

ỨNG DỤNG KỸ THUẬT REALTIME PCR TRONG XÁC ĐỊNH KIỂU GEN CỦA VIRUS GÂY VIÊM GAN SIÊU VI B TẠI ĐẮK LẮK

Đỗ Thị Thùy Dương*
TS. Lê Huyền Ái Thủy**

TÓM TẮT

Viêm gan B là một bệnh gây ra bởi virus viêm gan B, có thể là cấp tính hoặc mạn tính. Nhiễm siêu vi viêm gan B là nguyên nhân hàng đầu của bệnh viêm gan mạn tính trên toàn thế giới và những người có nhiễm viêm gan B mạn tính rất có nguy cơ phát triển ung thư gan (ung thư biểu mô tế bào gan). Ngoài ra, virus viêm gan B cũng là nguyên nhân hàng đầu gây ra bệnh xơ gan. HBV được chia thành 8 kiểu gen khác nhau từ A đến H, dựa vào mức độ biến động khoảng 8% hoặc hơn về trình tự nucleotide trên toàn bộ gen virus. Đã có nhiều công bố về kiểu gen và mối tương quan giữa kiểu gen với mức độ trầm trọng của bệnh.

Nghiên cứu này được đặt ra nhằm xác định kiểu gen của các bệnh nhân nhiễm HBV tại khu vực tỉnh Đắk Lắk. Tỷ lệ nhiễm của các kiểu gen HBV được xác định trên cỡ mẫu 100 mẫu là 63 mẫu nhiễm kiểu gen B, 21 mẫu nhiễm kiểu gen C và 16 mẫu nhiễm đồng thời kiểu gen B và C. Đồng thời, một số yếu tố cận lâm sàng quan trọng liên quan đến bệnh như nồng độ HBV DNA trong máu, chỉ số kháng nguyên HBeAg cũng được phân tích mối tương quan trong từng kiểu gen nhiễm. Từ khóa: viêm gan siêu vi B, kiểu gen, realtime PCR

ABSTRACT

Hepatitis B is a disease caused by the hepatitis B virus (HBV), and can be acute or chronic. Infection with hepatitis B virus is the leading cause of chronic hepatitis worldwide and people with chronic hepatitis B infection are at increased risk for developing liver cancer (hepatocellular carcinoma). In addition, the hepatitis B virus is the leading cause of cirrhosis. HBV can be classified into 8 genotypes A through H based on the divergence of 8% or more in the nucleotide sequences of complete genome. The identification of HBV genotypes are more concerned as the relating of HBV genotypes to clinical manifestation, activity of liver disease as well as treatment responses of Hepatitis B.

We carried out this study in order to determine the genotype of HBV-infected patients in the area of Dak Lak Province. Prevalence of HBV genotype was determined on the sample size of 100 by Realtime PCR: 63 samples infected with genotype B, 21 samples infected with genotype C and 16 samples simultaneously infected with genotype B and C. Also, a number of clinical symptoms such as the concentrations of HBV DNA, HBeAg antigen were also analyzed in each genotype.

Key words: Hepatitis B virus, Genotype, Realtime PCR

MỞ ĐẦU

Viêm gan B là một bệnh gây ra bởi virus viêm gan B, có thể là cấp tính hoặc mạn tính. Nhiễm siêu vi viêm gan B là nguyên nhân hàng đầu của bệnh viêm gan mạn tính trên toàn thế giới và những người có nhiễm viêm gan B mạn tính rất có nguy cơ phát triển ung thư gan (ung thư biểu mô tế bào gan). Ngoài ra, virus viêm gan B cũng là nguyên nhân hàng đầu gây ra bệnh xơ gan. Dựa vào mức độ tương đồng về

trình tự nucleotide, người ta xếp các HBV vào 8 kiểu gen (genotype) khác nhau (kí hiệu từ A đến H) với sự khác nhau trên 8% của toàn bộ gen HBV [1, 2] và sự phân bố của các kiểu gen này cũng phụ thuộc vào địa dư [2, 3].

Kiểu gen A thường xuất hiện ở các nước ở tây bắc châu Âu, phía nam Sahara, Ấn độ và Mỹ, trong khi kiểu gen B và C

* Khoa Khoa học Tự nhiên & Công nghệ, Đại học Tây nguyên

** PTK, Khoa Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Mở Tp.HCM

thường gặp ở các nước Đông nam châu Á, Nhật bản và các nước ở Thái bình dương, kiểu gen D thường gặp ở các nước vùng Địa trung hải, kiểu gen E thường gặp ở một số nước tại châu Phi và kiểu gen F thường được ghi nhận tại một số nước ở trung và nam châu Mỹ [4].

