

# ĐỘ NHẠY VÀ ĐẶC HIỆU KỸ THUẬT PCR-RFLP XÁC ĐỊNH KIỂU GEN CỦA VIRUT VIÊM GAN B

Nguyễn Linh Toàn\*; Hoàng Xuân Sử\*

## TÓM TẮT

Có nhiều phương pháp xác định kiểu gen của HBV đang được sử dụng như PCR đa mồi, line probe, RT-PCR, oligonucleotide microarray, giải trình tự gen, dot blot ngược dòng, PCR-RFLP. Mỗi phương pháp đều có ưu, nhược điểm riêng và độ nhạy, đặc hiệu của chúng cũng không giống nhau. Trong nghiên cứu này chúng tôi đánh giá độ nhạy và đặc hiệu của kỹ thuật PCR-RFLP dùng enzym giới hạn SspI và TasI. Kết quả cho thấy kỹ thuật PCR-RFLP này có độ nhạy và đặc hiệu 100%, phù hợp so với giải trình tự gen là 28/30 (93,33%) và ngưỡng phát hiện là  $10^1$  copies đối với các mẫu HBV-plasmide tái tổ hợp.

\* Từ khoá: PCR-RFLP; Kiểu gen HBV; Giải trình tự gen.

## SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF PCR-RFLP IN IDENTIFICATION OF HBV GENOTYPE

### SUMMARY

*There are many methods for identifying HBV genotypes such as multiplex-PCR, line probe assay, real-time PCR, oligonucleotide microarray, DNA-sequencing, flow-through reverse dot blot, PCR-RFLP. These methods had been shown the advantage and disadvantage and the sensitive and specific levels were not the similar methods. In this study, we have evaluated the sensitivity and specificity of PCR-RFLP assay using SspI and TasI enzymes. The results showed that sensitivity and specificity of PCR-RFLP assays were 100%. In comparison with DNA-sequencing method, accordance of the PCR-RFLP assay for diagnostic HBV genotypes was 28/30 (93.33%) and a minimal level of HBV-DNA for the assay was 10 copies/ml for HBV-plasmid.*

\* Key words: PCR-RFLP; HBV genotypes; DNA-sequencing.

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Virut viêm gan B (hepatitis B virus, HBV) là một trong những nguyên nhân hàng đầu gây bệnh lý gan. Mặc dù đã có vắc xin phòng HBV đặc hiệu, nhưng tỷ lệ người mang HBV vẫn rất cao. Theo ước tính, hiện có gần 400 triệu người đang mang HBV mạn tính, chiếm 6% dân số thế giới. Nhiễm

HBV có thể gây nên nhiều thể bệnh khác nhau từ người mang virut không triệu chứng, viêm gan cấp tính tự hồi phục, đến viêm gan mạn, xơ gan và ung thư tế bào gan và viêm gan tối cấp [5]. Ước tính mỗi năm có hơn một triệu người chết do hậu quả của nhiễm HBV mạn tính [6]. Có nhiều nguyên nhân khác nhau về bệnh cảnh lâm sàng nhiễm HBV như do đáp ứng miễn dịch

---

\* Học viện Quân y

Phản biện khoa học: TS. Trần Văn Khoa

của vật chủ, đặc điểm di truyền tế bào và của chính chủng virut đó như kiểu gen (genotype), đột biến gen của HBV... đều ít nhiều có liên quan đến bệnh cảnh lâm sàng bệnh lý gan [8]. Kiểu gen HBV được Okamoto và CS ghi nhận lần đầu năm 1988 [7]. Đến nay, có 9 kiểu gen khác nhau, ký hiệu từ A-I được phát hiện với khác biệt trên 8% nucleotid (nu.) trên toàn bộ bộ gen của HBV [7, 9]. Ví dụ, khi bệnh nhân (BN) có HBsAg (+), khả năng họ có thể nhiễm cùng một kiểu gen, hoặc nhiều kiểu gen HBV khác nhau. Ở Việt Nam, hầu hết các kiểu gen của HBV đã được phát hiện, trong đó chiếm ưu thế là kiểu gen B và C. Đặc biệt là đồng nhiễm hơn một kiểu gen và tái tổ hợp các kiểu gen của HBV cũng phổ biến ở nước ta hiện nay [9, 10]. Hiện nay, có nhiều phương pháp xác định kiểu gen của HBV như PCR đa mồi [3], line probe (line probe assay, LiPA) [2], RT-PCR, oligonucleotide microarray, phương pháp giải trình tự gen (sequencing) [1], dot blot ngược dòng [10] và PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) [7, 8]. Năm 2002, Hannoun và CS (1998) đã phát triển kỹ thuật PCR-RFLP xác định kiểu gen của HBV trên vùng preCore của HBV [4]. Ở Việt Nam, xác định kiểu gen HBV chủ yếu sử dụng phương pháp giải trình tự gen, line probe, PCR đa mồi và PCR-RFLP. Trong công trình này, chúng tôi *đánh giá độ nhạy, đặc hiệu của kỹ thuật PCR-RFLP xác định các kiểu gen của HBV.*

