

PHÂN BỐ KIỂU GEN CỦA HBV Ở BỆNH NHÂN NHIỄM VIRUS VIÊM GAN B

NGUYỄN LĨNH TOÀN - Học viện Quân y

TÓM TẮT

Virus viêm gan B (HBV) có 8 kiểu gen (A-H) khác nhau đã được phát hiện với sự phân bố rõ rệt theo khu vực địa lý. Kiểu gen của HBV có liên quan đến diễn biến lâm sàng và hiệu quả điều trị kháng virus. Nghiên cứu này kiểu gen HBV phân lập từ 95 bệnh nhân nhiễm HBV được xác định bằng kỹ thuật PCR-RFLP và giải trình tự gen. Kết quả cho thấy tồn tại 3 kiểu gen của HBV là B, C, D và một kiểu gen tái tổ hợp B với C trên nhóm bệnh nhân này. Trong đó, HBV kiểu gen B chiếm ưu thế 55/95 (57,9%), C chiếm 36/95 (37,9%) và D chiếm 2/95 (2,1%), ngoài ra một kiểu gen tái tổ hợp B và C cũng được phát hiện với tỷ lệ 2/95 (2,1%).

Từ khóa: PCR-RFLP; Kiểu gen HBV, viêm gan B

SUMMARY

There are eight known genotypes of hepatitis B virus (HBV), A–H, with rather well-defined geographic distributions. The clinical course and outcome of antiviral therapy depended on the genotype of the infecting HBV strain. In this study, genotypes of 95 HBV strains isolated from patients with HBV infection were analyzed by using PCR – RFLP and DNA-sequencing. Results showed that three genotypes B, C and D and one recombinant genotypes B and C of HBV have been observed in this patients. Of this, genotype B was found in 55/95 (57,9%) and genotype C in 36/95 (37,9%) and genotype D in 2/95 (2,1%) and one recombinant genotypes B and C in 2/95 (2,1%).

Keywords: PCR-RFLP; HBV genotypes, hepatitis B

ĐẶT VẤN ĐỀ

Virus viêm gan B (HBV) là một trong những nguyên nhân hàng đầu gây bệnh lý gan. Mặc dù đã có vac-xin đặc hiệu, nhưng nhiễm HBV vẫn đang là vấn đề mang tính toàn cầu. HBV là nguyên nhân gây nên các thể lâm sàng bệnh lý gan từ người mang virus không triệu chứng, viêm gan cấp (VGC) tự hồi phục đến viêm gan mạn (VGM), xơ gan (XG), ung thư tế bào gan (UTTBG) đến viêm gan tối cấp [1,2]. Theo ước tính trên thế giới có khoảng 2 tỷ người đã nhiễm HBV, trong đó gần 400 triệu người đang mang HBV mạn tính. Khoảng ba phần tư số người mang HBV mạn tính đang sống ở Châu á và khu vực Sub - Sahara Châu Phi với tỷ lệ cao số người mang HBV trong cộng đồng. Tỷ lệ lưu hành HBV ở mức trung bình tại vùng Địa Trung Hải, Nhật Bản và một phần Đông Âu. Trong khi đó tỷ lệ này thấp dưới 2% dân số tại phần lớn các nước Tây Âu, Châu úc và Bắc Mỹ [2]. Sự khác nhau về tỷ lệ lưu hành toàn cầu có khả năng là do có sự khác biệt về các đường lây truyền HBV chính. ở các vùng bệnh lưu hành địa phương như Châu á và Tây Phi, lây truyền HBV thường xảy ra trong thời kỳ chu sinh, với tỷ lệ lây truyền cho trẻ sơ sinh cao đến 90% từ các bà mẹ có HBsAg (+) và HBeAg (+). Người ta thấy rằng có trên 95% các trường hợp trẻ lây nhiễm HBV từ mẹ trở thành người mang HBV mạn tính [2]. Một số yếu tố virus tác động mạnh đến diễn biến lâm sàng bệnh lý gan do nhiễm HBV bao gồm kiểu gene (genotype), dưới kiểu gen HBV, nồng độ HBV-DNA và đột biến gene HBV cũng như đáp ứng miễn dịch của cơ thể đối với quá trình nhiễm HBV [2,3].

