

ỨNG DỤNG GIẢI TRÌNH TỰ GEN TRONG XÁC ĐỊNH KIỂU GEN ĐỘT BIẾN KHÁNG THUỐC ĐIỀU TRỊ VIÊM GAN VI RÚT B MẠN

Đỗ Hoàng Long^{1*}, Nguyễn Thành Vũ², Lê Công Hành¹, Trần Đỗ Hùng¹,
Trịnh Thị Hồng Cúa¹, Đinh Thị Hương Trúc¹, Lê Chí Dũng¹

1. Trường Đại học Y Dược Cần Thơ

2. Trung tâm Y tế huyện Cái Bè

*Email: dhlong@ctump.edu.vn

Ngày nhận bài: 26/12/2023

Ngày phản biện: 09/03/2024

Ngày duyệt đăng: 25/03/2024

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Dưới áp lực chọn lọc của thuốc kháng vi rút viêm gan B trong thời gian điều trị viêm gan vi rút B mạn, các dòng vi rút có đột biến kháng thuốc sẽ xuất hiện và lan rộng gây nên tình trạng kháng thuốc và thất bại điều trị. Giải trình tự gen là kỹ thuật sinh học phân tử giúp xác định kiểu gen đột biến kháng thuốc này. **Mục tiêu nghiên cứu:** Xác định kiểu gen đột biến kháng thuốc điều trị viêm gan vi rút B mạn. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Phương pháp chọn mẫu thuận tiện, 71 bệnh nhân viêm gan vi rút B mạn đang điều trị bằng thuốc kháng vi rút viêm gan B như lamivudine, adefovir, entecavir và tenofovir có HBsAg dương tính trên 6 tháng được chọn vào trong nghiên cứu mô tả cắt ngang. **Kết quả:** Hai kiểu gen B và C đã được xác định trên bệnh nhân viêm gan vi rút B mạn đang điều trị thuốc kháng vi rút viêm gan B với tỷ lệ theo thứ tự lần lượt là 73,2% và 26,8%. Tỷ lệ đột biến kháng thuốc của vi rút viêm gan B trên bệnh nhân viêm gan vi rút B mạn là 7%. Có 2 đột biến kháng lamivudine (V207M) và 1 đột biến kháng adefovir (Q215H) được phát hiện thuộc kiểu gen B. Trong kiểu gen C, phát hiện được 1 đột biến kháng adefovir (Q215H) và 1 đột biến kháng entecavir (S202I). Cả 2 kiểu gen B và C không phát hiện đột biến kháng tenofovir. **Kết luận:** Có 7% đột biến kháng thuốc của vi rút viêm gan B trên bệnh nhân viêm gan vi rút B mạn. Kiểu gen B có 2 đột biến kháng lamivudine (V207M) và 1 đột biến kháng adefovir (Q215H), còn kiểu gen C có 1 đột biến kháng adefovir (Q215H) và 1 đột biến kháng entecavir (S202I).

Từ khóa: Kiểu gen, đột biến kháng thuốc, vi rút viêm gan B.

ABSTRACT

APPLICATION OF GENE SEQUENCE IN DETERMINING DRUG RESISTANCE MUTANT GENOTYPES IN THE TREATMENT OF CHRONIC VIRAL HEPATITIS B

Do Hoang Long^{1*}, Nguyen Thanh Vu², Le Cong Hanh¹, Tran Do Hung¹,
Trinh Thi Hong Cua¹, Dinh Thi Huong Truc¹, Le Chi Dung¹

1. Can Tho University of Medicine and Pharmacy

2. Cai Be District Medical Center

Background: Under the selective pressure of hepatitis B antiviral drugs during the treatment of chronic hepatitis B, virus strains with drug-resistant mutations will appear and spread, causing drug resistance and treatment failure. Sequencing is a molecular biology technique that helps determine the genotype of this drug resistance mutation. **Objectives:** To determine drug-resistant mutant genotypes for chronic hepatitis B virus treatment. **Materials and method:** Using the convenience sampling method, 71 chronic hepatitis B patients being treated with hepatitis B antiviral drugs such as lamivudine, adefovir, entecavir and tenofovir with positive HBsAg for over 6 months were selected for cross-sectional descriptive study performed at Can Tho University of Medicine and

