

## NGHIÊN CỨU TÌNH TRẠNG KHÁNG THUỐC TỰ NHIÊN CỦA VIRUS VIÊM GAN B TẠI HẢI PHÒNG

PHẠM VĂN THỨC, VŨ THỊ TƯỜNG VÂN, NGUYỄN HÙNG CƯỜNG

### TÓM TẮT

Mục đích: 1. Nghiên cứu tỷ lệ kháng thuốc tự nhiên của HBV tại Hải Phòng. Đối tượng và phương pháp: nghiên cứu được tiến hành 113 chủng HBV của thuyền viên lao động trên biển, người cho máu, phụ nữ có thai, nhóm tiêm chích ma túy và gái mại dâm chưa được điều trị thuốc kháng virus. Tách ADN của HBV từ các mẫu máu nhiễm HBV và làm phản ứng PCR để tổng hợp đoạn gen Pol- RT. Giải trình tự đoạn gen Pol- RT. Xử lý các kết quả giải trình tự gen, phân tích đột biến kháng thuốc của HBV liên quan đến nhóm thuốc nucleosid analogues. Số liệu được xử lý bằng các phần mềm chuyên dụng GENETYX, BIOEDIT. Kết quả và kết luận: chủng HBV lưu hành ở Hải Phòng phổ biến là kiểu gen B 80,5% (B4 là 79,6% là B2 là 0,9%); tiếp theo là kiểu gen C (C1) 17,7% và kiểu gen I (I1) 1,8%. Tỷ lệ đột biến tự nhiên liên quan kháng thuốc lamivudine trong 113 chủng HBV được giải trình tự gen là 2,66% (3/113), kiểu gen B là 1,77% và kiểu gen C là 0,85%. 2 chủng có đột biến kiểu YMDD tại vị trí aa 204 của vùng Pol-RT (M204V hoặc M204I), bộ tứ aa là YMDD thành YIDD và YVDD. 1 chủng đột biến tại vị trí aa 180 của vùng Pol-RT (L180M). Tỷ lệ đột biến tự nhiên liên quan kháng thuốc adefovir trong 113 chủng HBV nghiên cứu là 0,85%. Đột biến tại vị trí aa 181 của vùng Pol-RT (A181T). Tỷ lệ đột biến tự nhiên liên quan kháng thuốc entecavir trong 113 chủng HBV nghiên cứu là 0,85%. Đột biến kiểu YMDD tại vị trí aa 204 của vùng gen Pol-RT ((M204V), bộ tứ aa là YMDD thành YVDD). Xuất hiện 2 đột biến kháng đa thuốc dòng nucleoside analogue. 1 chủng virus xuất hiện đột biến M204I (YMDD chuyển thành YIDD), chủng virus này kháng cả lamivudine, telbivudine và telnfovir. 1 chủng virus xuất hiện đột biến M204V (YMDD chuyển thành YVDD). Như vậy chủng virus này sẽ kháng đồng thời cả lamivudine và entecavir.

**Từ khóa:** kháng thuốc tự nhiên.

### SUMMARY

Objective: Research on innate resistance rate of HBV at Hai Phong. Subjects and methods: 113 patients with HBV includes: sea worker, blood donor, pregnant women, IDUs and sex worker who have not been treated with antiviral drug. HBV DNA from blood were extracted and run PCR on Pol-RT gene. PCR products were sequenced and analyze to detect HBV nucleosid analogues drug resistance mutation by GENETYX, BIOEDIT software.

