

# ỨNG DỤNG KỸ THUẬT REAL-TIME PCR ĐỂ XÁC ĐỊNH KIỂU GEN, LƯỢNG VIRUS TRONG MÁU VÀ ĐẶC ĐIỂM KHÁNG THUỐC ĐIỀU TRỊ CỦA VIRUS VIÊM GAN B TRÊN NGƯỜI BỆNH CỦA BỆNH VIỆN ĐA KHOA ĐỒNG THÁP

Ngày nhận bài: 06/06/2014

Ngày nhận lại: 17/07/2014

Ngày duyệt đăng: 09/09/2014

*Lao Đức Thuận, Trương Kim Phượng,<sup>1</sup>  
Mai Ngọc Lành,<sup>2</sup>  
Lê Thị Phượng, Phan Văn Bé Bảy,<sup>3</sup>  
Hồ Thị Thanh Thủy,<sup>4</sup>  
Lê Huyền Ái Thúy<sup>5</sup>*

## TÓM TẮT

Viêm gan siêu vi B là bệnh gây ra bởi virus viêm gan B (Hepatitis B virus-HBV), biểu hiện cấp tính hoặc mạn tính. Nhiễm HBV là nguyên nhân hàng đầu gây viêm gan mạn tính trên toàn thế giới, kết quả dẫn đến xơ gan và nguy cơ diễn tiến thành ung thư gan. Những tiến bộ mới trong chẩn đoán và điều trị viêm gan siêu vi B đã góp phần đáng kể trong việc hạn chế những biến chứng của bệnh, trong đó việc sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử (SHPT) mà điển hình là real-time PCR đã góp phần không nhỏ vào công tác chẩn đoán, theo dõi và điều trị. Nghiên cứu này vì vậy được đặt ra nhằm ứng dụng kỹ thuật real-time để xác định virus trong máu, kiểu gen và đặc điểm kháng thuốc điều trị (Lamivudine-LAM, Adefovir-ADV) của HBV trên người bệnh tại Bệnh viện Đồng Tháp. Chúng tôi ghi nhận (trên 100 bệnh nhân có chỉ số HBsAg dương tính) độ tuổi của người nhiễm là  $37,0 \pm 0,34$ , giới nam chiếm tỷ lệ 59,0%, giá trị ALT bình thường trong 51,2%, HBeAg âm tính chiếm 23,0% và không có chỉ định điều trị trong 30,0% trường hợp Có 82,0% HBV-DNA là dương tính, với đa số là kiểu gen B chiếm 59,1%. Nhóm có tải lượng virus cao  $\geq 20.000$  UI/mL chiếm 36,0%. Tỷ lệ đột biến kháng thuốc xuất hiện trong 56,1%, nhiều nhất là kháng LAM với 86,0% và ADV với 68,0%. Trong đột biến kháng LAM, đột biến tại 204I cao nhất chiếm 84,0%. Đối với kháng ADV, đột biến A181T cao nhất với tỷ lệ 68,0%. Đột biến kháng thuốc đi kèm với tỷ lệ HBeAg dương tính cao và tải lượng virus cao. Trong khi đó, ảnh hưởng của kiểu gen nhiễm của HBV trên các yếu tố lâm sàng và cận lâm sàng không thể hiện rõ.

**Từ khóa:** Đột biến kháng thuốc, kiểu gen, tải lượng Virus, real-time PCR, virus viêm gan B.

## ABSTRACT

Hepatitis B is caused by the hepatitis B virus (HBV) and may be either acute or chronic. Chronic hepatitis B virus (HBV) infection is the major global cause of chronic hepatitis, as a result, which leads to cirrhosis and increases the risk of liver cancer development (hepatocellular carcinoma). Recent advances in the diagnosis and treatment of hepatitis B have enormously contributed to reduce the side effects of this disease in which the real-time PCR technique had the significant contribution to diagnosis, monitoring and therapy. In the current study, therefore, our purpose is the application of real-time PCR method to detect hepatitis B

<sup>1</sup> ThS, Trường Đại học Mở TP.HCM.

<sup>2</sup> Sở Khoa học Công nghệ Tỉnh Đồng Tháp.

<sup>3</sup> Bệnh viện Đa khoa Tỉnh Đồng Tháp.

<sup>4</sup> Công ty Cổ phần Công nghệ Việt Á.

<sup>5</sup> PGS.TS, Trường Đại học Mở TP.HCM. Email: lhathuy@gmail.com

*viral load, genotypes as well as lamivudine (LAM) and adefovir (ADV) resistance in patients at Dong Thap Hospital. The results figured that the mean age of HBV patients was  $37.0 \pm 0.34$ , the proportion of male infected was 59.0%. In addition, our results also showed that the rate of the patients with the normal ALT level and HBeAg negative were 51.2% and 23.0%, respectively. Moreover, the patients who were not indicated for treatment were approximately 30.0%. Among the group of HBsAg positive, the rate of HBV-DNA positive was 82.0% and a majority rate of 59.1% was HBV genotype B. The group of high viral load in those samples was equal to or greater than 20,000 IU/ml (36.0%). The total rate resistant mutation occurred in 56.1%, the rate of LAM resistant mutations was the most value of 86.0% and ADV resistant mutations were 68.0%. LAM resistant mutation 204I occurred at 84.0%. ADV resistant mutation A181T was the highest rate of 68.0%. Resistance mutations often associated with a higher proportion of HBeAg positive and the high viral loads. Meanwhile, the influence of genotype infections on the clinical, para-clinical characteristics were not clear.*

**Keywords:** Hepatitis B virus, genotypes, real-time PCR, resistance mutation, viral load.

## 1. Giới thiệu

Theo báo cáo của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), có khoảng 2 tỷ người nhiễm virus viêm gan B (HBV) trên toàn thế giới, trong đó khoảng 6% có viêm gan siêu vi B cấp tính và 5-10% trong số này sẽ chuyển sang mạn tính ở người lớn, riêng đối với trẻ em tỷ lệ này lên đến 90%. Tỷ lệ tử vong trong giai đoạn cấp tính là 1%. Biến chứng của viêm gan siêu vi B cấp là viêm gan mạn, xơ gan và ung thư gan nguyên phát, dẫn đến tử vong vào khoảng một triệu người mỗi năm<sup>[25][26]</sup>. Tại Việt Nam có 15-20% người nhiễm HBV, và trên bệnh nhân xơ gan và ung thư gan nguyên phát thì tỷ lệ nhiễm HBV chiếm đến 80-92%<sup>[15][29][41]</sup>.