Trên thế giới, trong những năm gần đây đã có nhiều công bố về kiểu gen và mối tương quan giữa kiểu gen với mức độ trầm trọng của bệnh. Kiểu gen nhiễm được cho là gắn mật thiết với tình trạng âm ỹ của bệnh (thông qua việc đánh giá hai chỉ tiêu HBcAg, HBeAg); quá trình bệnh sinh của gan, sự trốn thoát của virus HBV khỏi hệ thống miễn dịch, sự đáp ứng thuốc điều trị và kháng thuốc điều trị virus [4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13]. Mức độ nặng của bệnh cũng như sự tiến triển sang viêm gan B mạn tính trong các nghiên cứu trên cho thấy có sự giống nhau ở kiểu gen B và C.

Theo tác giả Akuta N và cộng sự [4] thì sự tiến triển sang xơ gan và ung thư gan trên bệnh nhân nhiễm HBV chiếm tỉ lệ 63% đối với kiểu gen C và 16% ở kiểu gen D và cũng theo tác giả này thì tại Tokyo trong 57 trường hợp viêm gan B cấp kiểu gen A chiếm 22,8%, B chiếm 14% và C là 43,9% , D và F chỉ chiếm 1,8%, trong đó có 15,8% không xác định được kiểu gen; còn trong 1077 trường hợp viêm gan B mạn tính kiểu gen C chiếm một tỉ lệ rất cao là 87,7%, tiếp theo là B với 9,4% còn A là 1,9%, kiểu gen D và F chỉ chiếm 0,2%, có 0,6% không xác định được kiểu gen. Cũng theo tác giả này thì biến chứng nặng trên các bệnh nhân viêm gan mạn thường hay gặp trên các bệnh nhân mang HBV kiểu gen B và C, đặc biệt xơ gan và ung thư gan gặp trên các bệnh nhân mang HBV kiểu gen C hơn kiểu gen B. Một nghiên cứu khác của Xin Ding tại Trung quốc thì kiểu gen C chiếm tỉ lệ cao nhất lên đến 80% các kiểu gen còn lại lần lượt là: kiểu gen A (3%), kiểu gen B (5,5%), kiểu gen D (0,5%) và kiểu gen B + C là 4,4% còn 3,3 % không xác định được kiểu gen [14].

Một nghiên cứu khác ở Nhật bản thực hiện trên 585 bệnh nhân viêm gan mạn cũng chỉ ra rằng những người nhiễm kiểu gen B có sự tiến triển sang xơ gan chậm hơn kiểu gen C [15]. Ba nghiên cứu khác thực hiện trên 490 người Trung quốc và 155 người Nhật cũng đánh giá kiểu gen C phổ biến ở bệnh nhân xơ gan hơn kiểu gen B [7, 16, 17]. Nghiên cứu ở Mỹ cũng cho thấy xơ gan ở những người nhiễm kiểu gen B diễn ra chậm. Ung thư gan cũng diễn ra chậm hơn với kiểu gen B; bệnh nhân có kiểu gen B phát triển thành ung thư gan ở độ tuổi già hơn. Giả thuyết được đặt ra để lý giải cho các ghi nhận này là kiểu gen B cần một thời gian ngắn hơn để tái bản ở mức độ cao, chính vì vậy mà hệ quả là tính chất gây viêm sau đó đối với tế bào gan cũng kém hơn [18]. Tuy nhiên, một nghiên cứu khác ở Đài loan thì lại cho thấy kết quả ngược lại với những công bố trước. Nghiên cứu này chỉ ra rằng kiểu gen B xuất hiện thường xuyên hơn các kiểu gen khác ở những bệnh nhân ung thư gan trước 50 tuổi [7]. Ở Ấn độ, nghiên cứu thực hiện trên 70 bệnh nhân cho thấy kháng nguyên HBcAg dương tính và kháng thể anti-HBeAg âm tính ở độ tuổi trên 25, và thường xuyên chuyển xơ gan ở những người nhiễm kiểu gen A hơn kiểu gen D [8]. Một nghiên cứu khác ở Tây Ban Nha cho thấy (kiểu gen A chiếm 52%, D 35% và F 7%) mức lưu hành của HBcAg trong huyết thanh là tương tự giữa kiểu gen A và D. Tuy nhiên, sự lưu hành của HBeAg, khả năng duy trì hoạt tính sinh hóa của gan và đáp ứng virus học thường kém hơn với bệnh nhân nhiễm kiểu gen A. HBsAg cũng sụt giảm ở mức cao ở những bệnh nhân nhiễm kiểu gen A này [19]. Nghiên cứu ở Thụy sĩ thì lại chứng minh rằng kiểu gen A có mức độ chuyển từ thể cấp sang mạn nhanh chóng hơn kiểu gen D, cũng như khả năng phục hồi sau giai đoạn cấp của những kiểu gen là khác nhau [20]. Mặc dù dữ liệu về sự lưu hành HBcAg trong huyết thanh, bệnh lý của gan, tốc độ chuyển sang xơ gan và ung thư gan giữa tám kiểu gen là chưa thực sự đầy đủ, nhưng một nghiên cứu trên 694