C. Results and conclusion: The results show that HBV genotype B is dominant with 80.5% (B4 is 79.6% is B2 is 0.9%); genotype C (C1) is 17.7% and genotype I (I1) is 1.8%. Innate resistance rate related to lamivudine resistance in 113 patients is 2.66% (3/113), genotype B is 1.77% and genotype C is 0.85%. Two strains have YMDD mutation at aa 204 of Pol-RT region (M204V or M204I), YMDD is mutated to YIDD and YVDD. One strain is mutated at aa 180 of Pol-RT region (L180M). Innate resistance rate related to adefovir in 113 patients is 0.85%. Mutation at aa 181 of Pol-RT region (A181T). Innate resistance rate related to entecavir in 113 patients is 0.85%. There is YMDD mutation at aa 204 of Pol-RT region ((M204V), YMDD is mutated to YVDD. There are two multi-nucleoside analogue-resistant strains. One strain has M204I mutation (YMDD to YIDD), this strain is resistant to lamivudine, telbivudine and telnfovir. Another strain has M204V mutation (YMDD to YVDD). This strain is resistant to both lamivudine and entecavir.

**Keywords:** innate resistance.

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Viêm gan virus B là vấn đề sức khỏe được quan tâm trên toàn thế giới. Khoảng 5% dân số thế giới bị nhiễm virus viêm gan B (HBV) tương đương với 350

triệu người. Thuốc điều trị HBV hiện nay gồm: Interferon alfa, Peginterferon alfa, các nucleoside: Lamivudine, adefovir dipivoxil, entecavir... Trong đó các chế phẩm của interferon có giá thành rất cao và đa số bệnh nhân không có cơ hội sử dụng. Các thuốc thuộc nhóm Nucleosid analogues gồm: Lamivudine, adefovir dipivoxil, entecavir... hiện đang được sử dụng chủ yếu và rất có hiệu quả trong điều trị HBV, tuy nhiên khi kéo dài thời gian điều trị dễ làm virus xuất hiện đột biến kháng thuốc [1,2,4,5,6]. Theo nghiên cứu của Kumar M.. [3] thì tỉ lệ HBV kháng lamivudine tăng dần theo thời gian điều trị lần lượt là: 14% trong thời gian điều trị 1 năm, 2 năm là 38%, 3 năm là 49%, 4 năm sẽ tăng lên 66% và sau 5 năm tỉ lệ này sẽ tăng lên đến 69%. Sự đề kháng Adefovir sau 2 năm là 3%, 3 năm là 6%. Kháng entecavir xảy ra sau khi dùng thuốc 80 tuần.

Theo kết quả nghiên cứu của chúng tôi tháng 9/2008 trên 1077 đối tượng ở Hải Phòng thì tỷ lệ nhiễm HBV là: 12,2%. Đa số nhiễm HBV là mạn tính, trong số này có một số khá lớn là tình trạng viêm gan B mạn tính và có nhu cầu điều trị bệnh. Tuy nhiên vấn đề lựa chọn phác đồ điều trị hợp lý và có cơ sở để đảm bảo hiệu quả của quá trình điều trị lại gặp rất nhiều khó khăn do các thông tin về kháng thuốc của HBV tại Việt Nam được công bố không nhiều. Nhiều bác sỹ lựa chọn thuốc theo nhu cầu, điều kiện kinh tế của bệnh nhân hay thói quen kê thuốc của mình mà chưa dựa trên các thông tin về kháng thuốc của HBV vì vậy hiệu quả điều trị còn thấp và làm cho nguy cơ kháng thuốc của HBV ngày càng cao.

Hiện tại chưa có một tác giả nào nghiên cứu về tỷ lệ kháng thuốc tự nhiên của HBV ở Hải Phòng để đưa ra các khuyến cáo giúp các bác sỹ lựa chọn được thuốc điều trị hợp lý cũng như việc tiên lượng hiệu quả điều trị của thuốc. Đây chính là mục tiêu nghiên cứu của chúng tôi. Đề tài có 2 mục tiêu: Nghiên cứu tỷ lệ kháng thuốc tự nhiên của HBV tại Hải Phòng.

## ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 1. Đối tượng.

113 chủng HBV của các đối tượng nghiên cứu thuộc 5 nhóm: Thuyền viên lao động trên biển, người cho máu, phụ nữ mang, tiêm chích ma túy, gái mại dâm. Các mẫu máu này được thu thập theo chương trình nghiên cứu đặc điểm di truyền của các virus lây truyền qua đường máu tại Hải Phòng từ 2007 đến 2010. Tất cả 113 đối tượng nhiễm HBV đều chưa dùng thuốc điều trị đặc hiệu virus viêm gan B.

### 2. Phương pháp nghiên cứu.

Tách ADN của HBV từ các mẫu máu nhiễm HBV và làm phản ứng PCR để tổng hợp đoạn gen *PoI- RT*.

- Các cặp primers được sử dụng gồm:

Cặp Primer: HB1F:(18-39)/HB1R(534-557)

HB1F: AAGCTCTGCTAGATCCCAGAGT

HB1R: GAAACATAGAGGTGCCCTTGAGCAG

Cặp Primer: HB2F(414-433)/HB2R(970-989)

HB2F: TGCTGCTATGCCTCATCTTC

HB2R: CATACTTTCCAATCAATAGG

- Giải trình tự đoạn gen *PoI- RT*. Xử lý các kết quả giải trình tự gen, phân tích đột biến kháng thuốc của HBV liên quan đến nhóm thuốc nucleosid analogues.

### 3. Phân tích số liệu.

Số liệu được xử lý bằng các phần mềm chuyên dụng GENETYX, BIOEDIT.

### 4. Địa điểm nghiên cứu.

Labo trung tâm, Bệnh viện Đại học Y Hải Phòng

## KẾT QUẢ

### 1. Phân bố kiểu gen của HBV dựa trên vùng gen

#### Pre-S1

Bảng 1: phân bố kiểu gen của HBV dựa trên vùng gen Pre-S1

Nhóm	Tiêm chích	Gái mại dâm	Thuyền viên	Phụ nữ mang thai	Cho máu	Tổng	
n	25	23	20	23	22	113	
Kiểu gen B4	n	19	18	17	19	17	90
	%	76,0	78,3	85,0	82,6	77,3	79,6
Kiểu gen B2	n	0	0	0	1	0	1
	%				4,3		0,9
Kiểu gen C1	n	5	4	3	3	5	20
	%	20,0	17,4	15,0	13,1	22,7	17,7
Kiểu gen I1	n	1	1	0	0	0	2
	%	4,0	4,3				1,8

### 2. Tỷ lệ đột biến tự nhiên liên quan kháng lamivudine

Bảng 2: Tỷ lệ đột biến tự nhiên liên quan kháng lamivudine

Vị trí đột biến	Kiểu gen B4 n = 91		Kiểu gen C1 n = 20		Kiểu gen I1 n = 2	
	n	%	n	%	n	%
L80V	0		0		0	
L80I	0		0		0	
I169T	0		0		0	
V173L	0		0		0	
L180M	1	1,1	0		0	
A181T	0		0		0	
T184S	0		0		0	
M204V	0		1	5	0	
M204I	1	1,1	0		0	
M204S	0		0		0	
Q215S	0		0		0	
Tổng	2		1			

### 3. Tỷ lệ đột biến tự nhiên liên quan kháng thuốc Adefovir

Bảng 3: Tỷ lệ đột biến tự nhiên liên quan kháng thuốc Adefovir

Vị trí đột biến	Kiểu gen B4 n = 91		Kiểu gen C1 n = 20		Kiểu gen I1 n = 2	
	n	%	n	%	n	%
V84M	0		0		0	
S85A	0		0		0	
A181V	1	1,1	0		0	
A181T	0		0		0	
V214A	0		0		0	
Q215S	0		0		0	
N236T	0		0		0	
N238D	0		0		0	
Tổng	1		0		0	