Năm 1988, Okamoto và CS phân tích 18 trình tự bộ gen của HBV đã phát hiện ra các chủng HBV có bộ gen khác nhau trên các bệnh nhân. Kiểu gene A được coi ước là kiểu gen cổ điển và các kiểu gen khác còn lại khác nhau hơn 8% nucleotid (nu.) trên toàn bộ bộ gen của HBV. Như vậy, kiểu gene B sẽ có hơn 8% nu. khác biệt so với kiểu gene A; kiểu gene C có hơn 8% nu. khác so với kiểu gene A và B và tương tự cho đến nay đã phát hiện được 8 kiểu gen HBV khác nhau ký hiệu từ A đến H [4]. Do đó, khi các bệnh nhân được phát hiện có HBsAg(+) có nghĩa là họ có thể nhiễm cùng một kiểu gen, nhưng cũng có thể nhiễm nhiều kiểu gene HBV khác nhau. Từ đó đã gợi mở cho những nhà nghiên cứu hướng tới một trong những cách giải thích cho sự khác biệt về diễn biến lâm sàng bệnh lý gan, hiệu quả điều trị và đáp ứng với thuốc kháng virus cũng như hậu quả tác động mạn tính của chúng trên các bệnh nhân khác nhau [3,4]. Sự phân bố của các kiểu gene HBV có tính chất khu vực và chúng được tìm thấy với tần suất không giống nhau trên các vùng địa lý khác nhau (Schaefer S., 2005). Trong mỗi kiểu gene lại được chia thành các dưới kiểu gene khác nhau, giữa chúng có sự khác nhau từ 4-8% tổng số nu. trên toàn bộ bộ gen. Dưới kiểu gene của một kiểu gene được ký hiệu bằng số 1, 2, 3... Kiểu gene A chia thành dưới kiểu gen A1 hiện được tìm thấy ở khu vực Sub-Sahara, Châu Phi, A2 ở Bắc Âu và A3 ở vùng Tây Phi. Dưới kiểu gene B được chia làm hai nhóm B1 (còn gọi là Bj hoặc B Japan) và B6, dưới kiểu gene này được chứng minh là một tái tổ

hợp gene của phần lõi (core) của kiểu gene C vào trong vùng lõi của kiểu gene B bao gồm B2, B3, B4 và B5 (trước gọi là Ba hoặc B asia). Kiểu gen B1 được tìm thấy ở Nhật Bản, B2-5 phổ biến ở vùng Đông á và B6 là kiểu gen B mới nhất được tìm thấy ở dân bản xứ sống ở vùng Bắc Cực. Kiểu gene C được chia thành dưới kiểu gen C1, C2 và C3 cho thấy phổ biến ở Trung Quốc, Hàn Quốc, Đông Nam á và một số nước thuộc quần đảo Nam Thái Bình Dương [6]. Kiểu gene D trải rộng vòng khắp Đông Âu, khu vực Địa Trung Hải, bao gồm Bắc Phi, Nga, Trung Đông, dưới lục địa ấn Độ và vòng qua Bắc Cực. Kiểu gene E được tìm thấy ở khu vực Bắc Phi. Kiểu gene G của HBV được phát hiện khu trú ở trong những khu vực nhỏ của Thế giới, như ở Mỹ, Việt Nam, Nam Âu và nó xuất hiện nguyên ủy như là đồng nhiễm với kiểu gene khác của HBV, mà phổ biến là với kiểu gene A. Kiểu gene F được chia thành 4 dưới kiểu gene: F1-F4. Kiểu gene H có quan hệ rất gần với kiểu gene F và có nguồn gốc ban đầu là một nhánh của kiểu gene F. Trong 48 bang giáp nhau tại Mỹ, kiểu gene A2, B, C và D là phổ biến được tìm thấy ở những người nhập cư sinh ra đến từ những vùng có kiểu gene đặc trưng của đất nước trước khi nhập cư [6,7]. ở Việt Nam, những nghiên cứu về dịch tễ học gần đây cho thấy rằng, nước ta là một trong những nước có tỷ lệ nhiễm HBV cao nhất thế giới với tỉ lệ từ 15 - 26% quần thể người khỏe mạnh có HBsAg(+) [8]. Tỷ lệ có dấu ấn HBV trong huyết thanh tăng dần trên bệnh nhân viêm gan cấp, mạn tính và có thể tới 80 - 90% trên nhóm bệnh nhân xơ gan và ung thư gan. Có nhiều nghiên cứu về kiểu gen HBV tuy nhiên kết quả không thống nhất và phụ thuộc vào phương pháp và vùng địa lí cũng như quần thể bệnh nhân nghiên cứu. Trong nghiên cứu này, chúng tôi xác định phân bố kiểu gen HBV trên nhóm bệnh nhân mang HBV.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

