

ĐÁNH GIÁ MỐI LIÊN QUAN GIỮA KIỂU GEN HCV VỚI CÁC ĐẶC ĐIỂM CẬN LÂM SÀNG TRÊN BỆNH NHÂN ĐIỀU TRỊ TẠI TRUNG TÂM BỆNH NHIỆT ĐỚI, BỆNH VIỆN HỮU NGHỊ ĐA KHOA NGHỆ AN

Quế Anh Trâm¹, Vũ Thị Nga²

TÓM TẮT

Mở đầu: Viêm gan siêu vi C (HCV) là nguyên nhân chủ yếu dẫn đến xơ gan và ung thư gan, có nguy cơ gây tử vong cao. Trong đó việc xác định chính xác kiểu gen của virus viêm gan C có vai trò quan trọng trong việc tiên lượng thành công của điều trị cũng như thời gian cần thiết của điều trị. **Mục đích nghiên cứu:** Xác định sự phân bố của các kiểu gen (Genotype) của siêu vi viêm gan C và mối liên hệ với các đặc điểm cận lâm sàng. **Phương pháp nghiên cứu:** Hồi cứu, cắt ngang mô tả. **Kết quả:** Trong tổng số 239 bệnh nhân viêm gan C được thực hiện HCV RNA bằng kỹ thuật PCR: Kết quả có 172 (71,97%) trường hợp HCV RNA (+), 67 (28,03%) trường hợp HCV RNA (-). Tỷ lệ HCV genotype 1 chiếm tỷ lệ cao nhất, chiếm 44,19%, sau đó là genotype 6 với 42,44%, genotype 3 chiếm tỷ lệ nhỏ nhất là 1,16% và có 9,88% bệnh nhân không xác định được genotype. Không có mối liên hệ giữa các genotype HCV với giới tính và độ tuổi. **Kết luận:** Trong bốn loạn Genotype HCV được ghi nhận, genotype 1 chiếm tỷ lệ cao nhất. Không có mối liên hệ giữa các genotype HCV với giới tính và độ tuổi.

Từ khóa: Siêu vi viêm gan C (HCV), kiểu gen, viêm gan

SUMMARY

ASSIGNMENT BETWEEN RELATIONSHIP HEPATIS C GENOTYPES WITH PARACLINICAL CHARACTERISTICS IN PATIENTS TREATMENT THE CENTER FOR TROPICAL DISEASES, NGHE AN FRIENDSHIP GENERAL HOSPITAL

Background: Hepatitis C virus (HCV) is the main cause of cirrhosis and liver cancer, with a high risk of death. In which, determining the exact genotype of the hepatitis C virus plays an important role in predicting the success of treatment as well as the necessary duration of treatment. **Objective:** This study was aimed to update the distribution pattern of HCV genotypes and the relationship with subclinical characteristics. **Methods:** This is a descriptive cross-sectional study. **Results:** a total of 239 hepatitis C patients who underwent HCV RNA by PCR: The results were 172 (71,97%) HCV RNA (+) cases, 67 (28,03%)

HCV RNA (-) cases. The proportion of HCV genotype 1 accounted for the highest rate, accounting for 44,19%, followed by genotype 6 with 42,44%, genotype 3 accounted for the smallest rate of 1,16% and 9,88% of patients could not identify the genotype. There was no association between HCV genotypes and sex and age. **Conclusion:** Of the four HCV Genotype disorders recorded, genotype 1 accounts for the highest rate. The relation between HCV genotypes with gender and age is not significant.

Keywords: HCV, genotype, Hepatitis

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Viêm gan virus là một bệnh truyền nhiễm phổ biến đã và đang được quan tâm nhiều trên thế giới, đặc biệt ở các nước đang phát triển như châu Phi, châu Á với tỷ lệ nhiễm bệnh khá cao và thường để lại những hậu quả nặng nề như viêm gan mạn, xơ gan, ung thư gan. Hiện nay, Trung tâm kiểm soát bệnh tật Centers for Disease Control and Prevention – CDC (Atlanta – Mỹ) đã công nhận 7 virus gây viêm gan: A, B, C, D, E, G, và TT virus. Trong các loại virus gây viêm gan trên thì virus viêm gan B và C là hai loại thường gặp hơn cả và gây ra những hậu quả nặng nề dễ dẫn đến viêm gan mạn tính, xơ gan và ung thư gan. Đây là hai loại virus gây viêm gan thường gặp nhiều ở các nước châu Phi, Nam Mỹ và châu Á. Trong những năm gần đây virus viêm gan C (HCV) gây bệnh viêm gan C, lây truyền theo đường máu được đặc biệt chú ý. Tầm quan trọng của viêm gan C không chỉ ở tỷ lệ nhiễm tương đối cao trên thế giới, mà còn chủ yếu do bệnh thường phát triển từ nhiễm cấp tính thành mạn tính (80 – 85%) [1].