bệnh nhân ở Mỹ đã thống kê kiểu gen A liên quan với sự tồn tại của HBeAg hơn kiểu gen B và D, kiểu gen A, C và D liên quan đến tình trạng phân hủy tế bào gan hơn kiểu gen B [18]. Mỗi liên quan giữa nồng độ HBV DNA và kiểu gen ở các nghiên cứu khác nhau cũng cho thấy có các kết quả trái ngược nhau. Một nghiên cứu chỉ ra rằng nồng độ HBV DNA trong máu cao ở người nhiễm kiểu gen C hơn B [8]. Một nghiên cứu khác trên 694 bệnh nhân giai đoạn III điều trị bằng adefovir dipivoxil cho thấy nồng độ HBV DNA cao hơn ở những người nhiễm kiểu gen C (lúc này chỉ số HBeAg dương tính). Ngược lại, ở những bệnh nhân HBeAg âm tính, nồng độ HBV DNA ở những người nhiễm kiểu gen D cao hơn [4]. Ngược lại, một số hồi cứu [15, 21] thì lại thất bại trong việc chứng minh sự tương quan giữa nồng độ HBV DNA và các kiểu gen nhiễm. Nghiên cứu trên 694 bệnh nhân ở Mỹ cũng không cho thấy có sự khác biệt nào giữa nồng độ HBV DNA và các kiểu gen A, B, C và D [18].

Ở châu Á, sự lưu hành của HBeAg ở những người nhiễm kiểu gen C cao hơn kiểu gen B [15, 18, 21, 22]. Các nghiên cứu này cũng chỉ ra sự lưu hành HBeAg trong huyết thanh xảy ra sớm và ở mức cao đối với bệnh nhân nhiễm kiểu gen B.

Trong nước, chỉ có một vài công bố rải rác về tình hình nhiễm HBV và sự phân bố kiểu gen: tác giả Đông T. H. A và cộng sự (2003) phân tích kiểu gen HBV bằng kỹ thuật Multiplex PCR. Nghiên cứu này được thực hiện trên những bệnh nhân nhiễm siêu vi viêm gan B mạn [23]. Ngoài ra, tác giả Hồ T. Đ và cộng sự (2005) (trích từ nguồn <http://www.drthuthuy.com/reseach/HBVGenotype.html>) công bố xác định kiểu gen trên 122 trường hợp nhiễm HBV mạn tính. Kỹ thuật xác định kiểu gen mà các tác giả sử dụng là PCR kết hợp giải trình tự.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng bộ kit xác định kiểu gen HBV bằng kỹ thuật

Realtime-PCR của công ty Cổ phần & Dịch vụ Việt Á. Tên thương mại của bộ kit này là HBV Genotype PCR plus Kit (VA.A.02-001E). Điểm đặc trưng của bộ kit VA.A.02-001E là: trình tự gen mục tiêu cho phản ứng realtime PCR là vùng gen S trên bộ gen HBV. Cặp mồi sử dụng cho phép nhận bản mọi kiểu gen đã xác định của virus (mồi bảo tồn – consensus primer) và mồi dò (TaqMan probe) ProbeA, B, C bắt đặc hiệu cho lần lượt từng kiểu gen A, B và C được thiết kế bên trong đoạn trình tự nằm giữa hai mồi. Chất đánh dấu huỳnh quang là FAM và chất dập tắt tín hiệu huỳnh quang (quencher) là BHQ1. Mỗi kiểu gen A, B, C được phát hiện riêng biệt trong từng microtube khác nhau (phản ứng singleplex realtime PCR).