## **VẬT LIỆU, ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **1. Vật liệu và đối tượng nghiên cứu.**

*\* Plasmid HBV tái tổ hợp và mẫu bệnh phẩm:*

Các plasmid HBV tái tổ hợp mang bộ gen HBV ký hiệu pHBV1.28 và pHBV1.5

(kiểu gen A), pGEMT-HBV-B (kiểu gen B), HBVpd4a1 (kiểu gen C), pHBV1.2 (kiểu gen D) theo thứ tự chứa 1,2 mer, 1,28 mer, 1,5 mer được tái tổ hợp mang gen HBV ứng dụng trong nhiều nghiên cứu và công bố gần đây [8]. 30 mẫu ADN-HBV (+) tách từ các BN có HBsAg (+), 30 mẫu ADN-HIV (+) và HBsAg (-) tại Phòng Vi sinh và Mầm bệnh, Trung tâm Sinh - Y - Dược học Quân sự, Học viện Quân y.

*\* Các primer:*

Các primer thiết kế cho phản ứng PCR lồng (nested-PCR, nPCR) dùng trong nghiên cứu bao gồm: cặp mồi cho phản ứng PCR vòng ngoài: HBVpre16: 5'-CACCTCTGCCAATCATCTCT-3' và HBV-509as 5'-CTGCGAGGCGAGGGAGTT-3' [8]. Các primer vòng trong khuếch đại vùng preCore-HBV được Hannoun và CS mô tả (2002). HBV-F: 5'-CAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTGGCCTT-3'; HBV-AR: 5'-TTCTTCTTCTAGGGGACCTGCCTCGGTCCCG-3' (521bp) và HBV-NonAR: 5'-TTCTTCTTCTAGGGGACCTGCCTCGTCGTCT-3'(516bp).

### **2. Phương pháp nghiên cứu.**

*\* Tách và tinh sạch ADN-HBV:*

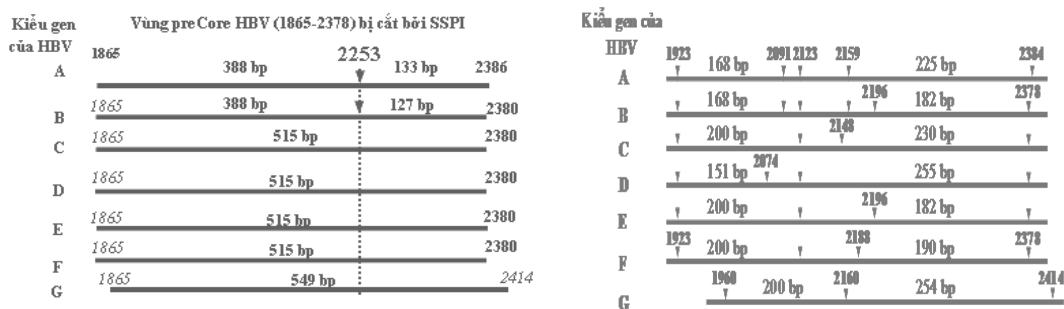
Tách và tinh sạch ADN-HBV từ huyết thanh BN HBsAg (+), sử dụng bộ kit của hãng QIAgen. Quy trình tách tinh sạch theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Kiểm tra ADN tổng số trên hệ thống NanoDrop, đảm bảo độ tinh sạch và nồng độ ADN sử dụng cho các phản ứng PCR.