#### 4. Tỷ lệ đột biến tự nhiên liên quan kháng thuốc entecavir

Bảng 4: Tỷ lệ đột biến tự nhiên liên quan kháng thuốc entecavir

Vị trí đột biến	Kiểu gen B4 n = 91		Kiểu gen C1 n = 20		Kiểu gen I1 n = 2	
	n	%	n	%	n	%
I169T	0		0		0	
V173L	0		0		0	
L180M	0		0		0	
T184G	0		0		0	
S202I	0		0		0	
M204V	0		1	5	0	
M250V	0		0		0	
Tổng	0		1		0	

#### BÀN LUẬN

- 113 trong số 122 chủng HBV được tiến hành giải trình tự vùng gen *Pre-S1*. Trên cơ sở các trình tự được giải mã này chúng tôi đã truy cập vào trang Web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> để tiến hành lấy các đoạn gen *Pre-S1* tham khảo của các kiểu gen HBV đã được công bố và đối chiếu kết quả. Kết quả của bảng 2 cho thấy kiểu gen B rất phổ biến tại Hải Phòng và chiếm tỷ lệ 80,5% (B4 là 79,6% và B2 là 0,9%), tiếp theo là kiểu gen C1 chiếm tỷ lệ 17,7%. Có 2 chủng thuộc kiểu gen I1 được xác định. Đây là những chủng ít gặp tại Việt Nam.

- Tỷ lệ đột biến tự nhiên liên quan kháng thuốc lamivudine trong 113 chủng HBV nghiên cứu là 2,66% (3/113), trong đó tỷ lệ đột biến tự nhiên liên quan kháng lamivudine của kiểu gen B là 1,77% (2/113), genotype C là 0,85% (1/113).

Trong 3 chủng xuất hiện đột biến:

- Có 2 chủng (1 thuộc kiểu gen B và 1 thuộc kiểu gen C) xuất hiện đột biến kiểu YMDD tại vị trí aa 204 của vùng gen Pol-RT. Một chủng aa methionine trong bộ 4 aa là tyrosine-methionine-aspartate-aspartate được thay thế bằng aa isoleucine và bộ tứ aa YMDD chuyển thành YIDD. Như vậy chủng này sẽ kháng lamivudine và theo cơ chế liên quan đến đột biến M204I. Với cơ chế đột biến M204I, ngoài lamivudine chủng virus này còn kháng cả 2 thuốc là Telbivudine và Tenofovir, đây là 2 thuốc được sử dụng trong điều trị khá phổ biến trên thế giới nhưng hiện còn chưa được sử dụng nhiều tại thị trường Việt Nam. Chủng còn lại aa methionine trong bộ 4 aa là tyrosine-methionine-aspartate-aspartate được thay thế bằng aa valine và bộ tứ aa YMDD chuyển thành YVDD. Như vậy chủng virus này sẽ kháng đồng thời cả lamivudine và entecavir theo cơ chế đột biến M204V.

- Chủng thứ 3 xuất hiện đột biến tại vị trí aa 180 của vùng gen Pol-RT, aa leucine tại vị trí 180 được thay thế bằng aa methionine. Như vậy chủng này sẽ chỉ kháng lamivudine đơn độc và theo cơ chế đột biến L180M.

- Sự xuất hiện đột biến tự nhiên tại vị trí aa 204 vùng gen Pol-RT theo kiểu YIDD và YVDD là một yếu tố quan trọng để cảnh báo nguy cơ sẽ có một số bệnh nhân được điều trị trên lâm sàng sẽ thất bại với thuốc lamivudine và thậm chí cả với entecavir ngay từ lần điều trị đầu tiên. Do vậy, vấn đề thấy thuốc lâm sàng lựa chọn thuốc điều trị hợp lý và tiên lượng hiệu quả điều trị cho người bệnh cần được đặt ra sớm, điều này

sẽ tiết kiệm được thời gian, chi phí điều trị và đảm bảo phác đồ điều trị cho bệnh nhân là tối ưu nhất.