- Bệnh nhân: gồm 95 mẫu huyết thanh của bệnh nhân nhiễm HBV mạn tính có HBsAg(+) và HBV-DNA(+). Không có dấu hiệu mang virus viêm gan C và HIV có anti-HCV(-) và anti-HIV(-). Các bệnh nhân đến xét nghiệm HBV tại Trung tâm y được học Quân sự, Học viện Quân y.

-HBV tái tổ hợp: Bộ gen HBV chủng hoang dại (wt) được tái tổ hợp trong vector mang toàn bộ bộ gen HBV ký hiệu pHBV1.28 và pHBV1.5 (kiểu gen A), pHBV1.2 (kiểu gen D) và HBVpd4a1 (kiểu gen C) theo thứ tự chứa 1.2mer, 1.28mer, 1.5mer HBV đã được mô tả chi tiết trong các nghiên cứu gần đây và tái tổ hợp HBV kiểu gen B [3,10].

-Trình tự 70 bộ gen HBV chủng wt đại diện cho 8 kiểu gen HBV trên ngân hàng gen (Genbank) được sử dụng làm tham chiếu phân tích kiểu gen HBV [3].

2. Phương pháp nghiên cứu.

2.1. Các mồi (primer). Các mồi được dùng nhân đoạn gen tiền nhân preCore HBV sử dụng phương pháp PCR lồng (nested-PCR) được mô tả trong nghiên cứu gần đây [3,5]. Phản ứng PCR thứ nhất bộ mồi được thiết kế mục đích làm tăng khả năng phát hiện

HBV-DNA: HBVpre16: 5'-CACCTCTGCCAATCATCT CT-3' và HBV-509as 5'-CTGCGAGGCGAGGGAGTT-3'. Phân biệt kiểu gen HBV sử dụng bộ mồi của Hannoun và CS (2002) HBV-F: 5'-CAAGCCTCCAAG CTGTGCCTTGGGTGGCCTT-3'; HBV-AR: 5'-TTCTT CTCTAGGGGACCTGCCTCGGTCCCG-3' (521bp) và HBV-nonAR: 5'-TT CTCTTCTAGGGGACCTGC CTGCTCGTCT-3'(516bp) [3,5].

2.2. Tách và tinh sạch HBV-DNA. HBV-DNA được tách và tinh sạch từ 200 μ l huyết thanh bệnh nhân sử dụng bộ kit thương mại của hãng QIAgen. Quy trình tách DNA và tinh sạch theo hướng dẫn của nhà sản xuất (www1.qiagen.com). Nồng độ DNA toàn phần được đo kiểm tra trên hệ thống Nano Drop đảm bảo độ tinh sạch và nồng độ DNA được sử dụng cho phản ứng PCR.

2.3. Phản ứng PCR-RFLP. Thực hiện phản ứng PCR lồng nhân đoạn gene precore HBV được thực hiện qua 2 phản ứng PCR. Phản ứng PCR thứ nhất sử dụng cặp mồi HBVpre16 và HBV-509as [3]. Phản ứng PCR thứ 2 thực hiện theo qui trình đã mô tả của Hannoun và CS (2002) với 3 primer HBV-F, HBV-AR và HBV-nonAR [3]. Nồng độ và thành phần phản ứng PCR như sau: đệm 1x (10 mmol/l Tris-HCl pH 8.3, 50 mmol/l KCl và 1.5 mmol/l $MgCl_2$), d-NTP x 0,2mM, taq DNA polymerase x 2 unit (NEB), DNA tổng số x 20ng và nước khử ion vừa đủ cho 50 μ l. Chu kỳ nhiệt như sau: 94 °C cho 4 phút, tiếp theo là 35 chu kỳ bao gồm: 94 °C trong 30 giây, 58 °C trong 40 giây, kéo dài ở 72 °C trong 45 giây và cuối cùng duy trì 72 °C trong 7 phút. Sản phẩm PCR sau khi đã xác định được ủ với enzyme FastDigest SspI và Tsp509I (TasI) để xác định các kiểu gen của HBV. Quy trình chẩn đoán kiểu gen HBV bằng phản ứng PCR-RFLP dùng enzyme SspI và TasI dựa trên kích thước sản phẩm PCR mô tả chi tiết trong nghiên cứu gần đây. Thành phần phản ứng RFLP gồm đệm 1x, enzyme x 2 unit, sản phẩm PCR x 10 μ l và nước khử ion vừa đủ 20 μ l. Ủ với nhiệt độ theo thứ tự enzym SspI và TasI là 37°C x 15 phút và 65°C trong 2 giờ [10]. Sản phẩm PCR-RFLP được nhuộm Ethidium bromide, điện di trên gel agarose 1,5% và đọc trên máy đọc Gel – Doc.