Tỷ lệ nhiễm HCV trên thế giới khoảng 1-3% dân số. Theo thống kê của WHO, mỗi năm có hơn một triệu ca nhiễm được báo cáo hàng năm, chỉ riêng tại Hoa Kỳ có gần bốn triệu người bị nhiễm và 30.000 ca nhiễm trùng mới cấp tính được ước tính xảy ra hàng năm [2]. Hiện tại, HCV là nguyên nhân gây ra ước tính khoảng 8.000 đến 10.000 ca tử vong hàng năm ở Hoa Kỳ, và nếu không có biện pháp can thiệp hiệu quả, con số đó được dự đoán sẽ tăng gấp ba lần trong vòng 10 đến 20 năm tới [3]. Được phát hiện vào năm 1989, và cho đến nay vẫn chưa có nghiên cứu thành công về vắc-xin viêm gan C và tỷ lệ nhiễm viêm gan C vẫn còn cao. Do đó, việc phát triển một loại vắc-xin hiệu quả toàn cầu để

¹Bệnh viện Hữu nghị Đa khoa Nghệ An

²Trung tâm Xét nghiệm Y khoa Labhouse

Chịu trách nhiệm chính: Quế Anh Trâm

Email: tramliaen@gmail.com

Ngày nhận bài: 5.01.2023

Ngày phản biện khoa học: 17.2.2023

Ngày duyệt bài: 7.3.2023

ngăn ngừa các ca bệnh mới, đặc biệt là ở các nước kém phát triển, nơi nhiễm HCV phổ biến hơn và việc điều trị là ngoài khả năng tài chính đối với hầu hết bệnh nhân là vấn đề quan trọng hàng đầu. Sự phát triển của một loại vắc-xin như vậy đã bị cản trở, ít nhất một phần, bởi sự không đồng nhất lớn của bộ gen HCV.

Đa số các trường hợp nhiễm HCV không có triệu chứng lâm sàng, nên nhiễm HCV có thể dẫn tới xơ gan hoặc ung thư gan mà không có dấu hiệu báo trước. Do đó, chẩn đoán chính xác tác nhân HCV là một mục tiêu quan tâm hàng đầu của các bác sĩ, từ đó mới điều trị, theo dõi diễn tiến và biến chứng của bệnh, phòng ngừa sự lây lan của HCV. Mặc khác, điều trị đặc hiệu HCV rất tốn kém, cho nên trước khi tiến hành điều trị ta cần đánh giá khả năng điều trị cao hay thấp. Hai yếu tố giữ vai trò quan trọng trong tiên lượng đáp ứng điều trị là tải lượng virus và genotype của virus. HCV có 6 kiểu gen (genotype), gồm 1, 2, 3, 4, 5 và 6. Việc xác định kiểu gen của HCV có một ý nghĩa hết sức quan trọng để xác định phác đồ điều trị cũng như dự đoán đáp ứng điều trị, thời gian tiến hành điều trị. Theo Bộ Y tế, các kiểu gen thường gặp ở nước ta là 1, 2, 3 và 6 [4]. Theo một số nghiên cứu trong nước cho thấy kiểu gen thường gặp nhất là 1, 2 và 6 [5-7].