*\* Phản ứng PCR-RFLP:*

Thực hiện phản ứng nPCR nhân đoạn gen precore của HBV, thực hiện theo 02 vòng PCR. Phản ứng PCR thứ nhất sử dụng cặp primer HBVpre16 và HBV-509as

[8]. Phản ứng PCR thứ 2 thực hiện theo quy trình đã mô tả của Hannoun và CS (2002) với 3 primer HBV-F, HBV-AR và HBV-NonAR [4]. Nồng độ và thành phần phản ứng PCR như sau: đệm 1x (chứa 10 mmol/l Tris-HCl pH 8,3, 50 mmol/l KCl và 1,5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>), d-NTP x 0,2 mM, taq ADN polymerase x 2 unit (NEB), ADN tổng số x 20 ng và nước khử ion vừa đủ cho 50 µl. 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, ủ với enzym giới hạn FastDigest SspI và Tsp509I (TasI) để xác định các kiểu gen của HBV. Sơ đồ hoạt động của enzym TasI phân biệt các kiểu gen HBV dựa trên kích thước sản phẩm PCR mô tả trong nghiên cứu gần đây [4, 8].



Hình 1: Vị trí cắt và các đoạn PCR tạo thành khi dùng SSPI (A) và TasI (B) cắt phân biệt các kiểu gen HBV [8].

Thành phần phản ứng RFLP gồm đệm x 1x, FastDigest enzym x 2 unit, sản phẩm PCR x 10 µl và nước khử ion vừa đủ 20 µl. Ủ với nhiệt độ theo thứ tự enzym giới hạn FastDigest SspI và TasI là 37°C x 15 phút và 65°C trong 2 giờ. Nhuộm ethidium bromide sản phẩm PCR-RFLP, điện di trên gel agarose 1,5% và đọc trên máy đọc Gel-Doc.

*\* Phương pháp giải trình tự ADN (Sequencing):*

Giải trình tự gen là phương pháp xác định vị trí sắp xếp nucleotid trong phân tử ADN [1]. Nguyên lý của phương pháp này là: tổng hợp các mạch đơn ADN mới có độ dài ngắn hơn mạch khuôn; nhờ kỹ thuật đánh dấu và ngắt đoạn trong quá trình tổng hợp mạch ADN, thu được các mạch đơn hơn kém nhau một base; từ đó có sơ đồ trật tự mạch ADN khuôn mẫu. So sánh trật

tự mạch của mẫu thí nghiệm với trật tự ADN chuẩn ta biết được kiểu gen khác nhau cũng như phân tích đột biến điểm xảy ra. Tiến hành giải trình tự theo phương pháp của Sanger trên máy đọc trình tự tự động ABI 3130 XL, phân tích kết quả bằng phần mềm sinh tin học chuyên dụng BioEdit 7.01. Thành phần phản ứng PCR-sequencing: 5X BigDye Buffer x 2 µl, BigDye terminator x 4 µl, Primer HB-1865 hoặc nonA x 1 µl, ADN template x 0,8 µg và nước cất khử ion vừa đủ 20 µl. 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 gạn BigDye được tinh sạch và biến tính HiDi, phân tích trình tự trên hệ thống giải trình tự tự động ABI 3130 XL.

*\* Phân tích trình tự gen:*

So sánh trình tự gen HBV bằng công cụ CLUSTAL\_W (Thompson và CS, 1994) và BLAST (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast>). Trình tự gen của HBV sau khi so sánh sẽ được kiểm tra phân tích thêm, dùng chương trình BioEdit 7.01 (Department of Microbiology, North Carolina State University, Raleigh, NC, USA;

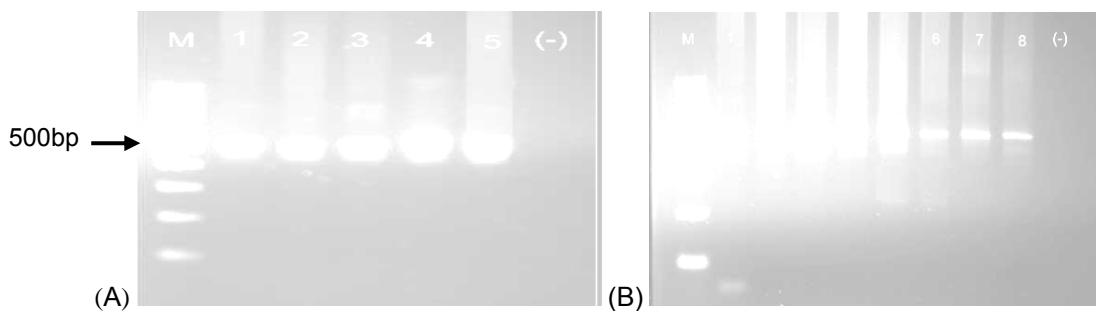
<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