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Thu thập mẫu bệnh phẩm và số liệu:

100 mẫu bệnh phẩm huyết thanh được thu tại các phòng khám: 46A Phan Chu Trinh, 10 Ybhi aleo (phòng khám Hoàn hảo) và đã được xác định nhiễm HBV bằng kỹ thuật Realtime-PCR. Thời gian thu mẫu từ tháng 03/2009 đến tháng 09/2010. Các số liệu về giới tính, tuổi bệnh nhân, nồng độ HBV DNA nhiễm trong máu (ghi nhận tại thời điểm thu mẫu), chỉ số kháng nguyên HBeAg và kháng thể anti HBeAg được thu nhận.

Tách chiết acid nucleic

DNA từ mẫu huyết thanh bệnh nhân được ly trích bằng phương pháp sử dụng phenol/chloroform, phỏng theo phương pháp của Chomczynski & Sacchi (1987): 200 ml huyết thanh được thêm vào 900 ml Trizol, pH8. Acid nucleic sau đó được rửa bằng Isopropanol với chất trợ rửa GlycoBlue. Acid nucleic thu được sau rửa được giữ trong dung dịch TE 1X (Tris-EDTA) và bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng.

Realtime PCR

Phản ứng được thực hiện trên máy Mxpro-Mx3005P (Stratagene) với chương trình nhiệt bao gồm 95°C- 5' (1 chu kỳ) và 40

chu kỳ lặp lại với $95^{\circ}\text{C}-15''$, $60^{\circ}\text{C}-1'$. Thể tích hỗn hợp phản ứng PCR realtime là 50 μl bao gồm: $1\times$ dung dịch đệm PCR, 100 nmol/L mỗi và mẫu dò, 400 $\mu\text{mol/L}$ mỗi loại dATP, dGTP, dCTP và dTTP, 1.5 units hot-start Taq DNA polymerase, 3 mmol/L MgCl_2 . 3 kiểu gen của HBV được xác định trong cùng ba phản ứng chứa đầy đủ các môi và mẫu dò đặc hiệu cho mỗi kiểu gen A, B và C.

Xử lý thống kê

Phần mềm SPSS for Win, Ver. 7.5 được sử dụng.

KẾT QUẢ

Tỷ lệ kiểu gen HBV nhiễm

Qua khảo sát trên 100 bệnh nhân nhiễm HBV khám và điều trị tại các cơ sở y tế tỉnh Đắk Lắk, chúng tôi thu được tỷ lệ các kiểu gen của virus gây viêm gan siêu vi B (HBV) được trình bày ở bảng 1.

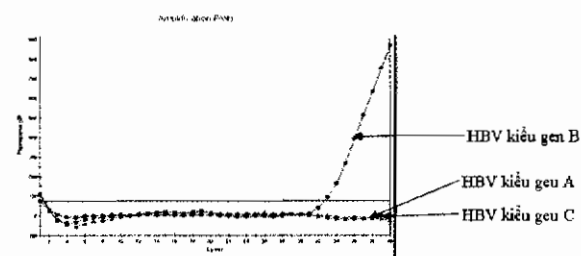
Bảng 1. Tỷ lệ các kiểu gen của HBV trên bệnh nhân tỉnh Đắk Lắk.

Kiểu gen	Số lượng (n = 100)	Tỷ lệ %	p
1. B	63	63	(1-2) < 0,001
2. C	21	21	(1-3) < 0,001
3. B+C	16	16	(2-3) > 0,05

Trong 100 mẫu khảo sát, chúng tôi ghi nhận có 63 mẫu nhiễm kiểu gen B, 21 mẫu nhiễm kiểu gen C và 16 mẫu nhiễm đồng thời kiểu gen B và C.

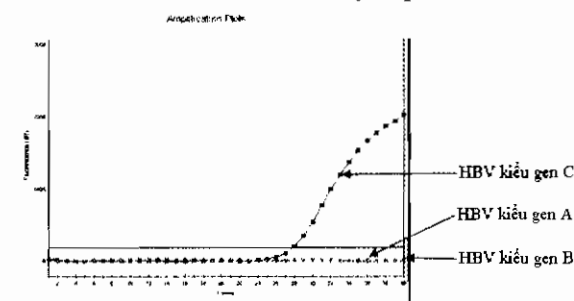
Dưới đây là các biểu đồ biểu diễn một số kết quả xác định kiểu gen của một số mẫu điển hình:

Hình 1. Kết quả xác định kiểu gen bằng realtime PCR trên mẫu bệnh phẩm số 3.