*Pharmacy Hospital during the period from July 2022 to June 2023. Blood samples from patients with chronic hepatitis B virus that meet the standards are taken, then real-time PCR technique is carried out first and then sequencing technique later. **Results:** Two genotypes B and C have been identified in patients with chronic hepatitis B virus receiving antiviral treatment for hepatitis B with rates of 73.2% and 26.8%, respectively. The rate of drug resistance mutations of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B virus was 7%. There were 2 lamivudine resistance mutations (V207M) and 1 adefovir resistance mutation (Q215H) detected in genotype B. In genotype C, 1 adefovir resistance mutation (Q215H) and 1 entecavir resistance mutation (S202I) were detected. Both genotypes B and C did not detect tenofovir resistance mutations. **Conclusion:** There are 7% drug resistance mutations of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B virus. Genotype B has 2 lamivudine resistance mutations (V207M) and 1 adefovir resistance mutation (Q215H), while genotype C has 1 adefovir resistance mutation (Q215H) and 1 entecavir resistance mutation (S202I).*

Keywords: Genotype, drug resistance mutations, Hepatitis B virus.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Viêm gan B mạn tính là một trong những thủ phạm dẫn đến suy gan, xơ gan và ung thư biểu mô tế bào gan. Ước tính có khoảng 240 triệu người nhiễm vi rút viêm gan B (HBV - hepatitis B virus) trong đó Việt Nam cũng là một trong những nước có tỷ lệ nhiễm HBV cao khoảng 10 - 20% [1], [2], [3]. HBV mang cấu trúc gen di truyền dị thể, có 8 genotype từ genotype A đến genotype H và 4 subtype (adw, adr, ayw và ayr) và với cấu trúc gen này chứa đựng một nguy cơ tiềm tàng rất lớn về khả năng xảy ra đột biến kháng thuốc kháng HBV. Một số thuốc điều trị HBV sử dụng khá phổ biến hiện nay như lamivudine, adefovir, tenofovir và entecavir. Suốt thời gian điều trị với thuốc kháng HBV, do ảnh hưởng bởi áp lực chọn lọc của thuốc và nguy cơ kháng thuốc cao đã làm xuất hiện các dòng HBV có đột biến kháng thuốc dẫn đến thất bại điều trị và sự đột biến này hình thành là do đặc tính sao chép nhanh của vi rút và bộ gen của vi rút thiếu cơ chế kiểm soát tính đột biến trong quá trình sao chép [1]. Giải trình tự gen là kỹ thuật sinh học phân tử giúp xác định kiểu gen đột biến kháng thuốc này. Vì vậy, việc xác định kiểu gen kháng một số thuốc điều trị HBV phổ biến hiện nay rất có giá trị trong điều trị và kiểm soát viêm gan B mạn ở Việt Nam. Đó là lý do nghiên cứu này: “Ứng dụng giải trình tự gen trong xác định kiểu gen đột biến kháng thuốc điều trị viêm gan vi rút B mạn” được thực hiện với mục tiêu: Xác định kiểu gen đột biến kháng thuốc điều trị viêm gan vi rút B mạn.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Bệnh nhân viêm gan vi rút B mạn khám và điều trị tại Phòng khám Gan của Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Cần Thơ từ tháng 7/2022 - 6/2023.

- Tiêu chuẩn chọn mẫu:

+ HBsAg dương tính hơn 6 tháng.

+ HBV-DNA dương tính.

+ Đang điều trị thuốc lamivudine, adefovir, tenofovir hoặc entecavir.

- Tiêu chuẩn loại trừ: Đồng nhiễm với HCV, HIV; suy giảm miễn dịch.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu mô tả cắt ngang.

- Cỡ mẫu: 71 bệnh nhân viêm gan vi rút B mạn được chọn theo phương pháp chọn mẫu thuận tiện.

- Nội dung nghiên cứu:

+ Mô tả đặc điểm chung của bệnh nhân viêm gan vi rút B mạn đang điều trị thuốc lamivudine, adefovir, tenofovir hoặc entecavir về giới tính, tuổi, thời gian nhiễm, chỉ số AST, ALT, HbeAg và HBV-DNA.

+ Xác định kiểu gen đột biến kháng thuốc lamivudine, adefovir, tenofovir hoặc entecavir đang điều trị viêm gan vi rút B mạn bằng kỹ thuật giải trình tự gen tại Công ty Nam Khoa thành phố Hồ Chí Minh.