2.4. Định lượng nồng độ HBV-DNA. HBV DNA được định lượng bằng kỹ thuật Real time PCR trên hệ thống Realtime PCR LightCycler 2.0 (Roch, Thủy Sỹ), áp dụng nguyên lý Hydrolysis Probe (TaqMan Probe) để phát hiện sản phẩm PCR. Nguyên lý này như sau: phản ứng Real time sử dụng TaqMan Probe được thiết kế gồm: Một bộ mồi đặc hiệu và một chuỗi oligonucleotide (Probe) có trình tự bổ sung với đoạn trình tự khuôn nằm giữa hai mồi. Mẫu dò oligonucleotide được thiết kế với đầu 5' gắn chất phát tín hiệu huỳnh quang (Reporter) và đầu 3' gắn một chất kìm hãm sự phát tín hiệu huỳnh quang phát ra từ Reporter được gọi chung là Quencher. Mẫu dò này ở trạng thái nguyên vẹn (không bị phân hủy), ở trạng thái bình thường (không bị kích hoạt) thì toàn bộ năng lượng phát ra từ Reporter được truyền sang Quencher khiến cho Reporter không phát được tín hiệu huỳnh quang mà chỉ có Quencher phát được, nhưng máy

chủ sẽ không nhận được tín hiệu vì hệ thống kính lọc không phù hợp với bước sóng phát ra từ Quencher. Khi phản ứng PCR diễn ra, mẫu dò sẽ bắt cặp bổ sung vào DNA khuôn sau đó bị phân cắt bởi hoạt tính 5'exonuclease của TaqDNA polymerase trong quá trình tổng hợp chuỗi. Chính nhờ sự phân cắt này làm cho Reporter được giải phóng khỏi Quencher để phát tín hiệu huỳnh quang, đồng thời loại bỏ mẫu dò khỏi khuôn DNA cho phép kéo dài tiếp sản phẩm PCR. Reporter bị phân cắt khỏi khuôn DNA sau mỗi chu kỳ của phản ứng PCR có nghĩa là tín hiệu huỳnh quang thu được sẽ tỷ lệ với sự nhân lên của sản phẩm PCR. Dựa vào nguyên lý trên một cặp mồi trong vùng bảo tồn của gen S của HBV và mẫu dò oligonucleotide có đầu 5'(Reporter) mang hợp chất phát mẫu FAM và đầu 3'(Quencher) mang hợp chất TAMRA được thiết kế để định lượng nồng độ HBV DNA [3] HBs-F 5' - CAACCTCCAATCACTCACCAAC-3' , HBs R 5' - ATATGATAAAACGCCGACAGACACA-3' , HBs-Taq 5' -(FAM)TCCTCCAATTTGTCCTG- GTTATCGCT(TAMRA)-3' .

Nồng độ DNA của virus HBV sẽ được định lượng dựa trên cường độ của các tín hiệu huỳnh quang và một bộ chuẩn đối chứng. Phương pháp này cho phép định lượng chính xác nồng độ của HBV – DNA (số copies/ml). Đồng thời cho biết nồng độ của đoạn gene đích ngay trong từng thời điểm quan tâm.

