

Lamivudin Tedavisi Alan Kronik Hepatit B Hastalarında Direnç Mutasyonlarının Moleküler Yöntem ile Belirlenmesi

Sevin KIRDAR*, Mehmet Hadi YAŞA**, Neriman AYDIN*, Berna GÜLTEKİN KORKMAZGİL*

* Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın

** Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Bilim Dalı, Aydın

ÖZ

Amaç: Hepatit B virüs (HBV) enfeksiyonu önemli bir sağlık sorunu olup, tüm dünyada morbidite ve mortalitenin başlıca nedenlerinden biridir. Bu virüsün neden olduğu enfeksiyonun kronikleşmesi karaciğerde fibrozis, siroz ve kansere yol açabilmektedir. Kronik hepatit B tedavisinde kullanılan antivirallere karşı gelişen dirençte yıllar içinde artış olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızda, multipleks PCR ve ters hibridizasyon yöntemi ile lamivudin (LAM) tedavisi alan kronik hepatit B hastalarında ilaç direnci mutasyonlarının sıklığı ve mutant suş tiplerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışma prospektif, tanımlayıcı temelde gerçekleştirilen epidemiyolojik bir çalışmadır. Çalışmaya Mayıs 2007-Ocak 2012 tarihleri arasında Adnan Menderes Üniversitesi Hastanesi Gastroenteroloji Polikliniği'nde kronik hepatit B (KHB) tanısıyla izlenen ve bir yıl süre ile LAM kullanan 50 hasta alınmıştır. Bütün örnekler HBsAg, anti-HBs, anti-HBc total, HBeAg, AntiHBe göstergelerini belirlemek için kemilüminesan immünolojik yöntem ile Architect otoanalizöründe çalışılmıştır. Serum örneklerinden HBV DNA izolasyonu ticari bir kit (Roche Diagnostic, Almanya) ile üretici firma önerileri doğrultusunda yapılmıştır. HBV DNA düzeyleri gerçek zamanlı PCR yöntemi (COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan, Roche, ABD) ile belirlenmiştir. HBV'ünde LAM direncine neden olan mutasyonlar multipleks PCR ve ters hibridizasyon yöntemi ile araştırılmıştır.

Bulgular: Çalışmamızda bir yıl lamivudin tedavisi almış, kronik B hepatitli 50 hastanın 12'sinde (%24) primer ve kompensatuvar (onarıcı) mutasyonlar belirlenmiştir. Mutasyon saptanan hastalardan altısında (%50) LAM direnci (rtM204I, YIDD motifi) tek başına, dördünde (%33.3) LAM ve ADV direnci birlikte ve iki hastada (%16.7) LAM ve ADV direnci ile kompensatuvar mutasyonlar saptanmıştır.

Sonuç: Çalışmamızda, en sık rtM204I ve rL180 mutasyonları belirlenmiştir. Aydın ilinde lamivudin kullanan kronik hepatit B hastalarında, LAM direnci ülkemizde yapılan önceki çalışmalardakine benzer oranda bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Direnç, hepatit B virus, lamivudin, mutasyon

ABSTRACT

Detection of Resistance Mutations Using Molecular Method in Chronic Hepatitis B Patients Receiving Lamivudine Therapy

Objective: Hepatitis B virus (HBV) infection is a global health problem and major cause of morbidity and mortality worldwide. Chronic HBV infection leads to cirrhosis, liver failure and hepatocellular carcinoma. Increased resistance to antivirals that are used to treat chronic hepatitis B is observed over the years. In this study, we aimed to determine the frequency of lamivudine (LAM) resistance seen in chronic hepatitis B patients and the mutant profiles using multiplex PCR and reverse hybridization methods.

Material and Methods: This prospective, descriptive study was conducted between May 2007 and January 2012. A total of 50 subjects that were followed-up for chronic hepatitis B and receiving LAM therapy for at least one year at the Adnan Menderes University Faculty of Medicine, Department of Internal Medicine, Outpatient Clinics of Gastroenterology Unit were included in this study. Markers of HBsAg/anti-HBs, hepatitis B e antigen (HBeAg)/anti-HBe, and anti-HBc were studied using the Architect instrument Assay. The isolation of nucleic acid from serum samples was performed using a commercial kit (Roche Diagnostic, Germany) according to the manufacturer's instructions. HBV-DNA levels were determined using a commercial real-time polymerase chain reaction method (COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan, Roche, USA). Mutations of LAM resistance was determined by multiplex PCR and reverse hybridization method.