+ Phương pháp thu thập số liệu:

Phòng vấn trực tiếp bệnh nhân đến khám và điều trị ở Phòng khám Gan của Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Cần Thơ đã được các bác sĩ khám và chọn bệnh. Nội dung phỏng vấn dựa theo Bảng thu thập số liệu nghiên cứu nhằm thu thập các thông tin về các đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu.

Lấy bệnh phẩm, bảo quản bệnh phẩm và gửi bệnh phẩm đến phòng xét nghiệm. Bộ dụng cụ lấy máu tĩnh mạch bao gồm bút lông, bơm kim tiêm, dây garo, côn sát khuẩn, gòn vô khuẩn, ống nghiệm serum, ống nghiệm EDTA, ống eppendorf vô khuẩn và băng cá nhân. Mỗi bệnh nhân được lấy 5ml máu tĩnh mạch, sau đó quay ly tâm và rút huyết tương. Huyết tương được cho vào 3 ống eppendorf, mỗi ống khoảng 300 μ l, một ống dùng cho xét nghiệm HbeAg và enzyme gan AST, ALT; một ống dùng cho xét nghiệm định lượng HBV-DNA và một ống dùng cho giải trình tự gen. Hai ống huyết tương định lượng HBV-DNA và giải trình tự gen được bảo quản ở -30⁰C cho tới khi tiến hành xét nghiệm.

Xét nghiệm đo hoạt độ enzyme AST, ALT và xét nghiệm định tính HBeAg được thực hiện trên máy sinh hóa miễn dịch tự động Architect Ci4100 của hãng Abbott (Mỹ) tại phòng xét nghiệm Sinh hóa miễn dịch của Khoa Xét nghiệm Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Cần Thơ.

Tiến hành tách chiết DNA, xét nghiệm HBV-DNA bằng real-time PCR và giải trình tự gen:

Mẫu huyết tương bệnh nhân được chuyển từ Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Cần Thơ đến Công ty Nam Khoa tại Thành phố Hồ Chí Minh theo đúng quy cách về bảo quản và về thời gian quy định. Cụ thể, mẫu huyết tương từ tủ -20⁰C được lấy ra, để mẫu vào túi đựng mẫu, sau đó mẫu sẽ được cho vào thùng đá và được vận chuyển bằng xe đến Công ty Nam Khoa trong vòng 5 giờ để thực hiện các kỹ thuật như real-time PCR, tách chiết DNA và giải trình tự gen.

DNA được tách chiết bằng máy ly trích tự động KingFisher Flex của hãng Thermo Fisher Scientific (Singapore). DNA thu được có thể sử dụng ngay, nếu chưa sử dụng sẽ được bảo quản ở -20⁰C.

Định lượng HBV-DNA bằng kỹ thuật real-time PCR được thực hiện trên máy real-time PCR CFX 96 Touch Detection System (Biorad, Mỹ).

Giải trình tự gen phát hiện đột biến kháng thuốc điều trị viêm gan vi rút B mạn như lamivudine, adefovir, tenofovir hoặc entecavir được thực hiện trên máy giải trình tự ABI 3130 XL của hãng Applied Biosystems (Mỹ).

- Phương pháp xử lý số liệu: Số liệu được xử lý và phân tích bằng phần mềm SPSS 20.0.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu

Bảng 1. Đặc điểm chung của bệnh nhân viêm gan B mạn

	Đặc điểm chung	Tần số (n)	Tỷ lệ (%)
Giới tính	Nam	38	53,5
	Nữ	33	46,5
Tuổi	≤12	3	4,2
	13 – 35	29	40,8
	36 - 59	27	38
	≥60	12	17
Thời gian nhiễm	<1 năm	10	14
	1 - <5 năm	18	25,4
	5 – 10 năm	25	35,2
	>10 năm	18	25,4
AST	Giá trị bình thường (GTBT)	45	63,4
	Tăng ≤2 lần GTBT	18	25,4
	Tăng >2 lần GTBT	8	11,2
ALT	Giá trị bình thường (GTBT)	41	57,7
	Tăng ≤2 lần GTBT	17	23,9
	Tăng >2 lần GTBT	13	18,4
HBeAg	HBeAg (+)	39	54,9
	HBeAg (-)	32	45,1
HBV-DNA	<2000 IU/mL	3	4,2
	2000 - 20000 IU/mL	12	16,9
	>20000 IU/mL	56	78,9