Tính toán khác biệt gen, sử dụng phương pháp Kimura two-parameter (Kimura, 1980) và phân tích loài (phylogenetic trees) bằng chương trình neighbour-joining (Saitou và Nei, 1987). Quan sát kết quả phân tích loài HBV, sử dụng phần mềm TreeView v.1.6.6 (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>) [8].

**KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU**

**1. Nhân đoạn gen vùng preCore-HBV bằng phản ứng nested-PCR.**

Các plasmid mang 4 kiểu gen A, B, C và D của HBV và ADN-HBV tách từ huyết thanh BN thực hiện phản ứng PCR lồng với primer đặc hiệu. Kết quả 5/5 plasmid HBV và 30/30 mẫu ADN-HBV đều cho sản phẩm PCR đặc hiệu với kích thước 521bp (HBV-A) hoặc 516bp đối với kiểu gen còn lại (hình 2).



Hình 2: (A) Sản phẩm nPCR từ 5 plasmid HBV kiểu gen A-D và (B) từ 8 mẫu ADN-HBV tách từ huyết thanh BN HBsAg (+).

**2. Đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu và sự phù hợp của nPCR xác định kiểu gen HBV so với giải trình tự gen.**

*\* Độ nhạy và ngưỡng phát hiện của phản ứng nPCR dùng primer nhân đoạn gen preCore-HBV:*

- Để đánh giá độ nhạy của phản ứng nPCR nhân đoạn gen vùng preCore - HBV, chúng tôi thực hiện phản ứng nPCR trên 30 mẫu ADN-HBV tách từ huyết thanh BN có HBsAg (+) và xác định ADN-HBV (+). Kết quả 30/30 (100%) cho sản phẩm PCR đặc

hiệu có kích thước phù hợp với primer xác định (hình 2, bảng 1).

Bảng 1: Kết quả thực hiện phản ứng nPCR dùng primer nhân đoạn gen preCore-HBV.

		ADN-HBV (+)	TỔNG
Nested-PCR	+	30	30
	-	0	0
Tổng		30	30

(+), các mẫu dương tính và (-), các mẫu âm tính của phản ứng nPCR dùng primer

nhân đoạn gen preCore-HBV đối với mẫu ADN-HBV (+). Như vậy, độ nhạy (Se) = 30/30 x 100% = 100%.

- Để đánh giá ngưỡng phát hiện của phản ứng PCR-RFLP xác định kiểu gen của HBV, thực hiện phản ứng nPCR trên các mẫu plasmide mang bộ gen HBV tái tổ hợp với các độ pha loãng từ  $10^1$  -  $10^6$  copy. Kết quả cho thấy, phản ứng nPCR ở nồng độ 10 copy vẫn cho sản phẩm PCR rõ nét (hình 3). Các phản ứng lặp lại 3 lần trong cùng một điều kiện, đều cho kết quả tương tự.



Hình 3: Hình sản phẩm của phản ứng nPCR trên các mẫu HBV-plasmide tái tổ hợp.

M: Marker 50 bp; các cột từ 1 - 6 lần lượt tương ứng với các độ pha loãng từ  $10^6$  -  $10^1$  copy.

\* Độ đặc hiệu của phản ứng nPCR dùng primer nhân đoạn gen preCore-HBV:

Để đánh giá độ đặc hiệu về loài của phản ứng nPCR dùng primer nhân đoạn gen preCore-HBV trên 30 mẫu ADN-HIV (+), kết quả 30/30 mẫu đều âm tính (bảng 2, hình 4).



Hình 4: Hình điện di phản ứng nPCR trên các mẫu ADN-HIV (+), ADN-HBV (-) dùng các primer nhân đoạn gen preCore-HBV.

Cột 1 và 10: thang chuẩn ADN 100 bp; cột từ 1 - 8: chứng âm; cột 9: chứng dương.