Results: Primary and compensatory mutants were detected in 12 patients (24%) who had been using lamivudine for one year. Six of 12 (50%) patients were found to be resistant to LAM (rtM204I, YIDD motif) or LAM and ADV (n=4; 33.3%). In 2 (16.7%). patients, resistance to LAM+ADV together with compensatory mutations were detected.

Conclusion: The most commonly detected mutations are rtM204I and rL180 mutations. Lamivudine resistance in chronic hepatitis B patients in our locality of Aydın province is similar to the results of other studies in our country.

Keywords: Resistance, Hepatit B virus, lamivudine, mutation

Alındığı tarih: 11.11.2016

Kabul tarihi: 08.12.2016

Yazışma adresi: Sevin Kırdar, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın

e-posta: sevikirdar@yahoo.com

GİRİŞ

Hepatit B virüs (HBV) enfeksiyonu tüm dünyada morbidite ve mortalite açısından önemli bir sağlık sorunudur⁽¹⁾. Bu virüsün neden olduğu enfeksiyonun kronikleşmesi fibrozis, siroz ve karaciğer kanserine yol açabilmektedir⁽²⁾. Kronik hepatitlerde tedavi kararı, hangi tedavinin uygulanacağı ve tedavi sonrası izlem önem taşır. Hepatit B virüsünde görülen mutasyonlar hem tedavi kararını etkiler hem de tedaviye yanıtı değiştirir⁽³⁾. Günümüzde kronik HBV enfeksiyonunun tedavisinde kullanılan ilaçlar immün modülatörler (alfa interferon ve pegillenmiş formları) ve antiviral ilaçlardır. Antiviral ilaçlar, nükleozid ve nükleotid analoglarından oluşurlar ve günümüzde bunlar arasından lamivudin [LAM], adefovir [ADV], entekavir [ETV], tenofovir [TDF] ve telbivudin [LdT]) tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır⁽⁴⁾.

Kronik hepatit B tedavisinde antiviral ilaçların kullanıma girmesi ile bu ilaçlara karşı gelişen direnç mutasyonları bildirilmeye başlanmış ve yıllar içinde direnç sıklığında artış gözlenmiştir. Antiviral ilaç direnci HBV'nin polimeraz revers transkriptaz (rt) bölgesinde oluşan mutasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır⁽⁵⁾.

Lamivudin etkinliği, güvenilirliği ve maliyeti gibi nedenlerle kronik hepatit B tedavisinde ilk seçenek olarak kullanılan antiviraldir⁽⁶⁾. Lamivudinin HBV'ye karşı kuvvetli ve hızlı gelişen antiviral etkisinin yanı sıra ciddi yan etkilerinin olmaması ve kullanım kolaylığı yaygın olarak kullanılmasına neden olmuştur⁽⁷⁾. LAM için yanıt kaybı ve histolojik progresyon ile sonuçlanan direnç gelişimi en önemli sorunlardan birisidir. Bu nedenle uzun süreli lamivudin tedavisi sırasında ortaya çıkabilecek primer ve kompensatuvar mutasyonların belirlenmesi önemlidir⁽⁶⁾. Lamivudin direncine yol açan mutasyonlar, genellikle revers transkriptazın C bölgesinde yer alan YMDD (Y: tirozin, M: metiyonin, D: aspar-

tik asit, D:aspartik asit) motifindedir. YMDD mutasyonlu olgularda metiyonin (M) yerine valin (V) (M204V dizayn olarak YVDD) ve/veya izolösün (I) (M204I dizayn olarak YIDD) ile yer değiştirmiş şekilde görülür^(8,9). Hepatit B tedavisinde kullanılan lamivudine yanıt veremeyen hastalarda en sık görülen mutasyon, revers transkriptaz enziminin 204 no.lu kodonunda görülen rtM204V/I (YMDD) mutasyonudur. rtM204V/I mutasyonu ile birlikte kompensatuvar rtL180M ve rtA181T mutasyonları oluşabilir. Bu kompensatuvar mutasyonlardan rtA181T, ADV kullanımı sırasında da ortaya çıkabilir. Lamivudin dirençli suşlarda kompensatuvar olarak rtV173L ve rtL80V/I değişiklikleri de görülebilmektedir⁽⁵⁾.