Nhận xét: Về giới tính và tuổi, nam chiếm 53,5% cao hơn nữ và nhóm tuổi 13 – 35 tuổi chiếm tỷ lệ cao nhất 40,8%. Bệnh nhân có thời gian nhiễm từ 5 – 10 năm chiếm tỷ lệ cao nhất 35,2%. Chỉ số AST và ALT của đa số bệnh nhân ở mức bình thường, riêng AST và ALT tăng ≤2 lần giá trị bình thường có tỷ lệ lần lượt là 25,4% và 23,9% cao hơn AST và ALT tăng >2 lần giá trị bình thường. Bệnh nhân có HBeAg (+) chiếm 54,9% cao hơn HBeAg (-) và có HBV-DNA >20000 IU/mL chiếm đa số với tỷ lệ 78,9%.

3.2. Kiểu gen đột biến kháng thuốc lamivudine, adefovir, tenofovir hoặc entecavir

Bảng 2. Tỷ lệ đột biến kháng thuốc của vi rút viêm gan B

	Đột biến kháng thuốc	Tần số (n)	Tỷ lệ (%)
Có đột biến		5	7,0
Không có đột biến		66	93,0

Nhận xét: Tỷ lệ đột biến kháng thuốc của vi rút viêm gan B trên bệnh nhân viêm gan B mạn là 7% (có 5/71 mẫu nghiên cứu phát hiện được đột biến kháng thuốc).

Bảng 3. Tỷ lệ kiểu gen của vi rút viêm gan B có đột biến kháng thuốc trong nghiên cứu

	Kiểu gen	Tần số (n)	Tỷ lệ (%)
Genotype B		52	73,2
Genotype C		19	26,8

Nhận xét: Thu được 2 kiểu gen của vi rút viêm gan B trên bệnh nhân viêm gan B mạn có đột biến kháng thuốc là genotype B chiếm tỷ lệ 73,2% và genotype C có tỷ lệ 26,8%.

Bảng 4. Phân bố loại đột biến kháng thuốc lamivudine, adefovir hoặc entecavir trong genotype B và genotype C

Kiểu gen	Tần số (n)	Loại đột biến
Genotype B	3	V207M, V207M, Q215H
Genotype C	2	Q215H, S202I

Nhận xét: Có 2 loại đột biến kháng lamivudine (V207M) và 1 loại đột biến kháng adefovir (Q215H) được phát hiện thuộc genotype B. Trong genotype C, phát hiện được 1 loại đột biến kháng adefovir (Q215H) và 1 loại đột biến kháng entecavir (S202I). Cả 2 genotype B và genotype C không phát hiện đột biến kháng tenofovir.

Bảng 5. Các loại đột biến kháng thuốc lamivudine, adefovir, tenofovir hoặc entecavir của vi rút viêm gan B trên bệnh nhân viêm gan B mạn thu được

Đột biến kháng thuốc	Tần số (n)	Loại đột biến
Lamivudine	2	V207M, V207M
Adefovir	2	Q215H, Q215H
Entecavir	1	S202I

Nhận xét: Đặc điểm loại đột biến kháng thuốc của HBV thu được trong nghiên cứu bao gồm 2 bệnh nhân đột biến kháng lamivudine có biểu hiện loại đột biến V207M, 2 bệnh nhân đột biến kháng adefovir có biểu hiện loại đột biến Q215H, 1 bệnh nhân đột biến kháng entecavir có biểu hiện loại đột biến S202I và không phát hiện đột biến kháng tenofovir trên bệnh nhân nghiên cứu.