Ở Việt Nam, kiểu gen HBV phổ biến là B và C<sup>[15][29][41]</sup>. Các nghiên cứu trên thế giới cho thấy kiểu gen có quan hệ mật thiết với tình trạng ủ bệnh, quá trình sinh bệnh, sự trốn thoát của HBV khỏi hệ thống miễn dịch và sự đáp ứng với thuốc điều trị<sup>[3][4][30]</sup>. Trong điều trị, Lamivudine (LAM) và Adefovir (ADV) là hai loại thuốc đã được sử dụng rộng rãi do ưu điểm dùng bằng đường uống và ít tác dụng phụ, nhưng hiện nay việc sử dụng các thuốc này đang bị hạn chế do tình trạng kháng thuốc đang ở mức báo động, sự kháng thuốc này lại tăng lên theo thời gian điều trị<sup>[20]</sup>.

Hiện nay, có nhiều phương pháp chẩn đoán nhiễm HBV dựa trên kỹ thuật sinh học phân tử, nhưng với ưu điểm về độ nhạy, độ chính xác và khả năng phân tích kết quả ngay

trong quá trình thực hiện phản ứng nên real-time PCR ngày càng được sử dụng rộng rãi<sup>[8][11][18][32][38]</sup>.

Bệnh viêm gan siêu vi B là bệnh phổ biến ở tỉnh Đồng Tháp, ước tính khoảng 10% trên tổng số xét nghiệm HBsAg. Việc triển khai điều trị tại Bệnh viện Đa khoa Đồng Tháp hiện nay còn ở mức sơ khởi, do các phương tiện chẩn đoán và theo dõi điều trị chưa đầy đủ. Nghiên cứu này vì vậy sẽ là khởi đầu cho việc áp dụng kỹ thuật mới trong chẩn đoán nhiễm HBV tại Đồng Tháp.

## 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành trên những bệnh nhân đến khám và điều trị tại bệnh viện Đa khoa tỉnh Tây Ninh có chỉ số HBsAg dương tính bằng xét nghiệm huyết thanh miễn dịch chưa từng điều trị bằng thuốc kháng HBV. Mẫu máu sẽ được bổ sung thêm xét nghiệm ALT và HBeAg, giá trị bình thường để tham chiếu của ALT trong đề tài này là < 42 UI/ml.

### Phản ứng Real-time PCR

DNA từ mẫu huyết thanh bệnh nhân ly trích bởi bộ kit tách chiết DNA QIAamp DNA blood Mini Kit Code 51104 được sử dụng để thực hiện real-time PCR. Các bộ kit Realtime-PCR do công ty Cổ phần & Công nghệ Việt Á cung cấp, bao gồm: LightPower<sup>IV</sup> HBV qPCR

Plus Kit: VA.A02-001C (nhằm xác định tải lượng virus trong máu với ngưỡng phát hiện là 60 UI/ml); LightPower<sup>ivA</sup>HBV LamR rPCR Plus Kit: VA.A02-001G và LightPower<sup>ivA</sup>HBV AdeR rPCR Plus Kit: VA.A02-001I (nhằm khảo sát các kiểu đột biến kháng Lamivudine đại trà: L180M, M204I, M20V và kháng Adefovir đại trà: A181T, A181V, N236T); LightPower<sup>ivA</sup>HBV Genotype rPCR Plus Kit: VA.A02-001E (nhằm xác định ba kiểu gen HBV phổ biến tại Việt Nam: A, B và C).

### *Xử lý và thống kê số liệu nghiên cứu*

Phần mềm MedCal (phiên bản 12.7.0.0) được sử dụng để phân tích, tất cả các phép kiểm là 2 đuôi, ngưỡng có ý nghĩa thống kê được chọn là  $p < 0,05$ .

### **3. Kết quả và thảo luận**

#### *Mô tả đặc điểm bộ mẫu:*

100 mẫu máu có chỉ số HBsAg dương tính được thu nhận từ các bệnh nhân có độ tuổi trung bình là  $37,0 \pm 0,34$  với khoảng dao động từ 10 đến 72 tuổi, trong đó có 59 trường hợp là nam và 41 trường hợp là nữ. Nhìn chung, nhiễm HBV tại địa bàn tỉnh có sự dao động về tuổi là lớn với tỷ lệ nam mắc bệnh có phần cao hơn nữ. Chỉ số men gan ALT bình thường chiếm 20 trong 41 trường hợp xét nghiệm (48,8%), và tăng trên 30 UI/mL chiếm 21 trong 41 trường hợp xét nghiệm (51,2%). Số bệnh nhân có chỉ tiêu men gan cao này cũng chính là số bệnh nhân cần xem xét điều trị. Về chỉ số HBeAg, trong 91 trường hợp có kết quả xét nghiệm, tỷ lệ dương tính chiếm 68 trường hợp (74,7%) và âm tính là 23 (25,3%). Đây là dấu ấn sinh học cần thiết trong theo dõi và điều trị nhiễm HBV, tuy nhiên trong một số trường hợp virus đột biến không tổng hợp được HBeAg thì việc theo dõi và điều trị nhiễm HBV sẽ phải dựa trên tải lượng virus trong máu.

Tải lượng virus có mối tương quan với chỉ số HBeAg, HBeAg xuất hiện dương tính trong những ca có chỉ số tải lượng virus cao và ngược lại. Do đó, HBeAg được sử dụng như dấu chỉ điểm cho sự nhân lên và lây nhiễm của virus HBV. Hiện tượng HBeAg âm tính có thể gặp trong trường hợp có xảy ra ở đột biến

precure, nên quá trình tổng hợp HBeAg không thực hiện được. Chính vì vậy mà trong huyết thanh bệnh nhân, kháng nguyên HBeAg có thể âm tính nhưng DNA HBV vẫn dương tính.

### *Xác định tải lượng virus*

Với ngưỡng phát hiện HBV-DNA là 60 UI/ml, trong 100 mẫu này chúng tôi xác định có 18 mẫu âm tính và 82 mẫu dương tính (kể cả những ca có chỉ số HBV-DNA xấp xỉ 300 copy/mL, tương đương 60 UI/mL), trong đó số ca bệnh có tải lượng virus  $\geq 20.000$  UI/mL là 36 ca (36,0%). Tải lượng virus giúp đánh giá chính xác việc sao chép của virus và cũng là một chỉ tiêu cần thiết để quyết định phương thức áp dụng điều trị HBV. Thông thường, ở bệnh nhân có HBeAg âm tính sẽ chỉ định điều trị khi tải lượng virus đạt 20.000 UI/mL. Khi tải lượng virus trên 2.000 UI/mL thì bệnh nhân sẽ được cân nhắc và điều trị khi có sự thay đổi đi kèm như: tải lượng virus tăng, men gan ALT tăng, hoặc hình ảnh tổn thương gan trên sinh thiết. Tổng hợp các yếu tố theo các hướng dẫn điều trị nhiễm HBV, bao gồm HBeAg, men ALT và tải lượng virus, có 70,0% bệnh nhân cần được điều trị và 30,0% cần cân nhắc điều trị tùy từng trường hợp cụ thể.