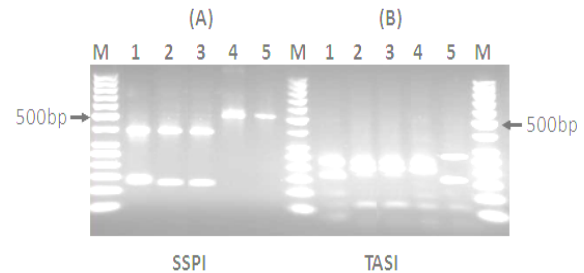
Bảng 2: Kết quả thực hiện kỹ thuật nPCR dùng primer nhân đoạn gen preCore-HBV.

		ADN-HIV	Tổng
nPCR	+	0	0
	-	30	30
<b>Tổng</b>		30	30

(+), các mẫu dương tính và (-), các mẫu âm tính của phản ứng nPCR với các primer nhân đoạn gen preCore-HBV. Độ đặc hiệu (Sp) = 30/30 x 100% = 100%.

\* Đánh giá sự phù hợp của kỹ thuật PCR-RFLP xác định kiểu gen HBV so với giải trình tự gen:

Để chứng minh sự phù hợp và chính xác của xác định kiểu gen HBV bằng kỹ thuật PCR-RFLP dùng enzyme giới hạn SspI và TasI (hình 5) so sánh với kỹ thuật giải trình tự gen trên vùng preCore-HBV, kết quả tổng hợp trong bảng 3.



Hình 5: Hình điện di sản phẩm nPCR cắt bởi SspI (A) và TasI (B). [A] Phản ứng RFLP với SspI từ cột 1 - 3 cho 2 đoạn ADN 388bp và 133/127bp là kiểu gen A/B; cột 4 - 5 SspI không cắt sản phẩm nPCR (521bp) là kiểu gen còn lại từ C - G. (B). Phản ứng RFLP với TasI, cột 1 cho 2 sản phẩm 225 và 168bp tương ứng kiểu gen A; cột 2 - 4 cho 2 sản phẩm 230 và 200bp, phối hợp

với Sspl cột 1 - 3 cho 2 sản phẩm là kiểu gen B còn cột 4 (Sspl, không cắt) là kiểu gen C; cột 5 cho 2 sản phẩm 255 và 151bp là kiểu gen D; M: thang chuẩn ADN 50bp.

*Bảng 3:* So sánh sự phù hợp của phương pháp PCR-RFLP xác định kiểu gen HBV với phương pháp đọc trình tự gen.

Kiểu gen của HBV	PCR-RFLP dùng SSPI và TASI	Giải trình tự gen vùng PreCore
A	0	0
B	15	15
C	11	11
D	2	2
E	0	0
F	0	0
G	0	0
HBV hỗn hợp kiểu gen B/C	Không xác định kiểu gen	2
Tổng số	28	30

Kết quả cho thấy giải trình tự gen trên vùng preCore-HBV, sau đó phân tích loài và so sánh trên Genbank chứng minh kết quả trùng hợp về kiểu gen của 2 phương pháp này. Tuy nhiên, 2 trường hợp không xác định được kiểu gen bằng PCR-RFLP, so sánh trình tự gen trên Genbank và phân tích loài cho kết quả HBV tái tổ hợp kiểu gen B và C (*hình 6*).

Sự phù hợp của kỹ thuật PCR-RFLP so với kỹ thuật giải trình tự gen tính toán theo công thức tính hệ số phù hợp Kappa:

$$K = \frac{OA - EA}{100 - EA} \times 100\%$$

(OA: Observed Agreement: Phù hợp quan sát, EA: Expected Agreement: Phù hợp tính toán)

*Bảng 4:* Sự phù hợp của kỹ thuật PCR-RFLP so với giải trình tự gen.

