، ayr، adrq، adrq◌ و adw3) ژنوتایپ تمام بیماران مطالعه حاضر از نوع D است که با نتایج سایر مطالعات انجام شده (۱۳،۱٤)، مشابهت دارد. از سوی دیگر در این مطالعه که به‌بررسی ژنوتایپ و ساب‌تایپ HBV در دو دسته بیماران مبتلا به‌عفونت همزمان HIV/HBV و بیماران دارای عفونت HBV به‌تنهایی، پرداخته است، تفاوت چشمگیری بین نوع سروتایپ و نوع عفونت (عفونت همزمان HIV/HBV و عفونت HBV به‌تنهایی) مشاهده شد (P <0.001). به‌طوریکه فراوانی ساب‌تایپ‌های ayw4, ayw3 در بیماران دچار عفونت همزمان HIV/HBV نسبت به‌بیماران دچار عفونت HBV به‌تنهایی، به‌طور قابل ملاحظه و معنادار بیشتر بود.

مطالعات گوناگون در سرتاسر جهان حاکی از افزایش مقاومت دارویی، بالا رفتن میزان ویروس HBV، تغییر در سرولوژی HBV ، پیشرفت بیماری به‌سمت سیروز کبدی و افزایش مرگ ناشی از آن در بیماران مبتلا به‌عفونت همزمان HIV/HBV نسبت به‌بیماران مبتلا به‌عفونت هپاتیتB به‌تنهایی می‌باشد(۸). در مطالعاتی که به‌طور همزمان بر روی این دو دسته بیمار در سایر نقاط جهان انجام گرفته است حاکی از فراوانی افراد HBe Ag منفی در بیماران مبتلا به‌عفونت همزمان HIV/HBV است که به‌طور قابل ملاحظه کمتر از بیماران مبتلا به‌HBV به‌تنهایی است (۱۷، ۱۸) در حالیکه در مطالعه حاضر فراوانی HBe Ag منفی در هر دو گروه مورد مطالعه، تفاوت معناداری (P> 0.05) با نوع عفونت نداشت. با توجه به‌تعداد نمونه بررسی شده، تحقیقات گسترده‌تر و جامع‌تر در آینده ضروری به‌نظر می‌رسد.

نتیجه‌گیری:

باتوجه به‌نتایج این مطالعه، احتمال وجود عفونت همزمان HIV/HBV در بین بیماران مبتلا به‌عفونت HBV با ساب‌تایپ ayw3وayw4 بیشتر از افراد با ساب‌تایپ ayw2 است. این امر می‌تواند با انجام مطالعات گسترده‌تر در شناسایی و کنترل بیماری در این افراد و تمهیدات لازم در جهت درمان آنها موثر واقع گردد.

فهرست مراجع:

1.Baig S, Siddiqui AA, Ahmed W, Qureshi H, Arif A. The association of complex liver disorders with HBV genotypes prevalent in Pakistan. *Virol J* 2007; 4:128-135.

2. Hou J, Liu Z, Fan G. Epidemiology and prevention of hepatitis B virus infection. *Int J Med Sci* 2005; 2:50-57.

3.Cao GW. Clinical relevance and public health significance of hepatitis B virus genomic variations. *World J Gastroenterol* 2009 ; 15(46):5761-5769.

4. Collier L, Balows A, Sussam M, Topley and Wilson . *Microbiology and microbial infections*. 9th ed. Londres; Arnold publication.1988; PP:733-745

5. Warner C. A history of AIDS: Looking back to see ahead. *Eur.J.Immunol* 2007; 37: 94-102.

6. Twu SJ, Detels R, Nelson K, Visscher BR, Kaslow R. Relationship of hepatitis B virus infection to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Infect Dis* 1993; 167:299-304.

7. Ramos B, Nunez M, Martin L, Sheldon J, Rios P, Labarga P, *et al*. Hepatitis B virus genotypes and lamivudine resistance mutations in HIV/Hepatitis B virus – coinfected patients .*J Acquir immune defic syndr* 2007; 44:557-561.

8. Marion G. Diagnosis and Management of Hepatitis B Virus and HIV Coinfection. *Top HIV Med* 2007; 15(5):163-166.

9. Schaefer S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J Gastroenterol* 2007; 13:14-21.

10. Teles SA, Martins RM, Gomes SA. Hepatitis B virus transmission in Brazilian hemodialysis units, Serological and

molecular follow-up. *J Medl Virol* 2002; 68:41-49 .
11. Amini-Bavil-Olyaee S, Alavian SM, Adeli A, Sarrami-Forooshani R, Sabahi F, Sabouri E, *et al*. Hepatitis B virus genotyping, core promoter, and precore/core mutations among Afghan patients infected with hepatitis B. *J Med Virol* 2006; 78(3):358-64.
12. Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 2004; 5: 150-163.
13. Bahramali G, Sadeghizadeh M, Amini-Bavil-Olyaee 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; 14(35):5448-5453.
14. Mohebbi SR, Amini-Bavil-Olyaee S, Zali N, Noorinayer B, Derakhshan F, Chiani M, *et al*. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Iran, *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 858–866.
15. Mahtab M, Rahman S, Khan M, Karim F. Hepatitis B virus genotypes: an overview.*Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2008; 7(5):457-64.
16. Thippavazzula R, Mogili C, Chandra M, Khaja MN, Habeeb MA, Habibullah CM. Prevalent HBV genotypes and subtypes in a South Indian population. *J Clin Virol* 2006; 37:58–64 .
17. Svicher V, Gori C, Trignetti M, Visca M, Micheli V, Bernassola M, *et al.* The profile of mutational clusters associated with lamivudine resistance can be constrained by HBV genotypes. *J Hepatol* 2009; 50(3):445-8.
18. Preiss S, Littlejohn M, Angus P, Thompson A, Desmond P, Lewin SRDesmond P, Lewin SR, *et al*. Defective hepatitis B virus DNA is not associated with disease status but is reduced by polymerase mutations associated with drug resistance polymerase mutations associated with drug. *Hepaology* 2008; 48 (3):741-749.