IV. BÀN LUẬN

4.1. Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu

Về đặc điểm chung của 71 đối tượng nghiên cứu, nam chiếm 53,5% cao hơn nữ và nhóm tuổi 13 – 35 tuổi chiếm tỷ lệ cao nhất 40,8%. Thời gian nhiễm từ 5 – 10 năm chiếm tỷ lệ cao nhất 35,2%. Chỉ số AST và ALT của đa số bệnh nhân ở mức bình thường, riêng AST và ALT tăng ≤ 2 lần giá trị bình thường có tỷ lệ lần lượt là 25,4% và 23,9% cao hơn AST và ALT tăng >2 lần giá trị bình thường. HBeAg (+) chiếm 54,9% cao hơn HBeAg (-) và có HBV-DNA >20000 IU/mL chiếm đa số với tỷ lệ 78,9%. Nguyễn Kim Thư (2023) nghiên cứu 24 mẫu máu của bệnh nhân viêm gan vi rút B thất bại điều trị cũng thu được nam giới (62,5%) nhiều hơn nữ giới [1], tương tự như vậy nam giới cũng nhiều hơn nữ giới chiếm 62,9% trong nghiên cứu của Trịnh Thị Hằng (2019) [4] và 51,9% trong nghiên cứu của Bùi Thị Tôn Thất (2017) [3]. Nhóm tuổi trong nghiên cứu của chúng tôi khá tương đồng với Trịnh Thị Hằng với nhóm tuổi 30 - 39 tuổi chiếm cao nhất 37,5%. Về HBeAg (+) và HBV-DNA >20000 IU/mL, nghiên cứu của chúng tôi khá tương đồng với Nguyễn Kim Thư có dấu ấn HBeAg (+) là 75%, HBV-DNA >20000 IU/mL chiếm 75% và Trịnh Thị Hằng tỷ lệ HBeAg (+) là 75%, HBV-DNA >20000 IU/mL chiếm 45,8%. Như vậy, giới tính và độ tuổi là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến diễn tiến của bệnh lý gan. Khi tế bào gan bị tổn thương cấp sẽ gây tăng hoạt độ AST, ALT và khi điều trị thuốc kháng vi rút viêm gan B thì giá trị enzyme gan nằm trong giới hạn bình thường chiếm tỷ lệ cao hơn. Đồng thời, khi có sự nhân lên của HBV thì các chỉ số HBeAg và HBV-DNA trở thành hai chỉ điểm khá quan trọng [5].

4.2. Kiểu gen đột biến kháng thuốc của vi rút viêm gan B

Mười kiểu gen (từ A đến J) của vi rút viêm gan B đã được xác định trên toàn thế giới. Hai kiểu gen trong 10 kiểu gen của vi rút viêm gan B trên bệnh nhân viêm gan B mạn có đột biến kháng thuốc trong nghiên cứu của chúng tôi xác định được là genotype B chiếm tỷ lệ 73,2% và genotype C có tỷ lệ 26,8%. Đây là 2 kiểu gen khá phổ biến ở Châu Á, đặc biệt là ở Việt Nam. Đã có một số nghiên cứu đã chỉ ra có sự liên quan của genotype B và genotype C với các đột biến kháng thuốc của vi rút viêm gan B như nghiên cứu của Hiệp hội nghiên cứu gan Châu Âu và tác giả Zhang X. cùng cộng sự. Các tác giả đều xác nhận genotype B chiếm ưu thế hơn genotype C, kể cả tác giả Trịnh Thị Hằng [2], [4], [6].

Tỷ lệ đột biến kháng thuốc của vi rút viêm gan B trên bệnh nhân viêm gan B mạn mà nghiên cứu của chúng tôi thu được bằng 7%. Tỷ lệ này thấp hơn kết quả nghiên cứu của Trịnh Thị Hằng và Guo X. cùng cộng sự có tỷ lệ đột biến kháng thuốc lần lượt là 24,3% và 35,9% [4], [7]. Thời gian nhiễm càng dài, điều trị càng kéo dài tạo thuận lợi cho nguy cơ đột biến rất cao, cụ thể nghiên cứu của chúng tôi thu được bệnh nhân viêm gan vi rút B mạn có điều trị thuốc kháng vi rút viêm gan B từ 5 – 10 năm chiếm tỷ lệ cao nhất 35,2%. Khá đồng thuận với kết quả nghiên cứu của chúng tôi, Hiệp hội nghiên cứu gan Châu Âu cũng ghi nhận tỷ lệ đột biến với các thuốc tăng lên theo thời gian [2]. Mặc dù thuốc kháng vi rút viêm gan B có vai trò ức chế trực tiếp chức năng của DNA polymerase của vi rút viêm gan B bằng cách cạnh tranh với enzyme hoặc chấm dứt sự nhân lên của vi rút, gây ức chế sản xuất gen của vi rút, tuy nhiên hiệu quả điều trị lại còn chịu ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố khác như tác dụng phụ, việc tuân thủ kém và tiếp xúc với thuốc không đầy đủ [8]. Về đặc điểm loại đột biến kháng thuốc của vi rút viêm gan B, chúng tôi thu được 2 bệnh nhân đột biến kháng lamivudine có biểu hiện loại đột biến V207M, 2 bệnh nhân đột biến kháng adefovir có biểu hiện loại đột biến Q215H, 1 bệnh nhân đột biến kháng entecavir có biểu hiện loại đột biến S202I và không phát hiện đột biến kháng tenofovir trên bệnh nhân nghiên cứu. Cùng nhận định với chúng tôi, nghiên cứu của Alacam S. và cộng sự (2019) cũng thu được tỷ lệ kháng lamivudine cao nhất, đứng thứ hai là entecavir sau đó đến adefovir [9]. Lamivudine, adefovir, tenofovir và entecavir là các loại thuốc được sử dụng khá phổ biến trong điều trị bệnh viêm gan B do vi rút viêm gan B. Vì vậy, việc xác định đột biến kháng thuốc lamivudine, adefovir, tenofovir hoặc entecavir của vi rút viêm gan B trên bệnh nhân viêm gan B mạn trong quá trình điều trị có biểu hiện kháng thuốc là việc làm rất cần thiết để bác sĩ quyết định thay thuốc mới hoặc sử dụng kết hợp thuốc một cách hợp lý nhằm giúp cho việc điều trị đạt hiệu quả cao nhất.