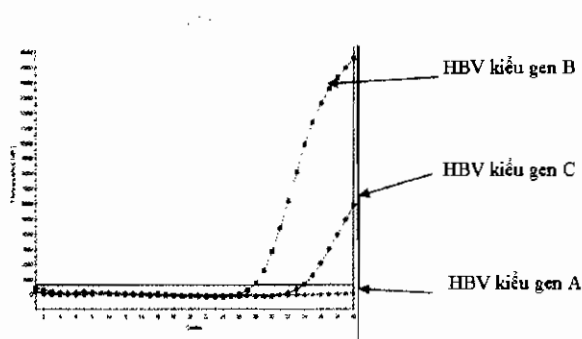
Đồ thị biểu thị ở hình 1 biểu diễn kết quả xác định kiểu gen trên mẫu số 3, mẫu nhiễm kiểu gen B, với tín hiệu huỳnh quang vượt trên tín hiệu nền trong trường hợp tube chứa mẫu dò ProbeB. Đối với hai trường hợp mẫu dò ProbeA và ProbeC, tín hiệu huỳnh quang thấp hơn tín hiệu nền: mẫu âm tính với các kiểu gen A và C.

Hình 2. Kết quả xác định kiểu gen bằng realtime PCR trên mẫu bệnh phẩm số 11.



Đồ thị biểu thị ở hình 2 biểu diễn kết quả xác định kiểu gen trên mẫu số 11, mẫu nhiễm kiểu gen C, với tín hiệu huỳnh quang vượt trên tín hiệu nền trong trường hợp tube chứa mẫu dò ProbeC. Đối với hai trường hợp mẫu dò ProbeA và ProbeB, tín hiệu huỳnh quang thấp hơn tín hiệu nền: mẫu âm tính với các kiểu gen A và B.

Hình 3. Kết quả xác định kiểu gen bằng realtime PCR trên mẫu bệnh phẩm số 19.



Đồ thị biểu thị ở hình 3 biểu diễn kết quả xác định kiểu gen trên mẫu số 19, mẫu đồng nhiễm kiểu gen B và C, với tín hiệu huỳnh quang vượt trên tín hiệu nền trong trường hợp các tube chứa mẫu dò ProbeB và ProbeC. Đối với tube chứa mẫu dò ProbeA, tín hiệu huỳnh quang thấp hơn tín hiệu nền: mẫu âm tính với kiểu gen A.

Tỉ lệ phân bố kiểu gen theo giới

Tỉ lệ phân bố kiểu gen HBV theo giới tính được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Tỉ lệ các kiểu gen của HBV phân bố theo giới tính

KIỂU GEN	Giới tính				p
	Nam		Nữ		
	n	%	n	%	
B (n=63)	39	61,90	24	38,10	< 0,05 (OR=0,69)
C (n=21)	15	71,43	6	28,75	<0,05 (OR=1,45)
B+C (n=16)	11	68,75	5	31,25	< 0,05 (OR= 1,22)

Các số liệu trên bảng 2 cho thấy tỉ lệ kiểu gen B, C và B+C ở nam giới đều cao hơn so với nữ giới ($p < 0,05$): đối với kiểu gen C, tỉ lệ nhiễm ở nam giới cao gấp 1,45 lần so với nữ; đối với kiểu gen B+C, tỉ lệ nhiễm ở nam cao gấp 1,22 lần so với nữ.

Tỉ lệ phân bố kiểu gen theo nhóm tuổi

Tỉ lệ phân bố kiểu gen HBV theo nhóm tuổi được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Tỉ lệ các kiểu gen của HBV phân bố theo nhóm tuổi.

KIỂU GEN	Nhóm tuổi				p
	≤ 25		> 25		
	n	%	n	%	
B (n=63)	25	39,68	38	60,32	< 0,05 (OR=1,37)
C (n=21)	6	28,57	15	71,43	< 0,05 (OR=0,62)
B+C (n=16)	6	37,50	10	62,50	> 0.05

Các số liệu trên bảng 3 cho thấy tỉ lệ kiểu gen B, C và B+C ở các đối tượng có độ tuổi trên 25 đều cao hơn so với các đối tượng có độ tuổi dưới và bằng 25 ($p < 0,05$): đối với kiểu gen B độ tuổi trên 25 cao gấp 1,37 lần độ tuổi dưới 25.