Lamivudin tedavisi alan hastalarda YMDD mutasyon oranları tedavinin birinci yılında yaklaşık %23 iken, tedavinin 4-5. yıllarından sonraki oranlar ise %70-80'leri bulmaktadır⁽¹⁰⁾. Mutasyonların erken belirlenmesi, klinik değişiklikleri anlamak ve tedavi değişikliklerini hızlandırmak için gereklidir⁽¹¹⁾.

Günümüzde HBV antiviral ilaç direncini belirlemede kullanılan genotipik yöntemler arasında dizi analizi, PCR-RFLP (Restriction fragment length polymorphism) ve ters hibridizasyon (Line probe, Lipa DR) yöntemi bulunmaktadır^(12,13). Antiviral direnci belirlemede doğrudan dizi analizi ile ters hibridizasyon yöntemleri en yaygın kullanılan yöntemlerdir. Dizi analizinin en önemli dezavantajı, tüm HBV popülasyonunda %30'dan az oranda görülen minör türleri saptamada yetersiz kalmasıdır. Ters hibridizasyon yöntemi, viral popülasyonda %5 kadar az oranda ortaya çıkan mutantları saptayabilen, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek bir test olup, dezavantajı yalnızca bilinen mutasyonları saptayabilmesidir⁽¹⁴⁾.

Çalışmamızda lamivudin tedavisi alan kronik Hepatit B hastalarında ilaç direnci mutasyonları

nın sıklığı ve dirençten sorumlu olan mutant suş tiplerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma prospektif, tanımlayıcı temelde gerçekleştirilen epidemiyolojik bir çalışmadır. Çalışmaya Mayıs 2007-Ocak 2012 tarihleri arasında Adnan Menderes Üniversitesi Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Gastroenteroloji Polikliniği'ne başvurmuş, kronik hepatit B tanısı almış 50 hasta dâhil edildi. Çalışmada yer alan 50 hastanın 32'si (%64) erkek, 18'i (%36) kadın olup, yaş ortalaması 46.90 ± 13.14 (yaş aralığı: 21-77 yıl) yıldır. Hastaların tamamı bir yıl süre ile LAM kullanmış hastalardan oluşmaktaydı. Çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projesi Birimi'nce desteklendi (Proje No:060018) ve Adnan Menderes Üniversitesi Üniversitesi Tıbbi Etik Kurul'undan onay alındı (protokol no: 2006/123). Hastalardan alınan kan örneklerinden santrifüj sonrası ayrılan serumları çalışma zamanına kadar -80°C 'de saklandı.

HBV serolojisi (HBsAg, anti-HBs, anti-HBc total, HBeAg, AntiHBe) kemilüminesan immünoyöntem ile Architect otoanalizöründe (Abbott, Almanya) çalışıldı. Serum örneklerinden $200 \mu\text{l}$ kullanılarak High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Diagnostic, Almanya) ile üretici firma önerileri doğrultusunda nükleik asit izolasyonu yapıldı ve HBV DNA düzeyleri gerçek zamanlı PCR (COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan, HBV test, version 2.0, Roche, ABD)

yöntemi (saptama aralıkları: 20 IU/ml - $20 \times 10^7 \text{ IU/ml}$) ile belirlendi.

Lamivudin direnç mutasyonlarını belirlemek için hasta serumlarından HBV DNA izolasyonu QIAamp viral DNA mini izolasyon kiti (Qiagen, Almanya) ile üretici firmanın protokolüne göre yapıldı. Lamivudine karşı gelişen genotipik direnç ters hibridizasyon yöntemi esaslı Inno Lipa HBV DRv2 kiti (Innogenetics, Belçika) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda araştırıldı. Bu testte kısaca, HBV DNA izolasyonundan sonra Hot Start Taq DNA polimeraz kullanarak çoğaltma işlemi yapıldı, ardından çoğaltılan DNA ürünleri ters hibridizasyon yöntemi ile problemler ile kaplanmış stripler üzerinde gösterildi.