2.5. Phương pháp giải trình tự gen trực tiếp (direct DNA-Sequencing). Giải trình tự gen xác định vị trí sắp xếp các nucleotid trong phân tử AND tiến hành theo phương pháp của Sanger trên máy đọc trình tự ABI 3130 XL, phân tích kết quả bằng các phần mềm sinh tin học chuyên dụng BioEdit 7.01. Giải trình tự gen ngẫu nhiên 30 mẫu trên cả hai vùng tiền nhân (precore) và vùng S của bộ gen HBV. Thành phần phản ứng PCR-sequencing: 5X BigDye Buffer x 2 μ l, BigDye terminator x 4 μ l, mỗi HBV-AR hoặc HBV-nonAR x 1 μ l, DNA template x 0,8 μ g và nước cất khử ion vừa đủ 20 μ l. Chu trình nhiệt 96°C x 1 phút tiếp đến 25 chu kỳ (96°C x 10 giây, 50°C x 5 giây và 60°C x 4 phút) giữ ở 4°C. Sản phẩm PCR sau khi gắn BigDye được tinh sạch và biến tính HiDi sau đó phân tích trình tự trên hệ thống giải trình tự tự động ABI 3130 XL tại Trung tâm y dược học Quân sự, Học viện Quân y.

2.6. Phân tích trình tự gen. Trình tự gen HBV được so sánh dùng công cụ CLUSTAL_W (Thompson và CS., 1994) và BLAST (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast>). Những trình tự gen của HBV sau khi đã được so sánh sẽ được kiểm tra phân tích dùng chương trình BioEdit 7.01 (Department of Microbiology, North Carolina State University, Raleigh, NC, USA; <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Khác biệt về gen được tính toán sử dụng phương pháp Kimura two-parameter (Kimura, 1980) và phân tích loài (phylogenetic trees) được dựng bởi chương trình neighbour-joining (Saitou và Nei, 1987). Kết quả phân tích loài HBV được quan sát sử dụng phần mềm TreeView v.1.6.6.

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

1. Kết quả tách DNA tổng số trong huyết thanh bệnh nhân.

Tách và tinh sạch DNA tổng số từ các mẫu huyết thanh của 95 bệnh nhân mang HBV có HBsAg (+) sử dụng bộ kit của QIAgen. Quy trình tách DNA theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau tách nồng độ và độ tinh sạch của DNA được kiểm tra bằng hệ thống Nanodrop (bảng 1).

Bảng 1. Nồng độ và độ tinh sạch của DNA tổng số tách từ các mẫu nghiên cứu

Số mẫu (n)	Nồng độ (ng/μl)	Độ tinh sạch (OD) (260/280)
30	Từ 50 - 100	Từ 1,6 - 1,8
55	Từ 100 - 150	Từ 1,8 - 2,0
10	Từ 150 - 200	Từ 2,0 - 2,2
Tổng số mẫu	95	95

Nồng độ DNA huyết thanh của các mẫu chủ yếu là từ 100 - 150 ng/μl, độ tinh sạch chủ yếu đo được là OD (260/280) = 1,8 - 2,0. Với độ tinh sạch và nồng độ DNA này đảm bảo chất lượng DNA cho phép thực hiện phản ứng PCR nhận gen của HBV trong mẫu bệnh nhân.

2. Nồng độ HBV - DNA định bằng realtime - PCR.

Bảng 2. Nồng độ HBV-DNA trong huyết thanh bệnh nhân nghiên cứu.

Nồng độ	Số mẫu (n=95)	Tỷ lệ (%)
$< 5 \times 10^2$	1	1,07
$10^2 - 10^3$	2	2,10
$10^3 - 10^4$	13	13,68
$10^4 - 10^5$	23	24,21
$> 10^5$	56	58,94

Nồng độ HBV - DNA mẫu nghiên cứu chủ yếu trên 10^5 copies chiếm 56/95 (58,94%), từ $10^4 - 10^5$ chiếm 23/95 (24,21%).

3. Phân bố của kiểu gen của HBV

Bảng 3. Tỷ lệ phân bố kiểu gen của HBV ở bệnh nhân nghiên cứu

HBV	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Kiểu gen B	55	57,9
Kiểu gen C	36	37,9
Kiểu gen D	2	2,1
Kiểu gen tái tổ hợp B+C	2	2,1
Tổng số	95	100

Bằng phương pháp PCR-RFLP và giải trình tự gen, phân tích loài xác định tỷ lệ kiểu gen B là 55/95 (57,9%), kiểu gen C là 36/95 (37,9%), kiểu gen D là 2/95 (2,1%) và kiểu gen tái tổ hợp B và C là 2/95 (2,1%) (Bảng 3). Chứng minh kiểu gen tái tổ hợp HBV chúng tôi phân tích trình tự gen của 30 mẫu HBV cho kết quả bao gồm 15 mẫu được xác định là kiểu gen B, 11 mẫu được xác định là kiểu gen C, 2 mẫu được xác định là kiểu gen D hoàn toàn phù hợp với phương pháp PCR-RFLP. Tuy nhiên, trong toàn bộ 95 mẫu nghiên cứu có 2 mẫu không xác định được bằng kỹ thuật PCR - RFLP được phân tích bằng giải trình tự gen trên cả hai vùng S và preCore chứng minh là HBV tái tổ hợp kiểu gen B và C.