Tỉ lệ phân bố kiểu gen với nồng độ virus trong máu

Tỉ lệ phân bố kiểu gen HBV theo nồng độ virus trong máu của các bệnh nhân được trình bày ở bảng 4. Nồng độ nhiễm cao hơn 104 bản sao/ml máu được ghi nhận là “cao” và ngược lại là “thấp”.

Bảng 4. Tỉ lệ các kiểu gen của HBV phân bố theo nồng độ virus

KIỂU GEN	Nồng độ virus (bản sao/ml)				p
	Cao		Thấp		
	n	%	n	%	
1. B	34	53,97	29	46,03	> 0,05
2. C	12	57,14	9	42,86	> 0,05
3. B+C	14	87,50	2	12,50	< 0,001 (OR=5,78)

Các số liệu ở bảng 4 cho thấy tỉ lệ bệnh nhân nhiễm HBV kiểu gen B, C và B+C có nồng độ virus cao đều cao hơn so với bệnh nhân nhiễm HBV kiểu gen B, C và B+C có nồng độ virus thấp. Tuy nhiên sự khác biệt này chỉ có ý nghĩa thống kê đối với kiểu gen B+C ($p < 0,001$).

Tỉ lệ phân bố kiểu gen với chỉ số kháng nguyên HBeAg

Tỉ lệ phân bố kiểu gen HBV theo chỉ số kháng nguyên HBeAg của các bệnh nhân được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Tỉ lệ các kiểu gen của HBV phân bố theo chỉ số kháng nguyên HBeAg

KIỂU GEN	Kháng nguyên				p
	HBcAg (+)		HBcAg (-)		
	n	%	n	%	
1. B	28	44,44	35	55,56	> 0,05
2. C	6	28,57	15	71,43	< 0,01 (OR=0,50)
3. B+C	7	43,75	9	56,25	> 0,05

Các số liệu ở bảng 5 cho thấy tỉ lệ bệnh nhân nhiễm HBV kiểu gen B, C và B+C có HBeAg (+) đều chiếm tỷ lệ thấp hơn các bệnh nhân nhiễm HBV có kiểu gen B, kiểu gen C, kiểu gen B+C có HBeAg (-). Tuy nhiên sự khác biệt này chỉ có ý nghĩa thống kê đối với kiểu gen C ($p < 0,01$).

BÀN LUẬN

Sự phân bố kiểu gen được phát hiện trong nghiên cứu của chúng tôi là phù hợp với nhận định đã được rút ra từ các nghiên cứu trước đây, đó là kiểu gen B và C thường gặp ở các nước Đông nam Á, Nhật bản và các nước ở khu vực Thái bình dương [1, 2]. Tỉ lệ phân bố kiểu gen trong cỡ mẫu nghiên cứu của chúng tôi là 63% (kiểu gen B), 21% (kiểu gen C) và 16% (kiểu gen B & C); tỉ lệ này khá phù hợp với kết quả ghi nhận trong công bố của hầu hết các tác giả Đông T. H A & cộng sự (2003), Hồ T. Đ & cộng sự (2005), Lui C. J và cộng sự (2002, Đài loan), đó là kiểu gen B thường chiếm tỉ lệ cao so với C. So với một số nghiên cứu dịch tễ về tình hình phân bố kiểu gen tại một số nước châu Á: tại Hồng Kông, Nhật Bản và Đài Loan, tỉ lệ nhiễm kiểu gen B luôn cao hơn kiểu gen C (trích dẫn bởi Alfredo A & cộng sự, 2003) [24], ghi nhận trong nghiên cứu của chúng tôi là hoàn toàn phù hợp. Mặt khác, trong nghiên cứu của tác giả trong nước, Đông T. H A & cộng sự (2003) [23], và hai nhóm tác giả khác ở nước ngoài thuộc khu vực châu Á, Yang J (2002) tại Trung Quốc, Lui C. J. (2002) tại Đài Loan [1]; đã có một tỉ lệ xuất hiện của các kiểu gen A, D và F với tần suất không cao; nghiên cứu của chúng tôi không xuất hiện trường hợp nào ngoài hai kiểu gen B và C. Đây cũng là hai kiểu gen được nhiều công bố cho rằng có liên quan đến các biến chứng nặng của bệnh, nhất là xơ gan và ung thư gan [4, 7, 16, 17]. Một điểm khác biệt nữa trong nghiên cứu của chúng tôi là tỉ lệ bệnh nhân đồng nhiễm hai kiểu gen B & C xuất hiện tương đối cao (16%). Theo tác giả Xin Ding và Hongxi Gu (2003) [14], tỉ lệ nhiễm đồng thời B và C trong một nghiên cứu dịch tễ ở Trung Quốc là 4.4% [14].