Tanımlayıcı istatistik parametrelerinin (ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum) analizi için SPSS 18 (SPSS Inc, ABD) programı kullanıldı.

BULGULAR

Çalışmada yer alan hastaların HBV DNA düzeyleri 1770 ile $22.1 \times 10^7 \text{ IU/ml}$ arasında (ortalama: $4.5 \times 10^7 \pm 73.56$), ALT düzeyleri 12 ile 337 IU/ml (ortalama: 48.41 ± 62.66) arasında değişmektedir. Hastaların demografik ve klinik özellikleri ile mutasyon oranları Tablo 1'de sunulmuştur.

Çalışmamızda bir yıl lamivudin tedavisi kullanmış, kronik hepatitli 50 hastanın 12'sinde (%24) LAM direnci belirlenmiştir. On iki hastanın 6 (%50)'sında tek başına rtM204I (YIDD motifi)

Tablo 1. Hastaların demografik ve klinik özellikleri ile mutasyon oranları.

Parametreler	
Yaş ortalaması (Yaş aralığı)	46.90 ± 13.14 (21-77)
Cinsiyet, E/K, (n,%)	32/18 (64/36)
HBV DNA Ortalama (minimum-maksimum), (IU/ml)	$4.5 \times 10^7 \pm 73.56$ ($1770-22.1 \times 10^7$)
ALT, Ortalama (minimum-maksimum), (IU/ml)	48.41 ± 62.66 (12-337)
Mutasyon saptanan (n,%)	12 (24)
Mutasyon saptanmayan (n,%)	38 (76)

E: Erkek; K: Kadın; ALT: alanin aminotransferaz.

Tablo 2. Lamivudin direnci belirlenen on iki hastadaki mutasyonların dağılımı.

Hasta	Cins/Yaş	HBV DNA Düzeyi IU/ml	Mutasyon	İlaç Direnci
1	E/63	221.000.000	rtL180M, rtA181T, rtM204I	LMV ve ADV
2	E/71	188.000.000	rtL180M, rtA181T	LMV ve ADV
3	K/39	48.100	rtL180M, rtA181T, rtM204I, rtV80I	LMV ve ADV + kompensatuvar
4	E/61	6.400	rtM204I	LMV
5	E/27	14.300	rtM204I	LMV
6	E/51	6.920	rtM204I	LMV
7	K/39	1.770	rtM204I	LMV
8	K/51	6.170	rtL180M, rtA181T, rtM204I, rtV80I	LMV ve ADV+ kompensatuvar
9	E/37	18.700	rtM 204I	LMV
10	E/49	2.990.000	rtM 204I	LMV
11	K/53	418.000	rtL180M, rtA181T	LMV ve ADV
12	K/24	81.486.830	rtL180M, rtA181T	LMV ve ADV

E:Erkek; K:Kadın; ALT: alanin aminotransferaz.

mutasyonu, dördünde (%33) LAM ve ADV direnci ile birlikte, iki hastada (%16.7) LAM/ADV+kompensatuvar mutasyon belirlenmiştir. Çalışmamızda saptanan antiviral direnç mutasyonları Tablo 2’de sunulmuştur.

TARTIŞMA

Kronik HBV enfeksiyon tedavisinde LAM en yaygın olarak kullanılan antiviraldir, ancak uzun süre tek başına kullanılması sonucunda direnç gelişir. Genotipik ilaç direncinin tespit edilmesi ile erken dönemde dirençli ilacın yerine, farklı bir ilaca geçerek tedaviyi değiştirmek ve başarı oranını arttırmak olası olabilmektedir. Lamivudin ile tedavide birinci yıldan sonra direnç gelişme oranları %20-25 arasında değişirken bu oran 5 yıl sonra %80 oranına ulaşır^(15,16). Bu çalışmada, bir yıl süre ile LAM kullanmış 50 hastanın 12’sinde (%24) LAM direncine neden olan mutasyonların varlığı belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda, LAM dirençli suş oranları ve direnç tipleri farklılık göstermektedir^(8-10,17-21).