Dù tính an toàn và hiệu quả phòng ngừa của vaccine phòng bệnh HBV đã được chứng minh qua hơn hai thập kỷ, nhưng nhiễm HBV vẫn tiếp tục tiến triển ở mức toàn cầu với khoảng 600.000 cho đến 1 triệu người chết mỗi năm<sup>[41]</sup>. Có rất nhiều yếu tố nguy cơ có liên quan đến sự tiến triển của bệnh sang mạn tính, trong đó các yếu tố gồm kiểu gen, tải lượng virus và các kiểu đột biến gen là có mối liên quan mật thiết<sup>[21]</sup>.

### *Xác định kiểu gen virus*

Trong 66 ca dương tính HBV-DNA, kết quả xác định kiểu gen cho thấy kiểu gen B chiếm 39 ca (59,1%), kiểu gen C chiếm 21 ca (31,8%) và có 6 ca (9,1%) đồng nhiễm hai kiểu gen B và C. Tỷ lệ nhiễm giữa kiểu gen B/C vào khoảng 2/1. Chúng tôi không phát hiện được kiểu gen nào khác ngoài hai kiểu gen vừa đề cập. Kết quả phát hiện kiểu gen trong nghiên cứu này cũng phù hợp với nhận định đã được rút ra từ các nghiên cứu trước đây: đó là sự phân bố kiểu gen HBV thay đổi

theo địa dư, mỗi châu lục, mỗi nước; trong đó kiểu gen B và C thường gặp ở các nước Đông Nam Á, Nhật Bản và khu vực Thái Bình Dương và tỷ lệ nhiễm của kiểu gen B thường cao hơn C<sup>[1][12][13][21-23]</sup>.

Một nghiên cứu trước đây được thực hiện trên 295 bệnh nhân tại TP. Hồ Chí Minh có bệnh lý về gan của Tran HT *et al* (2003)<sup>[41]</sup>. Các tác giả ghi nhận trong 234/295 ca có nhiễm virus, tỷ lệ nhiễm HBV chiếm 31,2%, trong đó kiểu gen B chiếm 43,0% và kiểu gen C chiếm 57,0%<sup>[41]</sup>. Như vậy, tỷ lệ nhiễm giữa B/C đang xấp xỉ 1/1; không một kiểu gen nào khác ngoài B và C được ghi nhận qua nghiên cứu này. Một nghiên cứu được thực hiện trong thời gian từ tháng 8/2004 đến tháng 5/2006 tại phòng xét nghiệm Trung Tâm Y Khoa MEDIC, các tác giả sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen cho 122 trường hợp bệnh nhân Việt Nam viêm gan virus B mạn tính đang điều trị LAM và ghi nhận chỉ có 2 kiểu gen B và C, trong đó kiểu gen B là 76 trường hợp (62,3 %) và kiểu gen C là 46 trường hợp (37,7 %)<sup>[2]</sup>. Tỷ lệ nhiễm giữa kiểu gen B/C là xấp xỉ 2/1. Một nghiên cứu khác của Long H. Nguyen *et al* (2009)<sup>[29]</sup> thực hiện trên nhóm bệnh nhân viêm gan mạn người gốc Việt và gốc Trung Quốc sinh sống tại Bắc California từ tháng 6/2005 đến tháng 6/2008, các tác giả cũng ghi nhận một tỷ lệ khá khác biệt giữa hai nhóm người: ở những bệnh nhân Trung Quốc, kiểu gen B chiếm 49/89 ca (55,0%), kiểu gen C chiếm 38/89 ca (43,0%) và có hai trường hợp nhiễm kiểu gen D (2,0%); Trong khi đó, đối với nhóm bệnh nhân có nguồn gốc người Việt Nam, tỷ lệ này phân bố: kiểu gen B chiếm 335/478 ca (74,0%), kiểu gen C chiếm 120/478 ca (chiếm 24,0%), kiểu gen A chiếm 1/478 ca (1,0%) và kiểu gen D chiếm 2/478 ca (1,0%). Như vậy, tỷ lệ nhiễm giữa kiểu gen B/C được ghi nhận là vào khoảng 3/1. Một nghiên cứu khác của Đặng Mai Anh Tuấn và cộng sự (2010)<sup>[6]</sup>, khảo sát kiểu gen HBV được thực hiện bằng phương pháp PCR-giải trình tự hiện trên cỡ mẫu 894 bệnh nhân, các tác giả ghi nhận có 3 kiểu gen B, C và D, tuy nhiên kiểu gen D chỉ có duy nhất 1 mẫu chiếm 0,11%, còn lại là kiểu gen B với 678 mẫu và kiểu gen C với 215 mẫu tương ứng với tỷ lệ 75,84% và 24,05% nghĩa là tỷ lệ giữa kiểu gen