Kiểu gen của HCV tại đơn vị của chúng tôi như thế nào? Hiện tại, chưa có nghiên cứu nào về kiểu gen HCV của các bệnh nhân khám và điều trị tại đơn vị chúng tôi. Hơn nữa, tỷ lệ phân bố kiểu genotype tại mỗi bệnh viện, thời điểm khác nhau có thể không giống nhau. Để làm sáng tỏ câu hỏi đó, cũng như góp phần vào quá trình chẩn đoán và điều trị tích cực hơn cho người bệnh. Chúng tôi thực hiện nghiên cứu này với mục tiêu "Xác định kiểu gen HCV và đánh giá mối liên quan giữa kiểu gen HCV với các đặc điểm cận lâm sàng trên bệnh nhân điều trị tại Trung tâm Bệnh nhiệt đới, Bệnh viện Hữu nghị đa khoa Nghệ An".

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng và thời gian nghiên cứu: Tất cả mẫu huyết thanh của bệnh nhân đến khám và điều trị tại Trung tâm Bệnh nhiệt đới, Bệnh viện Hữu nghị đa khoa Nghệ An được chỉ định làm anti HCV, HCV RNA, HCV genotype trong thời gian từ 1/2019 đến 12/2019.

Tiêu chuẩn loại trừ: Các mẫu của bệnh nhân đã điều trị HCV, mẫu phát hiện HCV RNA nhưng không được chỉ định làm HCV genotype.

Phương pháp thực hiện xét nghiệm: Mẫu huyết thanh của bệnh nhân nghi ngờ nhiễm

virus HCV (Anti HCV dương tính) được chỉ định xét nghiệm HCV RNA RT-Realtime PCR để đo tải lượng virus. Các mẫu có xác định được tải lượng virus (dương tính) thì tiếp tục thực hiện xác định genotype của HCV bằng kỹ thuật RT-Realtime PCR.

Thiết kế nghiên cứu: Hồi cứu, cắt ngang mô tả

Xử lý số liệu: Số liệu được nhập và xử lý bằng phần mềm SPSS 20.0.

Đạo đức nghiên cứu: Nghiên cứu này được thu thập trên các hồ sơ bệnh án của bệnh nhân, không có bất kỳ can thiệp nào vào quá trình điều trị. Do đó, không ảnh hưởng đến kinh tế người bệnh. Các thông tin được bảo mật.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Thực hiện PCR phát hiện HCV RNA.

Từ tháng 1/2019 đến 12/2019, có 239 bệnh nhân viêm gan C được thực hiện HCV RNA bằng kỹ thuật Realtime PCR: Kết quả có 172 (71,97%) trường hợp HCV RNA (+), 67 (28,03%) trường hợp HCV RNA (-).

3.1.1. Đặc điểm giới tính và tuổi

Bảng 1. Đặc điểm giới tính và tuổi của bệnh nhân có HCV RNA (+)

Đặc điểm	n	%
Giới tính		
Nam	143	83,14
Nữ	29	16,86
Nhóm tuổi		
≤20	3	1,74
21 - 39	52	30,23
40 - 59	75	43,61
≥ 60	42	24,42
Tuổi trung bình	47,482 ± 14,346	
Tuổi trung bình nam	45,818 ± 14,349	
Tuổi trung bình nữ	55,689 ± 14,273	

Kết quả về sự phân bố tỷ lệ nhiễm HCV theo tuổi và giới ở bảng 1 cho thấy tỷ lệ bệnh nhân nam nhiều hơn nữ (83,14% so với 16,86%). Tuổi trung bình của bệnh nhân là 47,482 ± 14,349 tuổi. Trong đó, độ tuổi trung bình của nam thấp hơn nữa (45,818 ± 14,349 so với 55,689 ± 14,273). Nhóm tuổi 40-59 chiếm tỷ lệ cao nhất với tỷ lệ 43,61%.

3.1.2. Tỷ lệ các genotype của HCV

Bảng 2. Tỷ lệ HCV genotype

Genotype	Số lượng	Tỷ lệ (%)
1	76	44,19
2	4	2,33
3	2	1,16
6	73	42,44
Không xác định	17	9,88
Tổng cộng	172	100

Kết quả về sự phân bố kiểu gen qua bảng 2

cho thấy trong 172 bệnh nhân nghiên cứu thì tỷ lệ HCV genotype 1 chiếm tỷ lệ cao nhất, chiếm 44,19%, sau đó là genotype 6 với 42,44%, genotype 3 chiếm tỷ lệ nhỏ nhất là 1,16% và có 9,88% bệnh nhân không xác định được genotype.