Hepatit B virüsün polimeraz enzimini kodlayan P bölgesi 6 bölgeye ayrılır (A, B, C, D, E, F ve G). Nükleozid/nükleotid analogları ile ilişkili mutasyonlar en çok A, B, C ve D bölgelerinde gelişir. Bu mutasyonlar başlıca primer ilaç mutasyonları (rtI169T, rtA181T/V, rtT184A/C/F/G/I/L/M/S, rtA194T, rtS202C/G/I,

rtM204I/V/S, rtN236T, rtM250I/L/V) ve kompensatuvar mutasyonlar (rtL80I/V, rtV173L, rtL180M) olmak üzere iki grupta toplanırlar^(22,23). Lamivudin için 5 farklı direnç paterni; rtM204I, rtL180M + rtM204I, rtL180M + rtM204V, rtV173L + rtL180M + rtM204V, rtL80V/I + rtL180M + rtM204I mevcuttur⁽²⁴⁾.

Çalışmamızda en sık görülen LAM direnç mutasyonu %50 oranı ile rtM204I mutasyonu olmuştur. İkinci sıklıkta rt L180M, A181T mutasyonları tek başına ya da rtM204I ile birlikte gözlenmiştir. rtM204I ile birlikte diğer kompensatuvar mutasyonlardan rtV80I ise %16.7 oranında bulunmuştur. Kompensatuvar mutasyonlardan en yaygın görülen rtL180M (lösinmetionin değişikliği) mutasyonu olup, rtM204V/I mutasyonu içeren HBV polimerazın replikasyonuna yardımcı olur⁽²⁵⁾.

Cao ve ark.’nın⁽¹⁷⁾ yaptığı çalışmada, LAM tedavisi sonrasında 53 hastanın 18’inde (%33.9) YMDD mutasyonu bildirmişlerdir. Bu çalışmada, rtL180M/M204V, rtL180M/M204I, rtL180M ve rtM204I, olmak üzere 4 farklı mutasyon tipi belirlemişlerdir. Arslan ve ark.⁽¹⁸⁾ çalışmaya alınan 20 olguya ait örneğin 12’sinde (%60) lamivudin direncine neden olan YMDD motif değişikliği belirlemişlerdir. Motif değişikliği olan 12 HBV-DNA örneğinin 11 (%91.6)’inde, YMDD değişikliği ve yaygın tip (wild type) kombinasyonları

yonu birlikte saptanmış, ayrıca izole YMDD değişikliği ve YVDD ya da YIDD kombinasyonları da gözlenmiştir. Akarsu ve ark.⁽⁹⁾ inaktif hepatit B taşıyıcılarında Inno-Lipa testi ile yaptıkları çalışmada, 71 anti-HBe pozitif HBV taşıyıcısının 13'ünde (%18.3) YMDD motif değişikliği saptamışlardır. Çalışmadaki 13 YMDD motif değişikliğinin 8'ine L180M mutasyonunun eşlik ettiği ve L180M mutasyonu taşıyan olguların tümünde YVDD motif değişikliğinin bulunduğu bildirilmiştir. Kalaycıoğlu ve ark.'nın⁽¹⁹⁾ çalışmalarında, LAM tedavisi almış 25 kronik hepatit B'li hastanın 3 (%12)'ünde yalnızca LAM direnci saptanırken, hâlen LAM tedavisi almakta olan 19 hastanın 9'unda yalnızca LAM direnci, 2'sinde yalnızca ADV ve 1'inde LAM + ADV direnci olmak üzere toplam 12'sinde (%63.2) antiviral direnci belirlenmiştir.