B/C là khoảng 3/1. Nghiên cứu của Phung TB *et al* (2010)<sup>[34]</sup> cũng cho thấy trong 87 mẫu nhiễm HBV từ các bệnh nhân tại Hà Nội, kiểu gen B chiếm 67/87 mẫu (77,0%) và kiểu gen C chiếm 19/87 mẫu (22,0%), nghĩa là tỷ lệ giữa kiểu gen B/C cũng vào khoảng 3/1. Trong hai nghiên cứu khác được thực hiện trước đây của chúng tôi cũng sử dụng các bộ kit phát hiện kiểu gen dựa trên kỹ thuật real-time PCR của công ty Việt Á, thực hiện trên 100 bệnh nhân nhiễm HBV tại khu vực tỉnh Đắk-lắk ghi nhận kiểu gen B là 63 mẫu, kiểu gen C chiếm 21 mẫu (nghĩa là tỷ lệ nhiễm giữa kiểu gen B/C vào khoảng 3/1); đồng thời có 16 mẫu nhiễm cả hai kiểu gen B và C<sup>[1]</sup> và trên 200 bệnh nhân nhiễm HBV tại bệnh viện Đa khoa Tây Ninh, ghi nhận tỷ lệ nhiễm giữa kiểu gen B và C xấp xỉ 4/1<sup>[5]</sup>. Gần đây, Nguyen CH *et al* năm 2011<sup>[28]</sup> công bố tỷ lệ nhiễm HBV trên 113 bệnh nhân tại khu vực Hải Phòng là kiểu gen B chiếm 80,5% trong khi kiểu gen C chiếm gần 20%, nghĩa là tỷ lệ nhiễm giữa kiểu gen B/C vào khoảng 4/1. Gần đây nhất là xuất bản của nhóm nghiên cứu Dunford L *et al* (2012)<sup>[15]</sup> cho thấy trong số 185 mẫu nhiễm HBV được xác định kiểu gen từ bệnh nhân thu nhận từ 5 tỉnh thành trong cả nước, bao gồm: Hà Nội, Hải Phòng, Đà Nẵng, Khánh Hòa và Cần Thơ, tỷ lệ kiểu gen B chiếm xấp xỉ 85%, kiểu gen C chiếm xấp xỉ 15%. Như vậy, tỷ lệ nhiễm giữa kiểu gen B/C đã vào khoảng lớn hơn 5/1. Như vậy, có thể nói rằng kiểu gen B và C là hai kiểu gen nhiễm chiếm đa số ở các chủng tộc châu Á; kiểu gen B luôn chiếm tỷ lệ cao hơn nhiều, gấp khoảng 3 lần so với kiểu gen C và xu hướng nhiễm của kiểu gen B đang gia tăng (4/1 trong kết quả của nghiên cứu này và của Nguyen CH *et al* (2011); 5/1 trong nghiên cứu của Dunford L *et al*, 2012)<sup>[15]</sup>, rất có thể là một kiểu nhiễm đặc trưng của người Việt Nam.

Tỷ lệ đồng nhiễm trong nghiên cứu này là 6 ca (9,1%), cao hơn công bố trước đây khi khảo sát trên 200 ca nhiễm tại BV Đa khoa Tây Ninh (4,1%) cũng như một công bố dịch tễ kiểu gen của tác giả Xin Ding *et al* (2003)<sup>[14]</sup> thực hiện trên người bệnh nhiễm HBV ở Trung Quốc (nhiễm đồng thời B và C là 4,4%), tuy nhiên thấp hơn so với tỷ lệ đồng nhiễm trên 100 bệnh nhân nhiễm HBV tại khu

vực Tây Nguyên trong công bố của Đỗ TTD và Lê HAT (2011) là 16,0%<sup>[1]</sup>. Điều đáng nói là kỹ thuật sử dụng để genotyping trong các nghiên cứu này đều là real-time PCR và PCR trực tiếp bằng các môi phân biệt đặc hiệu từng kiểu gen. Rất có thể chính phương pháp này giúp việc xác định tính chất đồng nhiễm hiện diện mà kỹ thuật giải trình tự có thể bỏ sót một khi một trong hai kiểu gen chiếm số lượng rất thấp trong quần thể virus nhiễm. Dù vậy, cần nhiều nghiên cứu khác nữa để khẳng định nhận định này của chúng tôi.

Qua đây, có thể rút ra một đề nghị khác nữa: để dễ dàng trong việc ứng dụng trong lâm sàng, kỹ thuật xác định kiểu gen có thể tiến hành nhanh, cỡ mẫu lớn, và giá cả phù hợp, với tính đặc thù kiểu gen nhiễm chủ yếu là B và C, real-time PCR nên được lựa chọn nếu được áp dụng tại BV. Đa khoa Đồng Tháp. Các trường hợp không xác định được bằng real-time PCR (nếu có) sẽ được kiểm tra bằng giải trình tự trực tiếp sản phẩm PCR.

#### ***Xác định đột biến kháng thuốc***

Trong 66 ca được xét nghiệm tìm đột biến kháng thuốc LAM và ADV, có 37 ca mang đột biến kháng thuốc (56,0%) và 29 ca không mang các đột biến kháng thuốc tìm kiếm (44,0%). Trong số 37 ca kháng thuốc: có 32 ca (86,0%) kháng LAM, 25 ca (68,0%) kháng ADV và 18 ca (49,0%) đồng kháng. Kết quả của nghiên cứu này cũng cho thấy các đột biến kháng kép LAM tại 2 điểm M204I và M204V và kháng kép ADV tại hai điểm A181V và A181T chiếm tỷ lệ khá cao, tương ứng 10/32 ca (31,0%) và 2/25 ca (8,0%). Không có ca nào được phát hiện mang đột biến L180M cũng như đột biến N236T kháng ADV trong các mẫu dương tính.

So sánh với kết quả nghiên cứu gần đây nhất của chúng tôi cũng sử dụng cùng các bộ kit như trong nghiên cứu này, thực hiện từ 200 ca nhiễm HBV tại BV Đa Khoa Tây Ninh, ghi nhận 147 ca được xét nghiệm tìm đột biến kháng thuốc LAM và ADV, có 99 ca mang đột biến kháng thuốc (67,3%)<sup>[5]</sup>; như vậy tỷ lệ kháng của 66 ca ghi nhận tại Đồng Tháp (56,0%) là thấp hơn. Tuy nhiên, khi xét về tỷ lệ kháng của từng loại thuốc, trong số 99 ca

kháng tại Tây Ninh, có 43 ca (43,4%) kháng LAM, 21 ca (21,2%) kháng ADV và 35 ca (35,4%) đồng kháng; thì tỷ lệ kháng tại BV. Đồng Tháp cao hơn. Tỷ lệ kháng kép LAM (M204I và M204V), ADV (A181V và A181T) của nghiên cứu này có phần thấp hơn so với Tây Ninh (đột biến kháng kép LAM tại 2 điểm M204I và M204V và kháng kép ADV tại 2 điểm A181V và A181T chiếm tỷ lệ lần lượt là 41/78 ca (52,6%) và 27/56 ca (48,2%)<sup>[5]</sup>. Cũng so với kết quả nghiên cứu ở BV. Tây Ninh, chúng tôi có phát hiện 5 ca đột biến L180M được phát hiện đi kèm với đột biến M204I/V và một ca duy nhất xuất hiện đột biến L180M riêng lẻ; thì nghiên cứu này chưa phát hiện trường hợp nào bệnh nhân mang đột biến kháng L180M cũng như không phát hiện đột biến N236T kháng ADV (nghiên cứu ở Tây Ninh cũng chưa phát hiện ca nào kháng N236T)<sup>[5]</sup>.