Để xác định chính xác HBV kiểu gen tái tổ hợp B+C xuất hiện trong nhóm nghiên cứu, chúng tôi tiếp tục phân tích so sánh trên ngân hàng gen (Genbank) sử dụng phương pháp BLAST-genotyping. Kết quả chứng minh hai chủng HBV xuất hiện trong nhóm nghiên cứu là kiểu gen tái tổ hợp kiểu gen B và C

Nghiên cứu gần đây chứng minh HBV kiểu gen B và C là hai kiểu gen phổ biến ở nước ta [7,8,9]. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với một số tác giả công bố gần đây ở người Việt Nam HBV chủ yếu mang kiểu gen B và C, ngoài ra các kiểu gen A, D và tái tổ hợp hoặc đồng/bội nhiễm các kiểu gen B và C với các kiểu gen A, D, E và G [7]. Gần đây, Trần T. Tuấn Huy và cs (2004) nghiên cứu trên 115 bệnh nhân gồm 39 viêm gan cấp và 76 viêm gan mạn tính. Các tác giả thấy rằng, ở nhóm viêm gan cấp chủ yếu là kiểu gen B chiếm 74,3%. Trong khi đó nhóm viêm gan mạn kiểu gen C chiếm 81% [8]. Nghiên cứu của Trần Xuân Chương trên 80 bệnh nhân viêm gan virus B cấp cho thấy có 56 trường hợp mang kiểu gen B, 22 trường hợp mang kiểu gen C, 1 trường hợp mang kiểu gen A và 1 trường hợp mang kiểu gen hỗn hợp B và C. ở Miền Bắc, nghiên cứu của Bùi Xuân Trường trên các nhóm bệnh nhân khác nhau cũng cho kết quả tương tự là kiểu gen B chiếm tỷ lệ 71,9%, kiểu gen C là 29,1%, trong đó kiểu gen B phổ biến hơn hẳn kiểu gen C ở nhóm người mang virus và viêm gan mạn [9].

KẾT LUẬN

Kết quả phân tích kiểu gen HBV trên 95 bệnh nhân nhiễm HBV bằng kỹ thuật PCR-RFLP trên vùng preCore HBV và giải trình tự gen chứng minh tồn tại 3 kiểu gen của HBV là B, C, D và tái tổ hợp kiểu gen B với C trên nhóm bệnh nhân này. Trong đó, HBV kiểu gen B chiếm ưu thế 57,9%, C chiếm 37,9% và D chiếm 2,1%, ngoài ra kiểu gen tái tổ hợp B và C cũng được phát hiện với tỷ lệ 2,1%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Acharya SK, Panda SK, Saxena A and Gupta SD. Acute hepatic failure in India: a perspective from the East. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 473-9.
- Chisari FV. Rous-Whipple Award Lecture. Viruses, immunity, and cancer: lessons from hepatitis B. *Am J Pathol*. 2000 Apr;156(4):1117-32.
- Toan NL, Song Le H, Kremsner PG, Duy DN, Binh VQ, Stefan Kaiser, Kandolf R., Torresi J, and C.-Thomas Bock. Impact of the hepatitis B virus genotype and genotype-mixtures on the course of the liver disease. *Hepatology*. 2006 Jun;43(6):1375-84.
- Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M (1988), Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes, *Journal General Virology*, 69: 2575-2583.
- Hannoun C, Krogsgaard K1, Horal P, Lindh M (2002), Interpreted trial group. Genotype mixtures of hepatitis B virus in patients treated with interferon, *Journal Infectious Diseases*, 186: 752-9.
- Chu CJ, Keefe E, Han SH, Perrillo RP, Min AD, Soldevila-Pico C, et al (2003). Hepatitis B virus genotypes in the United States: results of a nationwide study. *Gastroenterology*. 125:444-451.