V. KẾT LUẬN

Tỷ lệ đột biến kháng thuốc của HBV trên bệnh nhân viêm gan B mạn là 7% (5/71) với một số đặc điểm loại đột biến kháng thuốc của HBV như sau: 2 bệnh nhân đột biến kháng lamivudine có biểu hiện loại đột biến V207M, 2 bệnh nhân đột biến kháng adefovir có biểu hiện loại đột biến Q215H, 1 bệnh nhân đột biến kháng entecavir có biểu hiện loại đột biến S202I và không phát hiện đột biến kháng tenofovir trên bệnh nhân nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Thu Kim Nguyen, Duyet Van Le. Resistant mutations within the hepatitis B virus reverse transcriptase sequence in treatment failure patients with chronic HBV infection in Vietnam. *Journal of Global Antimicrobial Resistances*. 2023. 33, 35-41, doi: 10.1016/j.jgar.2023.02.013.

2. European Association for the Study of the Liver. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology*. 2017. 67(2), 370-398, doi: 10.1016/j.jhep.2017.03.021.
 3. Thi Ton That Bui, Tan Thanh Tran, My Ngoc Nghiem, Pierre Rahman, Thi Thanh Thanh Chan, et al. Molecular characterization of hepatitis B virus in Vietnam. *BMC Infectious Diseases*. 2017. 17(1), 601-609, doi: 10.1186/s12879-017-2697-x.
 4. Trịnh Thị Hằng. Xác định đột biến kháng thuốc liên quan đến đột biến ở bệnh nhân viêm gan B mạn tại Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới Trung ương từ tháng 1 năm 2014 đến tháng 12 năm 2017. Đại học Y Hà Nội. 2019.
 5. Lu L. Antiviral therapy of liver cirrhosis related to hepatitis B virus infection. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*. 2014. 2, 197-201, doi: 10.14218/JCTH.2014.00022.
 6. Zhang X., Chen X., Wei M., Zhang C., Xu T., et al. Potential resistant mutations within HBV reverse transcriptase sequences in nucleos(t)ide analogues-experienced patients with hepatitis B virus infection. *Scientific Reports*. 2019. 9(1), 8078-8086, doi: 10.1038/s41598-019-44604-6.
 7. Guo X., Wu J., Wei F., Ouyang Y., Li Q., et al. Trends in hepatitis B virus resistance to nucleoside/nucleotide analogues in North China from 2009-2016: A retrospective study. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2018. 52(2), 201-209, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2018.04.002.
 8. Lai M., Lian J., Zhang W., Xu J., Zhou L., et al. Compare with safety and efficacy of entecavir and adefovir dipivoxil combination therapy and tenofovir disoproxil fumarate monotherapy for chronic hepatitis B patient with adefovir-resistant. *Mathematical Biosciences and Engineering*. 2019. 17(1), 627-635, doi: 10.3934/mbe.2020032.
 9. Alacam S., Karabulut N., Yolcu A., Onel M., Atasoy A., et al. Evaluation of drug resistance mutations in patients with chronic hepatitis B. *Folia Microbiology (Praha)*. 2019. 64(2), 237-243, doi: 10.1007/s12223-018-0650-z.
-