Nghiên cứu của Hồ TĐ và cộng sự<sup>[2]</sup>, thực hiện từ tháng 8/2004 đến tháng 5/2006 trên 122 bệnh nhân tại phòng xét nghiệm Trung Tâm Y Khoa MEDIC. Các tác giả sử dụng kỹ thuật giải trình tự trên hệ thống OpenGene với bộ thuốc thử TruGene (Bayer), kết quả cho thấy: có 78 trường hợp (63,9%) mang đột biến kháng LAM, tỷ lệ và các kiểu đột biến như sau: L180M & M204I (11,5%); L180M & M204V (36,1%); L180M, M204V & V173L (0,8%); L180M, M204V & V207I (0,8%); M204I (12,3%); M204I & V207I (0,8%); M204V (1,6%). So với kết quả này, thời điểm 2014, tức là sau 10 năm, kết quả nghiên cứu của chúng tôi, nếu chỉ tính riêng kháng LAM, tỷ lệ này đã tăng lên hơn 15%. Nghiên cứu trước đây của Nguyễn CV và cộng sự (2008)<sup>[7]</sup> cho thấy: sử dụng kỹ thuật Nested PCR-RFLP, các đột biến kháng LAM được phát hiện với tần suất khá cao chiếm 74,4%, phổ biến ở 2 dạng là M204I (39,2%) và L180M/M204I (14,7%). Các tác giả cũng cho rằng kỹ thuật Nested PCR-RFLP thể hiện ưu điểm trong việc phát hiện-phân biệt hỗn hợp HBV hoang dại và đột biến. So với kết quả này, thời điểm 2014, tức là sau 6 năm, kết quả nghiên cứu của chúng tôi, nếu chỉ tính riêng kháng LAM, tỷ lệ 86,0% kháng cũng đã tăng lên, tuy nhiên dạng đột biến phổ biến trong nghiên cứu chúng tôi khác biệt: dạng đột biến

đơn M204I chỉ chiếm 47,0% so với đột biến kép M204I/V chiếm 31,0%.

Tuy nhiên, so với một nghiên cứu khác của Đặng Mai Anh Tuấn và cộng sự (2010)<sup>[6]</sup>, các tác giả phát hiện 83 bệnh nhân viêm gan virus B mạn tính bị kháng thuốc chiếm tỷ lệ 9,28% trong tổng số 894 người; trong số đó, 42 người kháng LAM (4,7%), 4 người kháng ADV (0,45%), và 37 người có đột biến kháng kép (kháng cả LMV và ADV) (4,14%). Như vậy, so với kết quả này, tính kháng đã có sự gia tăng rất cao, cả kháng LAM, kháng ADV và kháng kép. Mức độ kháng kép trong nghiên cứu của chúng tôi khá cao (31,0%). Hiện tượng này giúp virus có thể tiếp tục tồn tại và sinh sản được dưới tác động của thuốc đặc trị.

Số liệu trong nghiên cứu này với tỷ lệ kháng LAM tiếp tục tăng rất cao cũng đúng với nhận định đã được các tác giả Đặng MAT và cộng sự (2010)<sup>[6]</sup> rút ra, đó là: tình hình kháng này phù hợp với thực tế tại Việt Nam do chi phí LAM rẻ hơn gần 10 lần so với ADV nên trong điều trị viêm gan B, LAM được sử dụng trước tiên. Điều này khiến LAM trở thành tác nhân chọn lọc trước với thời gian nhiều năm. Khi LMV bị kháng, ADV mới được sử dụng.

Tuy nhiên, với nhận định dựa trên kết quả kháng LAM và ADV trong nghiên cứu của Đặng MAT và cộng sự (2010)<sup>[6]</sup> chiếm chưa tới 1/10 lượng bệnh nhân viêm gan mạn tính, từ đó các tác giả cho rằng thuốc LAM vẫn còn là loại thuốc rất hữu dụng trong điều trị viêm gan B; thì qua nghiên cứu này với tỷ lệ kháng LAM đã lên đến 86,0%, có lẽ LAM không còn là một lựa chọn ưu tiên trong điều trị HBV nữa.

Dù xét về tính đặc trưng: tần suất xuất hiện rất cao của các đột biến đại trà (như L180M, M204I/V, A181V/T và N236T), hơn nữa các đột biến này hầu như luôn xuất hiện kèm với các đột biến ít thường xuyên khác; quy trình phát hiện đột biến dựa trên kỹ thuật real-time PCR sử dụng trong nghiên cứu này

đã phát hiện được 37/66 ca mang đột biến. Với 29/66 ca (43,9%) âm tính: cũng có thể các bệnh nhân này chưa mang đột biến nào, hoặc do kỹ thuật real-time PCR chưa dò tìm hết các đột biến khác xuất hiện một cách đơn lẻ (có thể có), chúng tôi tạm thời kết luận các ca bệnh này không mang các đột biến kháng thuốc tìm kiếm. Dự kiến thực hiện thêm kỹ thuật giải trình tự cho các ca này chưa thể thực hiện được vì chúng tôi không có đủ kinh phí trong nghiên cứu này.

Có rất nhiều nguyên nhân ảnh hưởng đến việc xuất hiện đột biến kháng thuốc trong quá trình điều trị, tuy nhiên có một yếu tố quan trọng có thể làm cho tỉ lệ đột biến kháng thuốc cao là vấn đề sử dụng thuốc có đúng theo hướng dẫn bác sĩ điều trị không, điều trị thành nhiều đợt khác nhau trước khi bệnh nhân được đưa vào nhóm nghiên cứu. Dù cỡ mẫu thực hiện nghiên cứu còn nhỏ, nhưng thật sự hiện tượng kháng và nhất là đa kháng hai loại thuốc (vẫn đang là những lựa chọn đầu tiên cho điều trị nhiễm HBV), đã xuất hiện. Đây quả là vấn đề đáng lo ngại, không chỉ của riêng bệnh viện Đa khoa Đồng Tháp mà là của chung. Vấn đề cần được quan tâm và mở rộng các cách để tuyên truyền cũng như điều kiện để mở rộng nghiên cứu trên nhiều địa bàn khác để nắm rõ hơn tình hình. Số liệu này không chỉ có ý nghĩa về dịch tễ mà còn cung cấp các thông tin cực kỳ quan trọng cho định hướng phương pháp điều trị hiệu quả và ít tổn kém cho bệnh nhân.

### *Phân tích thống kê*

Nhằm tìm mối tương quan với các chỉ tiêu lâm sàng và cận lâm sàng liên quan đến bệnh, chúng tôi ghi nhận đột biến kháng thuốc đi kèm với tỷ lệ HBeAg dương tính cao (Bảng 1) và tải lượng virus cao (Bảng 2). Người có tải lượng virus cao thường đi kèm với chỉ số HBeAg dương tính, có ý nghĩa thống kê (Bảng 3). Trong khi đó, ảnh hưởng của kiểu gen nhiễm của HBV trên các yếu tố lâm sàng và cận lâm sàng khác không thể hiện rõ.