3.2. Mối liên hệ giữa các genotype của HCV với giới tính và nhóm tuổi

Bảng 3: Mối liên hệ giữa các genotype với giới tính

Giới tính	Genotype HCV					p
	1	2	3	6	Không xác định	
Nam	65	0	2	56	11	0,606
Nữ	11	3	1	17	6	

Bảng 4. Mối liên hệ giữa các genotype với nhóm tuổi

Nhóm tuổi	Genotype HCV					p
	1	2	3	6	Không xác định	
≤20	2	0	0	0	1	0,067
21 - 39	20	1	2	26	5	
40 - 59	41	3	1	26	7	
≥ 60	13	0	0	21	4	

Nhận xét: Từ kết quả phân tích trong bảng 3 và bảng 4 cho thấy không có mối liên quan có ý nghĩa thống kê giữa các genotype HCV với giới tính và nhóm tuổi.

IV. BÀN LUẬN

Viêm gan do HCV là một bệnh nguy hiểm, vì triệu chứng lâm sàng thường mơ hồ, trong khi đó để lại hậu quả thường nặng nề như bệnh nhân chuyển qua mạn tính, diễn tiến xơ gan, ung thư gan. Do đó, chẩn đoán chính xác tác nhân HCV giúp cho bác sỹ điều trị, theo dõi diễn tiến bệnh tốt cho người bệnh cũng như phòng ngừa sự lây lan của HCV.

Xét nghiệm Anti HCV là xét nghiệm thường quy, dùng sàng lọc bệnh nhân nhiễm HCV. Tuy nhiên, xét nghiệm này có thể âm tính giả hoặc dương tính giả, gây ra những khó khăn nhất định trong điều trị HCV. Do đó, sử dụng kỹ thuật realtime PCR, một kỹ thuật cực kỳ nhạy và đặc hiệu để tìm HCV RNA, HCV genotype giúp cho quá trình điều trị, theo dõi diễn tiến người bệnh tốt hơn.

4.1. Thực hiện xét nghiệm HCV RNA. Xét nghiệm Anti-HCV là xét nghiệm đầu tiên nhằm xác định sự tồn tại của kháng thể kháng virus trong cơ thể. Tuy nhiên, xét nghiệm này dương tính cũng không chắc chắn là người bệnh đang còn virus trong huyết thanh hay virus đang hoạt động hay không. Xét nghiệm HCV RNA giúp chẩn đoán các trường hợp nhiễm HCV hoạt động. Nó

cũng hữu ích trong việc xác nhận các trường hợp dương tính giả (ví dụ viêm gan tự miễn), tải lượng virus, giúp dự đoán, theo dõi thải trừ virus trong quá trình theo dõi điều trị [4].

Trong nghiên cứu của chúng tôi có 239 bệnh nhân có anti HCV dương tính được thực hiện xét nghiệm HCV RNA, trong đó 172 trường hợp có HCV RNA (+) (chiếm 71,97%) chứng minh là có mang virus đang hoạt động. Có 12 bệnh nhân nhiễm HIV, trong đó có 9 bệnh nhân có HCV RNA dương tính. Có 67 trường hợp, chiếm 28,03% HCV RNA (-), điều này có thể do bệnh nhân đã nhiễm và khỏi bệnh, chỉ còn kháng thể tồn tại.

Theo nghiên cứu của Nguyễn Khổng Tường Minh và cộng sự (2017) trên bệnh nhân đồng nhiễm HCV và HIV/AIDS cho thấy HCV RNA dương tính chiếm 67,90% (108/159) trong tổng số trường hợp có anti HCV dương tính [8]. Còn nghiên cứu của Lê Đình Vinh Phúc và cộng sự (2015) tại Bệnh viện Bệnh nhiệt đới Thành Phố Hồ Chí Minh có tỷ lệ HCV RNA dương tính lên đến 83% (83/100) [9]. Một nghiên cứu trên đối tượng công nhân người Myanmar, Campuchia làm việc tại Thái Lan cho thấy tỷ lệ HCV RNA dương tính từ 55,56 – 75,76% [10]. Sở dĩ có sự khác nhau về tỷ lệ HCV RNA dương tính giữa nghiên cứu của chúng tôi với các nghiên cứu trong và ngoài nước là do đặc điểm dân số nghiên cứu mỗi đơn vị là không giống nhau.