Aydoğan ve ark.'nın⁽²⁰⁾ KHB tanısı ile LAM tedavisi alan 71 hastaya ait serum örneğinde yaptıkları çalışmada, dizi analizi ile olguların %25.5'inde (13/51), LiPA testleri ile de %16'sında (9/56) dirençle ilişkili primer ve kompensatuvar mutasyonlar saptanmıştır. Inno-Lipa HBV DRv2 testi ile LAM direnci ile ilişkili primer ve kompensatuvar çoklu mutasyonlar (bir örnekte L180M + M204I, iki örnekte L80I + L180M + M204I, bir örnekte L80I + M204I ve bir örnekte L80I/V + M204I), LAM direnci ile ilişkili primer tekli mutasyonlar (üç örnekte M204I ve bir örnekte M204V) belirlemişlerdir. Inno-Lipa HBV DRv3 testi ile ise LAM direnci ile ilişkili çoklu mutasyon olan iki örnekte ENT direnci ile ilişkili iki farklı mutasyon (G202 ve ILFM184) varlığı görülmüştür. Alagözlü ve ark.'nın⁽¹⁾ çalışmalarında kronik HBV enfeksiyonlu 41 hastaya ait serum örneklerinin 17'sinde (%41.5) Inno-Lipa HBV DRv2 testi ile YMDD motif mutasyonları saptanmıştır.

İzole YIDD (rtM204I) mutasyonu rt L180M olmaksızın görülebilirken, YVDD (rtM204V) mutasyonuna hemen daima L180M mutasyonu-

nun eşlik ettiği ve bu (rtM204V+rtL180M) mutasyonların izole rtM204I mutasyonuna göre çok daha düşük lamivudin direncine neden olduğu bildirilmektedir⁽²¹⁾. Bu çalışmada, mutasyon saptanan 12 hastadan 6'sında (%50) izole YIDD (rtM204I) tipi mutasyonu belirlenmiştir. Aynı zamanda çalışmamızda, ADV tedavisi almadığı halde 4 hastada ADV direnç mutasyonu (rtA181T) belirlenmesi dikkat çekicidir. Bu nedenle tek başına LAM tedavisi alan hastalarda ADV direnci oluşturan mutasyonların olabileceği unutulmamalıdır.

Sonuç olarak, bu çalışmada, LAM kullanan kronik hepatit B hastalarında %24 oranında saptanan LAM direnci ülkemizin diğer bölgelerine benzer oranda bulunmuştur. İzole (tek başına) LAM direncinin yanı sıra LAM+ADV direnci ile kompensatuvar direnç tiplerinin de önemli oranda görülmüştür. Kronik HBV hastalarında gelişebilecek mutasyon profillerinin belirlenmesinin tedavinin başarısız olduğu durumda uygun antiviral tedavinin yeniden planlanmasında yararlı olacağı düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. **Alagözlü H, Özdemir Ö, Köksal B, Yılmaz A, Coşkun M.** Prevalence of common YMDD motif mutations in long term treated chronic HBV infections in a Turkish population. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14:5489-94. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2013.14.9.5489>
2. **Komatsu H.** Hepatitis B virus: Where do we stand and what is the next step for eradication? *World J Gastroenterol* 2014; 20:8998-9016.
3. **Usluer G.** Kronik Hepatit B ve C'de tanı ve tedavi yaklaşımları. *ANKEM Derg* 2006; 20:37-43.
4. **Beşışık F.** Kronik B hepatiti tedavisinde nukleozid analogları. Tabak F, Balık D, Tekeli E (Ed). *Viral Hepatitle Savaşım Derneği*. 3. Baskı. İstanbul, 2007:196-205.
5. **Leblebicioğlu H.** Hepatit B virüsde antiviral direnç sorunu. *ANKEM Derg* 2008; 22:48-52.
6. **Libbrecht E, Doutreloigne J, Van De Velde H, et al.** Evolution of primary and compensatory lamivudine resistance mutations in chronic Hepatitis B Virus-Infected patients during long-term lamivudine treatment, assessed by a Line Probe Assay. *J Clin Microbiol* 2007; 45:3935-41. <https://doi.org/10.1128/JCM.00020-07>
7. **Çakaloğlu Y.** Hepatit B tedavisi: Kronik hepatit dışı

