

Kiểu gene virus viêm gan B liên quan với đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng ở người mang virus không triệu chứng và bệnh nhân ung thư gan

LÊ HỮU SONG

Bệnh viện trung ương Quân đội 108

TÓM TẮT

Mục tiêu: tìm hiểu sự phân bố của HBV genotype và vai trò của nó trên các bệnh nhân ung thư gan (UTG) và người mang HBV không triệu chứng (NMVR). **Đối tượng và phương pháp:** 54 bệnh nhân UTG và 54 NMVR đã được đưa vào nghiên cứu. HBV DNA đã được định lượng bằng Real Time PCR theo nguyên lý Taqman. HBV genotype đã được xác định theo phương pháp PCR dựa trên tính đa hình của một đoạn giới hạn (RFLP-PCR) và giải trình tự gene (Sequencing). **Kết quả:** có 5 kiểu gene đơn B, C, D, E, F và 5 kiểu gene đồng/bội nhiễm BC, BD, BE, CE, FE được tìm thấy trên 2 nhóm nghiên cứu; trong đó hay gặp nhất là các kiểu gene C (64,8%), BC (12,9%) và CE (11,1%). Kiểu gene đồng/bội nhiễm gặp nhiều hơn ở nhóm bệnh nhân UTG so với nhóm NMVR (OR = 2.94 (95% [1.1-8.23], P < 0.05; Chi 2(1) = 5.7). Nồng độ HBV DNA trên nhóm bệnh nhân UTG có kiểu gene C cao hơn có ý nghĩa so với nhóm có kiểu gene B và kiểu gene đồng/bội nhiễm (P<0.01); HBV DNA trên nhóm bệnh nhân UTG có kiểu gene đồng/bội nhiễm cũng cao hơn nhóm có kiểu gene B (P<0.05). **Kết luận:** Phân bố kiểu gene của HBV là khác nhau trên 2 nhóm bệnh nhân UTG và NMVR. Nhiễm hơn một kiểu gene có tải lượng virus cao hơn các kiểu gene khác và thường gặp hơn trên bệnh nhân UTG.

Từ khóa: HBV genotype, ung thư gan, mang HBV không triệu chứng

SUMMARY

HEPATITIS B VIRUS (HBV) GENOTYPE IS ASSOCIATED WITH PARACLINICAL, CLINICAL CHARACTERS IN ASYMPTOMATIC CHRONIC HBV CARRIERS AND HEPATOCELLULAR CARCINOMA

Aims: to investigate the distribution of HBV genotype and its role in patients with hepatocellular carcinoma (HCC) and asymptomatic chronic HBV carriers (ASYM). **Patients and methods:** 54 HBV infected patients with HCC and 54 ASYM were enrolled in this study. HBV DNA was measured by Real Time PCR using Taqman prob, HBV genotype was detected by restriction fragment length polymorphism (RFLP) PCR and sequencing. **Results:** there are 5 single genotype (B, C, D, E, F) and 5 HBV genotype mixture (BC, BD, BE, CE, FE) have been found; among them genotype C, BC and CE are predominant (64,8%, 12.9% and 11.1%, respectively). HBV genotype mixture in HCC group has been found more frequent in comparison to ASYM (OR = 2.94 (95% [1.1-8.23], P < 0.05; Chi 2(1) = 5.7). HBV DNA level in HCC patients infected with HBV genotype C was significant higher those infected with genotype B and genotype mixtures (P<0.01);

and HBV DNA level in HCC patient infected with genotype mixture was higher than those infected with genotype B (P<0.05). **Conclusion:** HBV genotype mixture is associated with HCC in patient infected with HBV.

Keywords: HBV genotype, carcinoma, asymptomatic chronic HBV carriers

ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhiễm virus viêm gan B (HBV) đã và đang là một vấn đề y tế toàn cầu. Theo thống kê trên thế giới có khoảng 2 tỷ người đã nhiễm HBV và có trên 350 triệu người đang nhiễm HBV mạn tính. Những người này có nguy cơ tiến triển thành ung thư biểu mô tế bào gan cao hơn 100 lần so với người bình thường. Ước tính mỗi năm có hơn một triệu người chết do hậu quả của nhiễm HBV mạn tính [1].

HBV là một loại virus có nhân là chuỗi xoắn kép DNA, có vỏ và không gây huỷ hoại tế bào gan nhiễm virus một cách trực tiếp. Nhiễm HBV có thể gây nên nhiều thể bệnh khác nhau từ người mang virus không triệu chứng đến viêm gan cấp tính tự hồi phục, viêm gan tối cấp tính, viêm gan mạn tính, xơ gan và có thể dẫn đến ung thư gan [2]. Nguyên nhân nào dẫn đến sự khác nhau đó cho đến hiện nay vẫn chưa thật sự được hiểu rõ. Bên cạnh vai trò quan trọng của đáp ứng miễn dịch đã được đề cập nhiều thì vai trò của bản thân virus (đột biến gen và kiểu gen) đang ngày càng được quan tâm.