Tuy chưa có một báo cáo nào về sự đồng nhiễm ở trong nước để chúng tôi có thể so sánh, nhưng những ghi nhận đầu tiên về tình hình đồng nhiễm này cũng thật đáng lo ngại về khả năng lây truyền của virus do điều kiện vệ sinh an toàn, ý thức bảo vệ sức khỏe của người dân,... trong cộng đồng.

Nhận định về mối tương quan giữa nồng độ virus HBV DNA trong máu và tỉ lệ phân bố kiểu gen, tỉ lệ bệnh nhân nhiễm HBV kiểu gen B, C và B+C có nồng độ virus cao đều cao hơn so với bệnh nhân nhiễm HBV kiểu gen B, C và B+C có nồng độ virus thấp. Theo Kao J. H và cộng sự [10, 11], nồng độ HBV DNA cao thường xuất hiện ở C hơn B, kết quả nghiên cứu của chúng tôi ghi nhận nồng độ virus HBV DNA đều ở mức cao hơn ở cả ba trường hợp kiểu gen nhiễm. Tuy nhiên, cũng cần phải lưu ý rằng, cũng như các nghiên cứu trước đây (đã đề cập trong mở đầu) và kể cả nghiên cứu này, việc đo nồng độ HBV đều được thực hiện tại một thời điểm cho nên kết quả chưa thật sự thuyết phục.

Nhận định về mối tương quan giữa sự lưu hành kháng nguyên HBeAg trong các kiểu gen trong nghiên cứu của chúng tôi (kiểu gen B là 44,44% và kiểu gen C là 28,57%) là hoàn toàn phù hợp với các tác giả Janssen H. I. & cộng sự [9]: trong nghiên cứu này tỉ lệ lưu hành của HBeAg ở kiểu gen B là 44%, kiểu gen C là 28%. Tương tự, một số nghiên cứu của các tác giả Kao & cộng sự [10, 11] cũng khẳng định tốc độ lưu hành HBeAg của kiểu gen B là cao hơn kiểu gen C. Mặc dù vậy, kết quả này lại mâu thuẫn với các nhóm nghiên cứu Chu C. J và cộng sự (2002, 2003) [18, 21]; Shiina S và & cộng sự [22]; Sumi H và cộng sự [15]; đó là ở châu Á sự lưu hành kháng nguyên HBeAg của những người nhiễm kiểu gen C cao hơn kiểu gen B. Rõ ràng, đây là vấn đề còn chưa thống nhất.

Vì vậy, nghiên cứu này nên được mở rộng với cỡ mẫu lớn hơn để từ đó có thể có những kết luận chính xác hơn về tình hình nhiễm HBV, phân bố kiểu gen và mối tương quan với các yếu