- Tỷ lệ đột biến tự nhiên liên quan kháng thuốc adefovir trong 113 chủng HBV nghiên cứu là 0,85% (1/113), và chủng này nằm trong kiểu gen B. Đột biến xuất hiện tại vị trí aa 181 của vùng gen Pol-RT, trong đó aa alanine được thay thế bằng aa tyrosine. Cơ chế của đột biến là A181V.

- Tỷ lệ đột biến tự nhiên liên quan kháng thuốc entecavir trong 113 chủng HBV nghiên cứu là 0,85% (1/113), và chủng này nằm trong kiểu gen C. Đột biến kiểu YMDD tại vị trí aa 204 của vùng gen Pol-RT, aa methionine trong bộ 4 aa là tyrosine-methionine-aspartate-aspartate được thay thế bằng aa valine và bộ tứ aa YMDD chuyển thành YVDD. Như vậy chủng virus này sẽ kháng đồng thời cả lamivudine và entecavir theo cơ chế đột biến M204V.

#### KẾT LUẬN

- Chủng HBV lưu hành ở Hải Phòng phổ biến là kiểu gen B 80,5% (B4 là 79,6% và B2 là 0,9%); tiếp theo là kiểu gen C (C1) 17,7% và kiểu gen I (I1) 1,8%.

- Tỷ lệ đột biến tự nhiên liên quan kháng thuốc lamivudine trong 113 chủng HBV được giải trình tự gen là 2,66% (3/113), kiểu gen B là 1,77% và kiểu gen C là 0,85%. 2 chủng có đột biến kiểu YMDD tại vị trí aa 204 của vùng Pol-RT (M204V hoặc M204I), bộ tứ aa là YMDD thành YIDD và YVDD. 1 chủng đột biến tại vị trí aa 180 của vùng Pol-RT (L180M)

- Tỷ lệ đột biến tự nhiên liên quan kháng thuốc adefovir trong 113 chủng HBV nghiên cứu là 0,85%. Đột biến tại vị trí aa 181 của vùng Pol-RT (A181T).

- Tỷ lệ đột biến tự nhiên liên quan kháng thuốc entecavir trong 113 chủng HBV nghiên cứu là 0,85%. Đột biến kiểu YMDD tại vị trí aa 204 của vùng gen Pol-RT ((M204V), bộ tứ aa là YMDD thành YVDD.

- Xuất hiện 2 đột biến kháng đa thuốc dòng nucleoside analogue: 1 chủng virus xuất hiện đột biến M204I (YMDD chuyển thành YIDD), chủng virus này kháng cả lamivudine, telbivudine và tenofovir; 1 chủng virus xuất hiện đột biến M204V (YMDD chuyển thành YVDD). Như vậy chủng virus này sẽ kháng đồng thời cả lamivudine và entecavir.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn thị Minh Thư, Phạm Hùng Vân (2005). Định type và phát hiện đột biến kháng Lamivudine của virus viêm gan B bằng kỹ thuật giải trình tự. *từ nguồn www.drthuthuy.com*
2. Kobayashi M, Suzuki F, (2006). Response to long-term lamivudine treatment in patients infected with hepatitis B virus genotypes A, B, and C. *J Med Virol* 78(10): 1276-83.
3. Kumar M., Satapathy S., Monga R. (2007). A randomized controlled trial of lamivudine to treat acute hepatitis B *Hepatology* 45(1): 97-101.
4. Wen X., Li X., Xie H.(2007). Lamivudine for Acute Hepatitis B Infection. *Hepatology in AASLD practice, Guideline.*
5. [http://www.drthuthuy.com/research/DTVGB\\_Nay\\_TuongLa.html](http://www.drthuthuy.com/research/DTVGB_Nay_TuongLa.html)
6. Tran Thien Tuan Huy, Hiroshi Ushijima, et al (2007). Characteristics of Core Promoter and Precore stop codon Mutants of Hepatitis B virus in Viet Nam. *J. of Med. Virology.* 74: 228-36.