4.2. Về đặc điểm dân số nghiên cứu.

Phần lớn các nghiên cứu tại Việt Nam đều cho thấy tỷ lệ nhiễm HCV ở bệnh nhân nam cao hơn nhiều lần so với nữ giới 143 (83,14%) so với 29 (16,86%). Các nghiên cứu của Nguyễn Hiền Minh và cộng sự cũng cho kết quả tỷ lệ nam giới cao hơn nữ giới (55,9% so với 44,1%) [8], tương tự một nghiên cứu khác của tác giả này cũng cho tỷ lệ nam giới cao hơn nữ giới (53% so với 47%) [6]. Tuy nhiên, theo các nghiên cứu của Lê Đình Vinh Phúc và cộng sự thì nam có tỷ lệ thấp hơn nữ (nữ chiếm 57%) [9], nghiên cứu của Phạm Bá Chung và cộng sự có tỷ lệ nam chiếm 43,29%, nữ chiếm 56,71% [5]. Theo nghiên cứu tại Thái Lan trên đối tượng người lao động người Campuchia, Myanmar cho tỷ lệ giới tính khác nhau giữa 2 nước này, theo đó, đối tượng lao động người Campuchia có tỷ lệ nam cao hơn nữ (67,02% so với 32,77%), còn đối tượng lao động người Myanmar thì nam chiếm 39,59%, còn nữ chiếm 54,27% [10].

Về độ tuổi, bệnh nhân trong nghiên cứu này có độ tuổi trung bình là 47,482 ± 14,346, chứng tỏ độ tuổi của người bệnh trong nghiên cứu này

khá trẻ. Trong đó, độ tuổi bệnh nhân nam thấp hơn khá nhiều so với độ tuổi trung bình của bệnh nhân nữ ($45,818 \pm 14,349$ của nam so với $55,689 \pm 14,273$ của nữ giới). Hơn 70% bệnh nhân nằm trong độ tuổi 21-59 tuổi. Trong nghiên cứu của Nguyễn Hiền Minh nhóm tuổi 40-59 tuổi chiếm tỷ lệ cao nhất với 61% [7]. Một nghiên cứu khác của tác giả này cho thấy độ tuổi trung bình của bệnh nhân là $54,7 \pm 12,8$ tuổi, cao hơn khá nhiều so với nghiên cứu này của chúng tôi [6]. Theo Phạm Bá Chung, độ tuổi trung bình của bệnh nhân là $58,69 \pm 11,65$, của nam $57,58 \pm 12,02$, của nữ $59,54 \pm 11,36$ tuổi, cao hơn nhiều so với nghiên cứu của chúng tôi [5]. Còn theo nghiên cứu tại Thái Lan thì độ tuổi trung bình của bệnh nhân là $27,77 \pm 8,14$ đối với lao động người Campuchia, $27,13 \pm 6,19$ đối với lao động người Myanmar, kết quả này là rất thấp so với nghiên cứu của chúng tôi ($47,482 \pm 14,346$) [10], điều này có thể do đối tượng nghiên cứu là người xuất khẩu lao động, nên độ tuổi của dân số nghiên cứu là thấp.

4.3. Về tỷ lệ kiểu genotype của HCV.

Siêu vi viêm gan C là một trong những siêu vi được phân ra làm nhiều kiểu gen (Genotype) và dưới kiểu gen (Subtype) khác nhau. Vì không có sự thống nhất tên gọi làm cho việc xác định kiểu gen gặp nhiều khó khăn, từ đó ý nghĩa kiểu gen trong điều trị HCV sẽ khác nhau. Năm 2002, Anouk T.Dev và cộng sự khi thực hiện việc xác định kiểu gen HCV trên đoạn 5'NC ở các bệnh nhân Đông Nam Á nhận thấy các kiểu gen 7,8,9 lẫn vào kiểu gen 1b 1. Do đó để thống nhất tên gọi các kiểu gen HCV, năm 2005 Peter Simmonds và cs đã đề xuất các cách phân loại kiểu gen HCV và được gọi cho đến nay [11]. Theo đó HCV được phân ra thành 6 kiểu gen chính, và mỗi kiểu gen sẽ có các dưới kiểu gen khác nhau (cho đến nay được chia hơn 80 các dưới kiểu gen) dựa vào các chữ cái a,b,c... Với sự phân chia đa dạng về kiểu gen nên việc xác định HCV genotype rất quan trọng trong xác định phác đồ điều trị phù hợp cho người bệnh, vừa đảm bảo kết quả điều trị hiệu quả, vừa giảm chi phí điều trị so với dung phác đồ điều trị tất cả các genotype HCV.