tổ trầm trọng của bệnh, nhằm góp phần trong công việc điều trị, theo dõi diễn tiến của bệnh, phòng ngừa được các biến chứng của bệnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Norder H, Courouce AM, Magnius LO. (1994), *Complete genome, phylogenetic relatedness and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes*. Virology, 198:489-503.
2. Okamoto H, Tsuda F, Sakagawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, et al. (1988), *Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence comparison of surface antigen subtypes*. J Gen Virol, 69:2575-83.
3. Norder H, Hammas B, Lee SD, Bele C, Courouce AM, Mushawar IK, et al. (1993), *Genetic relatedness of hepatitis B viral strains of diverse geographical origin and natural variation in the primary structure of the surface gene*. J Gen Virol, 74:1341-8.
4. Norio Akuta and Hiromitsu Kumada. (2005), *Influence of hepatitis B virus genotypes on the response to antiviral therapies*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 55: 139-142.
5. Thakur V, Guptan RC, Kazim SN, Malhotra V, Sarin SK. (2002), *Profile, spectrum and significance of HBV genotype in chronic liver disease patients in the Indian subcontinent*. J Gastroenterol Hepatol, 17:165-70.
6. Erhardt A, Reineke V, Blondin D, Gerlich WH, Adam O, Heintges T, et al. (2000), *Mutation of the core promoter and response to interferon in chronic replicative hepatitis B*. Hepatology, 31:716-25.
7. Kao JH, WuNH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. (2000), *Hepatitis B genotype and the response to interferon therapy*. J Hepatol, 33:998-1002.
8. Thakur V, Sarin SK, Rehman S, Guptan RC, Kazim SN, Kumar S. (2005), *Role of HBV genotype in predicting response to lamivudine therapy in patients with chronic hepatitis B*. Indian J Gastroenterol, 24:12-1.
9. Janssen HL, Flink HJ, Zonneveld MV, Niesters HG, Man RAD, Schalm SW (2004), *HBeAg seroconversion in chronic HBV patients treated with pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine: the role of HBV genotype*, Hepatology, 40: 660A.
10. Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS (2000), *Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B*, Gastroenterology, 118: 554-559.
11. Kao JH, Liu CJ, Chen DS (2002), *Hepatitis B viral genotypes and lamivudine resistance*, J Hepatol, 36: 303-304.
12. Kumar A, Kumar SI, Pandey R, Naik S, Aggarwal R (2005), *Hepatitis B virus genotype A is more often associated with severe liver disease in northern India than is genotype D*, Indian J Gastroenterol, 24: 19-22.
13. Lindh M, Hannoun C, Dhillion AP, Norkrans G, Horal P (1999), *Core promoter mutations and genotypes in relation to viral replication and liver damage in East Asian hepatitis B virus carriers*, J Infect Dis 179: 775-782.
14. Xin Ding, Hongxi Gu (2003), *Molecular epidemiology of Hepatitis virus and Genotypic distribution Hepatitis B and C virus in Harbin China*, Jpn.J.Infect.Dis, 19-22.
15. Sumi H, Yokosuka O, Seki N, Arai M, Imazeki F, Kurihara T (2003), *Influence of hepatitis B virus genotypes on the progression of chronic type B liver disease*, Hepatology, 7: 19-26.
16. Ding X, Mizokami M, Yao G, Xu B, Orito E, Ueda R (2001), *Hepatitis B virus genotype distribution among chronic hepatitis B virus carriers in Shanghai Chin*, Intervirology, 44: 43-47.

17. Sakugawa H, Nakasone H, Nakayoshi T, Orito E, Mizokami M, Yamashiro T (2002), *Preponderance of hepatitis B virus genotype B contributes to a better prognosis of chronic HBV infection in Okinawa, Japan*, J Med Virol, 67: 484-489.
18. Chu CJ, Keeffe EB, Han SH, Perrillo RP, Min AD, Soldevila-Pico C (2003), *Prevalence of HBV precore/core promoter variants in the United States*, Hepatology, 38: 619-628.
19. Sánchez-Tapias JM, Costa J, Mas A, Bruguera M, Rodés J (2002), *Influence of hepatitis B virus genotype on the longterm outcome of chronic hepatitis B in western patients*, Gastroenterology, 123: 1848-1856.
20. Mayerat C, Mantegani A, Frei PC (1999), *Does hepatitis B virus (HBV) genotype influence the clinical outcome of HBV infection?*, J Viral Hepat, 6: 299-304.
21. Chu CJ, Hussain M, Lok AS (2002), *Hepatitis B virus genotype B is associated with earlier HBeAg seroconversion compared with hepatitis B virus genotype C*, 122: 1756-1762.
22. Shiina S, Fujino H, Uta Y, Tagawa K, Unuma T, Yoneyama M (1991), *Relationship of HBeAg subtypes with HBeAg/anti-HBe status and chronic liver disease Part I: Analysis of 1744 HBeAg carriers*, Am J Gastroenterol, 86: 866-871.
23. Đông thị Hoài An, Cao Minh Nga (2003), *Kỹ thuật định tip gene siêu vi viêm gan B bằng Multiplex PCR trên bệnh nhân nhiễm siêu vi viêm gan B mạn*, Từ khoa học sinh học phân tử đến cuộc sống và chăm sóc sức khỏe, trang 17-25.
24. Alfredo A, Roberto E, Jordi B. (2003), *East international consensus conference on Hepatitis B virus*, J. of Hepatology, 39: 3-25.