**Bảng 1. Mối liên quan giữa độ biến kháng LAM, ADV và HBeAg**

HBeAg (%)	Độ biến kháng LAM			Độ biến kháng ADV		
	Âm tính	Dương tính	Tổng	Âm tính	Dương tính	Tổng
<b>Âm tính</b>	29 (74,4)	10 (25,6)	39 (62,9)	34 (87,2)	5 (12,8)	39 (62,9)
<b>Dương tính</b>	4 (17,4)	19 (82,6)	23 (37,1)	4 (17,4)	19 (82,6)	23 (37,1)
<b>Tổng</b>	33 (53,2)	29 (46,8)	62 (100,0)	36 (61,3%)	24 (38,7%)	62 (100,0)
<i>p</i>	<i>&lt;0,0001</i>			<i>&lt;0,0001</i>		

**Bảng 2. Mối liên quan giữa độ biến kháng LAM, ADV và tải lượng virus**

Tải lượng virus (IU/mL) (%)	Độ biến kháng LAM			Độ biến kháng ADV		
	Âm tính	Dương tính	Tổng	Âm tính	Dương tính	Tổng
<2000	20 (87,0)	3 (13,0)	23 (34,8)	23 (100,0)	0 (0,0)	23 (34,8)
2000-20000	4 (57,1)	3 (42,9)	7 (10,6)	7 (100,0)	0 (0,0)	7 (10,6)
≥ 20000	10 (27,8)	26 (72,2)	36 (54,5)	11 (30,6)	25 (69,4)	36 (54,5)
<b>Tổng</b>	34 (51,5)	32 (48,5)	66 (100,0)	41 (62,1)	25 (37,9)	66 (100,0)
<i>p</i>	<i>&lt;0,0001</i>			<i>&lt;0,0001</i>		

**Bảng 3. Mối liên quan giữa tải lượng virus và HBeAg**

Tải lượng virus (IU/mL) (%)	HBeAg		Tổng
	Âm tính	Dương tính	
<b>Âm tính</b>	16 (100,0)	0 (0,0)	16 (17,6%)
<b>&lt;2.000</b>	36 (100,0)	0 (0,0)	36 (39,6%)
<b>2.000-20.000</b>	5 (100,0)	0 (0,0)	5 (5,5%)
<b>≥ 20.000</b>	11 (32,4)	23 (67,6)	34 (37,4%)
	68 (74,7%)	23 (25,3%)	91 (100,0)
<i>p</i>			<i>&lt; 0,0001</i>

Sự xuất hiện các đột biến kháng các thuốc điều trị viêm gan virus B là các đồng phân nucleoside (nucleoside analogs – NUCs) trong nghiên cứu này cho thấy có liên quan đến chỉ tiêu HBeAg: đột biến kháng LAM và ADV đi kèm với tỷ lệ HBeAg dương tính cao, và ngược lại (Bảng 1). Kết quả này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu trước đây của chúng tôi<sup>[5]</sup> và của Tan YW *et al* (2012)<sup>[39]</sup>.

Bệnh nhân có đột biến kháng thuốc có tải lượng virus cao hơn, cả trong trường hợp kháng LAM và ADV (Bảng 2). Tương tự như công bố trước đây: trung vị của tải lượng virus những ca đột biến kháng thuốc là 79.600 (1.726-18.800.000 IU/mL), trong những ca không có đột biến kháng thuốc là 235 (60 – 510 UI/mL) và sự khác biệt này là có ý nghĩa,  $p < 0,001$ <sup>[5]</sup>. Đột biến kháng thuốc nghĩa là virus đã thay đổi những cấu trúc di truyền liên quan làm mất tác dụng ngăn cản sự sao chép DNA virus của hai thuốc LAM và ADV, từ đó có thể suy luận rằng virus có điều kiện sao chép mạnh và dẫn đến tải lượng virus tăng cao.

Trong nghiên cứu của Sinn DH *et al* (2011)<sup>[37]</sup>, các tác giả cũng ghi nhận tải lượng virus là cao hơn ở nhóm bệnh nhân kháng LAM kèm xuất hiện kháng ADV (rtA181V/T và/hoặc rtN236T). Hơn thế nữa, chỉ số tải lượng virus cao thường đi kèm với chỉ số HBeAg dương tính, có ý nghĩa thống kê vừa được minh chứng qua kết quả của nghiên cứu này (Bảng 3). Điều này càng củng cố hơn ý nghĩa sử dụng chỉ số tải lượng virus như một chỉ điểm quan trọng trong suốt quá trình theo dõi điều trị mà rất nhiều công bố đã sử dụng.

Đối với những trường hợp kháng thuốc, liệu pháp lựa chọn sao cho hiệu quả chống virus cao nhất và giảm nguy cơ tạo sự đa kháng là các tiêu chí mà hướng dẫn điều trị thường đề cập<sup>[16]</sup>. Hiện nay, liệu pháp sử dụng ADV đang được chấp nhận sử dụng rộng rãi đối với các bệnh nhân kháng LAM. Đã có những công bố cho thấy việc sử dụng ADV một mình và ADV kết hợp với LAM cho hiệu quả chống virus tương đương trong khoảng thời gian điều trị 16 tuần ở những bệnh nhân mang đột biến kháng LAM<sup>[33]</sup>. Tuy nhiên, nghiên cứu với thời gian điều trị kéo dài hơn: 1, 2, 3 hay 4 năm, sử dụng liệu pháp kết hợp