- indikasyonlar, Ustaçelebi Ş, Badur S, Abacıoğlu H (Ed). Uluslararası Katılımlı I. Ulusal Viroloji Kongresi Konferanslar ve Bildiriler Kitabı. Öncü Basımevi, Ankara, 2003:187-9.
8. **Yuen MF, Kato T, Mizokami M, et al.** Clinical outcome and virologic profiles of severe hepatitis B exacerbation due to YMDD mutations. *J Hepatol* 2003; 39:850-5.
[https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(03\)00388-X](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(03)00388-X)
 9. **Akarsu M, Şengönül A, Tankurt E, et al.** YMDD motif variants in inactive hepatitis B carriers detected by Inno-Lipa HBV DR assay. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21:1783-8.
<https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2006.04567.x>
 10. **Tacke F, Kroy DC.** Treatment for hepatitis B in patients with drug resistance. *Ann Transl Med* 2016; 4:334.
<https://doi.org/10.21037/atm.2016.09.19>
 11. **Ghany MG, Doo EC.** Antiviral resistance and hepatitis B therapy. *Hepatology* 2009; 49(5 Suppl):S174-84.
<https://doi.org/10.1002/hep.22900>
 12. **Rodriguez-Frías F, Tabernero D, Quer J, et al.** Ultra-deep pyrosequencing detects conserved genomic sites and quantifies linkage of drug-resistant amino acid changes in the hepatitis B virus genome. *PLoS One* 2012; 7:e37874.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037874>
 13. **Degertekin B, Hussain M, Tan J, Oberhelman K, Lok AS.** Sensitivity and accuracy of an updated line probe assay (HBV DR v.3) in detecting mutations associated with hepatitis B antiviral resistance. *J Hepatol* 2009; 50:42-8.
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.08.020>
 14. **Yang ZJ, Tu MZ, Liu J, Wang XL, Jin HZ.** Comparison of amplicon-sequencing, pyrosequencing and real-time PCR for detection of YMDD mutants in patients with chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2006; 12:7192-6.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i44.7192>
 15. **Zoulim F, Locarnini S.** Management of treatment failure in chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2012; 56(Suppl 1):S112-22.
[https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(12\)60012-9](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(12)60012-9)
 16. **Delaney WE4th.** Molecular virology of chronic hepatitis B and C: parallels, contrasts and impact on drug development and treatment outcome. *Antiviral Res* 2013;99:34-48.
<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.04.010>
 17. **Cao XX, Li J, Qiu LM, Luo YW, Chen YH, Ran Y.** Identification factors associated with YMDD mutation in patients with chronic hepatitis B receiving lamivudine treatment. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2009;17:641-4.
 18. **Arslan U, Ural O, Findik D.** Lamivudin tedavisi alan kronik hepatit B olgularında Inno-Lipa HBV DR yöntemi ile saptanan YMDD motif değişiklikleri. *Mikrobiyol Bul* 2008; 42:445-50.
 19. **Kalaycı R, Altındış M, Gülamber G, Demirtürk N, Akcan Y, Demirdal T.** Kronik hepatit B ve hepatit C'li hastalarda genotip dağılımı ve hepatit B olgularında direnç paterninin araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2010; 44:237-43.
 20. **Aydoğan S, Ergünay K, Balaban Y, ve ark.** Bir yıldan uzun süreli antiviral ilaç kullanan kronik hepatit B hastalarında direnç mutasyonlarının saptanması. *Mikrobiyol Bul* 2013; 47:472-81.
<https://doi.org/10.5578/mb.5625>
 21. **Lee AJ, Lee CH, Jeon CH.** Analysis of reverse transcriptase gene mutations in the hepatitis B virus at a university hospital in Korea. *Ann Lab Med* 2014;34:230-4.
<https://doi.org/10.3343/alm.2014.34.3.230>
 22. **Ciftci S, Keskin F, Cakiris A, et al.** Analysis of potential antiviral resistance mutation profiles within the HBV reverse transcriptase in untreated chronic hepatitis B patients using an ultra-deep pyrosequencing method. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014;79:25-30.
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.01.005>
 23. **Liu BM, Li T, Xu J, et al.** Characterization of potential antiviral resistance mutations in hepatitis B virus reverse transcriptase sequences in treatment-naïve Chinese. *Antiviral Res* 2010; 85:512-9.
<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.12.006>
 24. **Köse Ş, Turken M, Gül S.** Evaluation of lamivudine resistance assay using a molecular method in patients with chronic hepatitis B. *Viral Hepat J* 2015; 21:17-19.
<https://doi.org/10.4274/vhd.42204>
 25. **Lok AS, Lai CL, Leung N, et al.** Long-term safety of lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2003; 125:1714-22.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2003.09.033>