Các nghiên cứu tại Việt Nam khảo sát kiểu gen HCV dựa trên vùng 5'NC bằng các phương pháp khác nhau và đều có kết quả chung là kiểu gen 1 chiếm đa số với tỷ lệ từ 55% đến 71% sau đó đến kiểu gen 6 và 2 như nghiên cứu của Hồ Tấn Đạt và cộng sự sử dụng kỹ thuật LiPA

trên 272 bệnh nhân viêm gan C cho kết quả tỷ lệ các kiểu gen 1,2,6 lần lượt là 61,4%, 12,5%, 25,7%. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của chúng tôi với kiểu gen 1 chiếm tỷ lệ cao nhất. Trong khi đó, trong nghiên cứu của Nguyễn Hiền Minh và cs với gen đích là vùng NS5B thì kết quả cho thấy kiểu gen 6 chiếm tỷ lệ cao nhất là 55,4%. Sự khác biệt này có thể giải thích do kỹ thuật xác định genotype HCV và gen đích trong các nghiên cứu là khác nhau.

V. KẾT LUẬN

Tại Trung tâm Bệnh nhiệt đới Bệnh viện Hữu nghị Đa khoa Nghệ An, có 4 loại Genotype HCV được ghi nhận, trong đó, genotype 1 chiếm tỷ lệ cao nhất. Không có mối liên hệ giữa các genotype HCV với giới tính và độ tuổi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nizar N %J **Clinical microbiology reviews** Zein (2000), "Clinical significance of hepatitis C virus genotypes". 13(2), tr. 223-235.
2. MP Cooreman và EME %J **Scandinavian Journal of Gastroenterology** Schoondermark-Van de Ven (1996), "Hepatitis C virus: biological and clinical consequences of genetic heterogeneity". 31(sup218), tr. 106-115.
3. **National Institutes of Health %J Hepatology** (1997), "National Institutes of Health Consensus development conference panel statement: management of hepatitis C". 26, tr. 2S-10S.
4. **Bộ Y tế** (2016), Hướng dẫn " Chẩn đoán và điều trị bệnh viêm gan Vi rút C", chủ biên, Bộ Y tế, Hà Nội.
5. **Phạm Bá Chung, Phạm Hùng Vân và Cao Minh Nga** (2015), "Sự phân bố kiểu gen HCV và i128b ở bệnh nhân viêm gan C", Tạp chí Y học TP Hồ Chí Minh. 19(1), tr. 4.
6. **Nguyễn Hiền Minh và Phạm Hùng Vân** (2018), "Tần suất phân bố kiểu gene của siêu vi viêm gan c ở người Việt Nam dựa trên giải trình tự NS5B lượng mẫu lớn", Tạp chí Y học TP Hồ Chí Minh. 22(2), tr. 4.
7. **Nguyễn Hiền Minh, Lý Khánh Vân và Lý Văn Xuân** (2014), "Tỉ lệ phân bố kiểu gene của siêu vi viêm gan C", Tạp chí Y học TP Hồ Chí Minh. 18(1), tr. 6.
8. **Cao Minh Nga và các cộng sự.** (2017), "Sự đề kháng kháng sinh của các vi khuẩn gây nhiễm khuẩn đường tiết niệu ở người lớn", Y học TP Hồ Chí Minh. 14(1), tr. 8.
9. **Lê Đình Vĩnh Phúc và các cộng sự.** (2014), "HCV core antigen ở bệnh nhân nhiễm virus viêm gan C", Tạp chí Y học TP Hồ Chí Minh. 18(1), tr. 8.
10. **Srunthron Akkarathamrongsin và các cộng sự.** (2011), "Seroprevalence and genotype of hepatitis C virus among immigrant workers from Cambodia and Myanmar in Thailand", Intervirology. 54(1), tr. 10-16.