LAM – ADV, việc xuất hiện đột biến kháng ADV rtA181T tăng lên, lần lượt 1, 2, 4 và 4%<sup>[18]</sup>; Trong khi đó nếu chỉ sử dụng liệu pháp đơn ADV, đột biến kháng ADV tăng vọt lên 21% sau 15-18 tháng so với lúc bắt đầu điều trị ( $p = 0,0174$ )<sup>[35]</sup>. Từ những thông tin mà chúng tôi tham khảo được trong các tổng quan, trong đó các tác giả sử dụng các hướng dẫn điều trị như KASL (Korean Association for the Study of the Liver), APASL (Asia-Pacific consensus Statement), US algorithm (Treatment algorithm in the United States), EASL (European Association for the Study of Liver) và AASLD (American Association for the Study of Liver Diseases) để phân tích, một vài ý được đúc kết như sau: kháng ADV có thể quản lý bằng cách thêm vào một thuốc NUCs không kháng chéo. Những bệnh nhân kháng ADV mang đột biến rtN236T, nhạy cảm với Lamivudine, Telbivudine, Entecavir và Tenofovir; tuy nhiên đối với kiểu kháng A181T/V, tính nhạy với Lamivudine giảm trong khi vẫn duy trì với các thuốc khác<sup>[10][17]</sup>. Entecavir vừa được đề nghị sử dụng cho những bệnh nhân mới tiếp nhận điều trị bằng NUCs và những bệnh nhân kháng Lamivudine<sup>[9][19][36]</sup>, thuốc này cũng đã chứng minh được hiệu quả rõ rệt đối với những bệnh nhân mới sử dụng NUCs nhưng kết quả có phần ngược lại với các bệnh nhân kháng Lamivudine<sup>[9][19][31]</sup>. Những đột biến kháng LAM (M204I/V +/- L180M) tồn tại trước khi tiếp nhận liệu pháp Entecavir là rào cản làm giảm hiệu quả sử dụng thuốc và làm gia tăng đột biến kháng Entecavir<sup>[10][40]</sup>. Telbivudine và Clevudine cũng làm xuất hiện các đột biến như kháng Lamivudine, như vậy việc quản lý tính kháng các thuốc này cũng sẽ tương tự như kháng Lamivudine<sup>[27]</sup>.

Qua những ý kiến được tổng hợp trên đây, theo chúng tôi rõ ràng việc tầm soát các đột biến kháng LAM như M204I/V, L180M, kháng ADV như A181V/T, N236T là rất cần thiết. Với tính chất đột biến kháng LAM, ADV được phát hiện qua nghiên cứu bước đầu này, nếu áp dụng phương thức điều trị NUCs +/- interferon tại BV. Đa khoa tỉnh Đồng Tháp, rõ ràng, việc sàng lọc nhanh các đột biến là rất hữu ích. Các quy trình dựa trên kỹ thuật real-time PCR như trong các bộ kit mà nghiên cứu



này sử dụng sẽ vẫn chứng minh được hiệu quả trong ứng dụng lâm sàng.

### 3. Kết luận

Dù nghiên cứu chỉ mới được thực hiện trên cỡ mẫu không lớn nhưng kết quả cho thấy việc ứng dụng kỹ thuật real-time PCR trong giám sát bệnh nhiễm VGSVB là rất cần thiết. Tỷ lệ dương tính của DNA HBV chiếm 82 ca trong tổng số 100 ca HBsAg dương tính. Chỉ số DNA HBV này lại là chỉ điểm về sự tồn tại

và đang nhân lên của virus. Chỉ số này cũng cho thấy có mối tương quan với chỉ số kháng nguyên HBeAg và đặc điểm về các kiểu đột biến kháng thuốc điều trị LAM và ADV. Sự phân bố kiểu gen của các bệnh nhân trong địa bàn tỉnh cũng cho thấy nhiễm kiểu gen B là cao hơn C và đã xuất hiện đồng nhiễm hai kiểu gen B và C. Rõ ràng, các kết quả nêu trên là hoàn toàn hữu ích phục vụ cho công tác chẩn đoán và điều trị bệnh. Nghiên cứu nên được tiếp tục trong thời gian tới với cỡ mẫu lớn hơn.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Thị Thùy Dương, Lê Huyền Ái Thúy. (2010). “Ứng dụng kỹ thuật realtime PCR trong xác định kiểu gen của virus gây viêm gan siêu vi B tại Đắk Lắk”. *Tạp chí Khoa học-Kỹ thuật*, 1(19), tr.118-123.
2. Hồ Tấn Đạt, Phạm Thị Thu Thủy, Nguyễn Bảo Toàn, Nguyễn Thị Kiều Oanh, Nguyễn Thanh Tòng. “Ứng dụng kỹ thuật giải trình tự chuỗi để xác định kiểu gen và các đột biến kháng thuốc của siêu vi viêm gan B”. *Trung Tâm Y Khoa MEDIC, TPHCM*  
Trích từ nguồn: <http://www.drthuthuy.com/reseach/HBVGenotype.html>
3. Hồ Thị Thanh Thủy. (2010). “Phát hiện đột biến rtL180M và rtM204V/I kháng Lamivudine ở bệnh nhân nhiễm HBV mạn tính bằng kỹ thuật real-time PCR”. *Hội nghị khoa học kỹ thuật đại học y dược TP. HCM lần thứ 27*.
4. Hồ Thị Thanh Thủy, Nguyễn Văn Hưng, Nguyễn Bảo Toàn, Lê Huyền Ái Thúy. (2009). “Phát hiện đột biến rtN236T và rtA181T/V kháng adefovir dipivoxil ở những bệnh nhân nhiễm virus HBV mạn tính bằng real-time PCR”. *Báo cáo khoa học Hội nghị CNSH toàn quốc*, tr. 888-890.
5. Lê Huyền Ái Thúy, Liêu Chí Hùng. (2013). “Ứng dụng kỹ thuật real-time PCR để xác định kiểu gen, lượng virus trong máu và đặc điểm kháng thuốc điều trị của virus viêm gan B trên người bệnh của bệnh viện Đa khoa tỉnh Tây Ninh”. *Báo cáo nghiệm thu đề tài NCKH cấp Tỉnh – Sở Khoa học Công nghệ Tỉnh Đồng Tháp*.
6. Đặng Mai Anh Tuấn, Võ Đức Xuyên An, Phạm Hùng Vân. (2010). “Tìm hiểu đột biến kháng adefovir và lamivudine trên HBV tách chiết từ huyết thanh bệnh nhân viêm gan B mạn tính”. *Tạp chí Y Học TP. Hồ Chí Minh*, 14(2), tr. 287-293.
7. Nguyễn Chí Vinh. (2008). “Xây dựng quy trình phát hiện đột biến kháng Lamivudine rt180 – rt204 và thử nghiệm ứng dụng quy trình trên huyết thanh bệnh nhân”. *Báo cáo nghiệm thu, Sở KHCN, TPHCM*.
8. Abe A, Inoue K, Tanaka T *et al.* (1999). “Quantitation of Hepatitis B Virus Genomic DNA by real-time detection PCR”. *J Clin Microbiol*, 37, p.2899-2903.
9. Chang TT, Gish RG, de Man R *et al.* (2006). “A comparison of entecavir and lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B”. *N Engl J Med*, 354, p. 1001-1010.