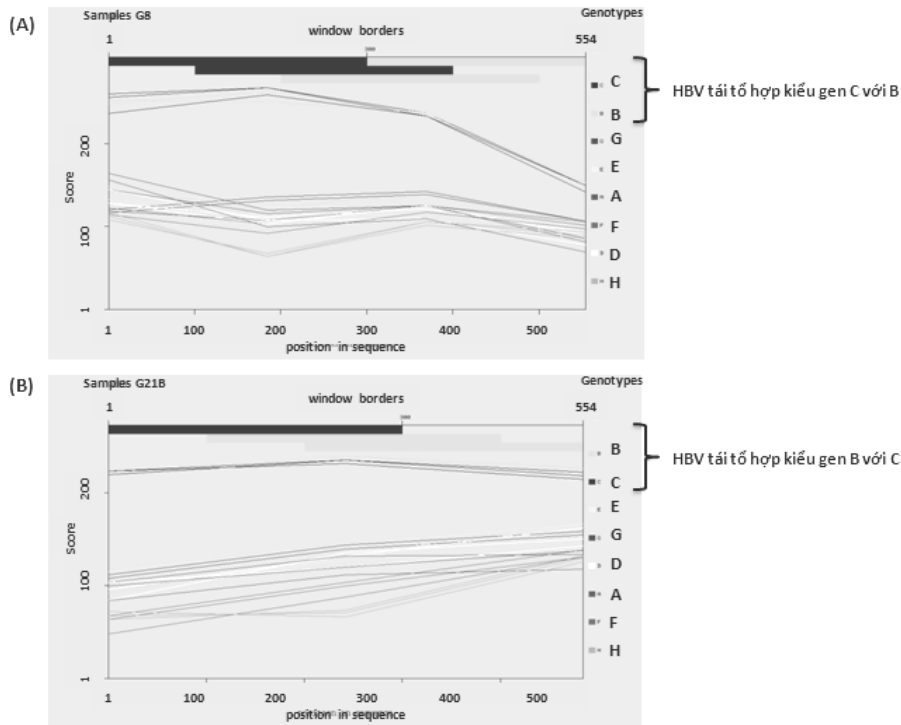
Kỹ thuật		Sequencing		Tổng
		+	-	
PCR-RFLP	+	28	0	28
	-	2	0	2
Tổng		30	0	30

$$K = 28/30 \times 100\% = 93,33\%$$

Phân tích trình tự gen của 30 mẫu HBV cho kết quả gồm 15 mẫu kiểu gen B, 11 mẫu kiểu gen C, 2 mẫu kiểu gen D và 2 mẫu không xác định được bằng kỹ thuật PCR-RFLP. Kết quả giải trình gen trên vùng preCore xác định 15 mẫu kiểu gen B, 11 mẫu kiểu gen C, 2 mẫu kiểu gen D và 2 mẫu mang kiểu gen tái tổ hợp B/C và C/B. Như vậy, sự phù hợp của kỹ thuật PCR-RFLP so với giải trình tự gen là 93,33%.

Để khẳng định thêm độ chính xác của kỹ thuật PCR-RFLP xác định kiểu gen HBV, tiến hành dựng cây phân tích loài trình tự thu được sau khi giải trình tự trên vùng preCore so với 70 trình tự HBV kiểu dại và so sánh trên Genbank bằng công cụ

CLUSTAL\_W và BLAST. Kết quả: 2 mẫu không xác định được kiểu gen bằng phương pháp PCR-RFLP là HBV tái tổ hợp giữa kiểu gen C/B và giữa kiểu gen B/C (hình 6).



Hình 6: Hình so sánh Genbank vùng precore HBV chứng minh hai chủng HBV tái tổ hợp giữa HBV kiểu gen C với B (A) và kiểu gen B với C (B).

## BÀN LUẬN

Độ nhạy và độ đặc hiệu của phản ứng PCR-RFLP xác định kiểu gen của HBV có ý nghĩa quan trọng trong thực hành kỹ thuật. Nghiên cứu này đánh giá độ nhạy và đặc hiệu của kỹ thuật PCR-RFLP xác định kiểu gen của HBV trên các mẫu HBV-plasmid đại diện 4 kiểu gen A, B, C, D và trên 30 mẫu ADN-HBV của BN đã được định lượng nồng độ HBV bằng RT-PCR. Kết quả cho thấy, độ nhạy và đặc hiệu của kỹ thuật 100% (bảng 1 và 2), phù hợp với nghiên cứu của một số tác giả khác như Lindh và CS (1998), Zeng GB và CS (2004) trong xác định kiểu gen của HBV [1, 4]. Trong xác định kiểu gen HBV hiện nay, giải trình tự

gen là phương pháp chuẩn và chính xác nhất. Tuy nhiên, phương pháp này có chi phí khá cao và rất khó xác định được nhiều hơn một kiểu gen trên một BN. Ngược lại, kỹ thuật PCR-RFLP trên cơ sở phân tích tính đa hình của các đoạn giới hạn cho phép xác định kiểu gen và nhiều hơn một kiểu gen của HBV trong mẫu bệnh phẩm [1, 4, 8]. Đây là phương pháp khá đơn giản, dễ thực hiện, cho kết quả chính xác, do đó có thể thực hiện thường quy ở phòng thí nghiệm có trang bị máy PCR thông thường. Để khẳng định sự chính xác và phù hợp của phương pháp PCR-RFLP so với giải trình tự gen, chúng tôi xác định kiểu gen của HBV trên 30 mẫu ADN-HBV. Kết quả cho thấy PCR-RFLP với SspI và TasI đạt

93,33% phù hợp với giải trình tự gen và phân tích loài. Trong khi đó, 2/30 trường hợp không xác định được kiểu gen bằng kỹ thuật PCR-RFLP, khi giải trình tự gen, chứng minh đây là 2 kiểu gen tái tổ hợp B/C, và C/B (hình 6). Điều này có thể giải thích, khi BN nhiễm hơn một kiểu gen, trong quá trình tiến hóa của HBV đã hình thành kiểu gen tái tổ hợp giữa kiểu gen này dẫn đến enzym Sspl và Sspl cắt không đúng vị trí, vì vậy các đoạn giới hạn không điển hình nên không xác định được kiểu gen HBV. Vì vậy, giải trình tự gen và phân tích loài vẫn được coi là phương pháp chuẩn xác định kiểu gen HBV. Đối với ngưỡng phát hiện kiểu gen của kỹ thuật PCR-RFLP được xác định lần lượt trên ADN-HBV plasmid và ADN-HBV BN đã biết nồng độ HBV. Kết quả cho thấy với ADN-HBV plasmid ngưỡng phát hiện là 10 copy. Các mẫu ADN-HBV plasmid có độ tinh sạch cao và thuần hơn so với mẫu BN, do vậy ngưỡng phát hiện thường rất thấp so với thực hiện trên mẫu BN có từ  $2,0 \times 10^2 - 10^5$  copy/ml [3].

### KẾT LUẬN

Độ nhạy và đặc hiệu của kỹ thuật PCR-RFLP với 2 enzym giới hạn Sspl và TasI thực hiện trên vùng preCore-HBV xác định kiểu gen HBV là 100%. Độ phù hợp của PCR-RFLP so với giải trình tự gen đạt 93,33% và ngưỡng phát hiện là 10 copy/plasmid tái tổ hợp.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Alestig E, Hannoun C, Horal P, Lindh M. Phylogenetic origin of hepatitis B virus strains with precore C-1858 variant. *Journal Clinical Microbiology*. 2001, 39, pp.3200-3203.

2. Carla Osioy, Elizabeth Giles. Evaluation of the INNO-LiPA HBV Genotyping assay for determination of hepatitis B virus genotype. *J Clinical Microbiology*. 2003, 41, pp.5473-5477.

3. Chena J, Jianhua Yin, Xiaojie Tan, Haiqin Zhang, Hongwei Zhang, Beichuan Chen, Wenjun Chang, Stephan Schaefer, Guangwen Cao. Improved multiplex-PCR to identify hepatitis B virus genotypes A-F and subgenotypes B1, B2, C1 and C2. *Journal of Clinical Virology*. 2007, 38, pp.238-243.

4. Hannoun C, Krogsgaard K, Horal P, Lindh M. Interpret trial group. Genotype mixtures of hepatitis B virus in patients treated with interferon. *Journal Infectious Diseases*. 2002, 186, pp.752-759.

5. Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat*. 2004, 11, pp.97-107.

6. Liu SF, Hsieh MH, Hou NJ, Hsieh MY, Huang JF, Dai CY, Yu ML, Chuang WL. Hepatitis B virus genotyping by enzyme-linked immunosorbent assay in Taiwan. *Hepato Int*. 2010, Aug 3, 4 (3), pp.601-607.

7. Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes, *Journal General Virology*. 1988, 69, pp.2575-2583.

8. 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), pp.1375-84.

9. Tran TT, Trinh TN, Abe K. New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam. *Journal Virology*. 2008, Jun, 82 (11), pp.5657-5663.

10. Zhang R, Y. Deng, C. Muller, Z. Ou, L. Ma, M. Wang, P. Li, Y. He. Determination of



hepatitis B virus genotype by flow-through reverse dot blot, Journal of Clinical Virology. 2007, 39, pp.94-100.