10. Choi MS, Yoo BC. (2010). “Management of Chronic Hepatitis B with Nucleoside or Nucleotide Analogues: A Review of Current Guidelines”. *Gut and Liver*, 4(1), p.15-24.
11. Chopra GS, Gupta PK, Anand AC *et al.* (2005). “Real-time PCR HBV-DNA analysis: significance and first experience in armed forces”. *MJAFI*, 61, p.234-237.
12. 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, p.619-628
13. Delius H, Gough NM, Cameron CH, Murray K (1983). “Structure of the Hepatitis B Virus Genome”, *Journal of Virology*, 47(2), p.337-343.
14. Ding X, Gu H. (2003). “Molecular epidemiology of Hepatitis virus and Geneotypic distribution Hepatitis B and C virus in Harbin China”. *Jpn.J.Infect*, 56(1), p.19-22.
15. Dunford L, Carr MJ, Dean J, Nguyen LT, Ta TT *et al.* (2012). “A Multicentre Molecular Analysis of Hepatitis B and Blood-Borne Virus Coinfections in Viet Nam”. *PLoS ONE*, 7(6), p.1-11.
16. European Association for the Study of the Liver. (2009). “EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B”. *J Hepatol*, 50, p.227-242.
17. Fung SK, Andreone P, Han SH *et al.* (2005). “Adefovir-resistant hepatitis B can be associated with viral rebound and hepatic decompensation”. *J Hepatol*, 43, p.937-943.
18. Garson JA, Grant PR, Ayliffe U *et al.* (2005). “Real-time PCR quantitation of Hepatitis B Virus using automated sample preparation and murine cytomegalovirus internal control”. *J Virol Methods*, 126, p.207-213.
19. Gish RG, Lok AS, Chang TT *et al.* (2007). “Entecavir therapy for up to 96 weeks in patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B”. *Gastroenterology*; 133, p.1437-1444.
20. Hadziyannis SJ, Tassopoulos NC, Heathcote EJ *et al.* (2006). “Long-term therapy with adefovir dipivoxil for HBeAg-negative chronic hepatitis B for up to 5 years”. *Gastroenterology*, 13, p.1743-1751.
21. Kao JH. (2011). “Molecular Epidemiology of Hepatitis B virus”. *Korean J InternMed*, 26, p.255-261.
22. Koziel MJ, Peters MG. (2007). “Viral hepatitis in HIV infection”. *N Engl J Med*, 356(14), p.1445-1454.
23. Lai CL, Ratziu V, Yuen MF, Poynard T. (2003). “Viral hepatitis B”. *The Lancet*, 362, p.2089-2094.
24. Lampertico P, Vigano M, Manenti E, Iavarone M, Sablon E, Colombo M. (2007). “Low resistance to adefovir combined with lamivudine: a 3-year study of 145 lamivudine-resistant hepatitis B patients”. *Gastroenterology*, 133, p.1445-1451.
25. Lee WM. (1997). “Hepatitis B virus infection”. *N Engl J Med*, 337, p.1733-1745.
26. Liang TJ. (2009). “Hepatitis B: The Virus and Diseases”. *Hepatology*, 49(5S), p.13-21.
27. Lok AS, McMahon BJ. (2009). “Chronic hepatitis B: update 2009”. *Hepatology*, 50, p.661-662.
28. Nguyen CH, Ishizaki A, Chung PT, Hoang HT, Nguyen TV *et al.* (2011). “Prevalence of HBV infection among different HIV-risk groups in Hai Phong, Vietnam”. *J Med Virol*, 83(3), p.399-404.

29. Nguyen LH, Ha NB, Vutien P, Ruel TG, Trinh HN *et al.* (2009). “Prevalence of hepatitis B virus genotype B in Vietnamese patients with chronic hepatitis B”. *Hepatol Int*, 3, p.461-467.
30. Norder H, Couroucé AM, Magnius LO. (1998). “Complete genome, phylogenetic relatedness and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes”. *Virology*, 198, p.489-503
31. Ono SK, Kato N, Shiratori Y *et al.* (2001). “The polymerase L528M mutation cooperates with nucleotide binding-site mutations, increasing hepatitis B virus replication and drug resistance”. *J Clin Invest*, 107, p.449-455.
32. Pas SD, Fries E, De Man RA *et al.* (2000). “Development of a quantitative real-time detection assay for Hepatitis B virus DNA and comparison with two commercial assays”. *J Clin Microbiol*, 38, p.2897-2910.
33. Peters MG, Hann HH, Martin P *et al.* (2004). “Adefovir dipivoxil alone or in combination with lamivudine in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B”. *Gastroenterology*, 126, p.91-101.
34. Phung TB, Alestig E, Nguyen TL, Hannoun C, Lindh M. (2010). “Genotype X/C recombinant (putative genotype I) of hepatitis B virus is rare in Hanoi, Vietnam--genotypes B4 and C1 predominate”. *J Med Virol*, 82(8), p.1327-1333.
35. Rapti I, Dimou E, Mitsoula P, Hadziyannis SJ. (2007). “Adding-on versus switching-to adefovir therapy in lamivudine-resistant HBeAg-negative chronic hepatitis B”. *Hepatology*, 45, p.307-313.
36. Sherman M, Yurdaydin C, Simsek H *et al.* (2008). “Entecavir therapy for lamivudine-refractory chronic hepatitis B: improved virologic, biochemical, and serology outcomes through weeks”. *Hepatology*, 48, p.99-108.
37. Sinn DH, Lee HI, Gwak GY, Choi MS, Koh KC *et al.* (2011). “Virological response to adefovir monotherapy and the risk of adefovir resistance”. *World J Gastroenterol*, 17(30), 3526-3530.
38. Sum SS, Wong DK, Yuen MF *et al.* (2004). “Real-time PCR assay using molecular beacon for quantitation of Hepatitis B Virus DNA”. *J Clin Microbiol*, 42, p.3438-3440.
39. Tan YW, Ge GH, Zhao W, Gan JH, Zhao Y, *et al.* (2012). “YMDD motif mutations in chronic hepatitis B antiviral treatment naïve patients: a multi-center study”. *The Brazillian Journal of Infectious Diseases*, 16(3), p.250-255.
40. Tenney DJ, Rose RE, Baldick CJ *et al.* (2009). “Long-term monitoring shows hepatitis B virus resistance to entecavir in nucleoside-naïve patients is rare through 5 years of therapy”. *Hepatology*, 49, p.1503-1514.
41. Tran HT, Ushijima H, Quang VX., Phuong N, Li TC, Hayashi S *et al.* (2003). “Prevalence of hepatitis virus types B through E and genotypic distribution of HBV and HCV in Ho Chi Minh City, Vietnam”. *Hepatol Res*. 26(4), p.275-280.