Từ năm 1988 Okamoto và cộng sự đã phát hiện HBV có bộ gen khác nhau trên các bệnh nhân nghiên cứu chứ không phải như trước đây chúng ta vẫn nhận định. Các tác giả đã quy ước gọi kiểu gen A là kiểu gen cổ điển, kiểu gen khác như B có hơn 8% nucleotide khác so với kiểu gen A, kiểu gen C có hơn 8% nucleotide khác so với kiểu gen A và B, và tương tự như vậy cho đến hiện nay người ta đã phát hiện được 8 kiểu gen của HBV và được ký hiệu từ A đến H [3], [4], [5], [6]. Như vậy, khi các bệnh nhân được phát hiện có HBsAg dương tính không có nghĩa là họ đều nhiễm cùng một chủng HBV, mà thực chất là họ có thể nhiễm nhiều chủng HBV và có thể là nhiều kiểu gen, dưới kiểu gen khác nhau. Từ đó đã gợi mở cho những nhà nghiên cứu hướng tới một trong những cách giải thích mới cho sự đa dạng và khác biệt về diễn biến lâm sàng trên các bệnh nhân khác nhau.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

Tổng số có 54 bệnh nhân ung thư gan (UTG) đang điều trị tại Khoa Tiêu hoá, Bệnh viện TƯQĐ 108. Tất cả các bệnh nhân đều được xác định chẩn đoán bằng siêu âm, xét nghiệm máu AFP và chọc hút

tế bào làm mô bệnh học tại Khoa Giải phẫu bệnh lý. 54 người mang virus viêm gan B không triệu chứng (NMVR) được phát hiện qua khám sức khoẻ định kỳ và được theo dõi định kỳ theo hướng dẫn của Hội gan mật.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Thiết kế nghiên cứu

- Nghiên cứu là tiền cứu, mô tả cắt ngang.
- Mỗi bệnh nhân nghiên cứu được đăng ký vào một phiếu theo dõi riêng có đầy đủ các chỉ tiêu về dịch tễ, lâm sàng và xét nghiệm.

2.2. Các phương pháp xét nghiệm

Các xét nghiệm về gene: định lượng nồng độ HBV DNA, xác định kiểu gene HBV của HBV được tiến hành tại Khoa Sinh học Bệnh viện TƯQĐ 108.

- *Phương pháp xét nghiệm định lượng nồng độ HBV DNA:* HBV- DNA được định lượng bằng kỹ thuật Real time – PCR trên hệ thống máy Real time – PCR ABI 7500 (Applied BioSystem, Mỹ). Về nguyên lý sử dụng các mẫu dò (Probe) theo phương pháp Taqman. Đây là phương pháp đặc hiệu nhất hiện nay so với các phương pháp sử dụng trong Real Time PCR khác. Nguyên lý là cùng với cặp mồi cho PCR thì người ta sẽ thiết kế thêm một mẫu dò (probe) là một đoạn oligo đặc hiệu có gắn các chất phát quang (R) và chất ức chế (Q). Bình thường chất Q sẽ ức chế sự phát sáng của chất R. Khi có đoạn DNA đặc hiệu với probe thì probe sẽ gắn vào và đoạn Q sẽ tách ra và giải phóng R, do đó R phát sáng và máy sẽ đo cường độ ánh sáng mà biết chính xác số copies có trong mẫu theo thời gian.

Đoạn mồi đã được sử dụng là:

HBs Forward Primer: 5'-CAACCTCCAATCACTCACCAAC-3';
HBs primer revers: 5'-ATATGATAAAACGCCGACACACA-3'
HBs-Taq: 5'-(FAM)-TCCTCCAATTTGCTGCTGTTATCGCT-(TAMRA)-3'.

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.

Phương pháp xác định kiểu gene HBV: Kiểu gene của VRVGB đã được xác định bằng kỹ thuật cắt gene sau khi nhân đoạn, hay còn gọi là kỹ thuật nhân gene kết hợp tính đa hình của một đoạn giới hạn (Restricted Fragment Length Polymorphisms Polymerase Chain Reaction, RFLP-PCR). Phương pháp này có phần thay đổi nhỏ so với Hannoun và cộng sự. Cụ thể là thay vì chỉ sử dụng PCR một bước chúng tôi đã nâng số copies của Virus lên bằng cách dùng PCR 2 bước (nested-PCR). Đoạn mồi cho PCR thứ nhất là (HB pre 16) 5-CACCTCTGCCTAATCATCTCT-3 và primer (HBV 590as) 5-CTGCGAGGCGAGGGAGTT-3. PCR đã được thực hiện sau một bước tách đôi chuỗi ADN (94°C cho 4 phút) là 35 vòng với điều kiện như sau: 94°C cho 30 giây, 55°C cho 30 giây và 72°C cho 30 giây. Cuối cùng sản phẩm đã được kéo dài bằng một bước 10 phút ở

72°C. Bước thứ 2 được tiến hành theo như Hannoun và cộng sự [7]. Sản phẩm PCR đã được ủ và cắt bằng men *Tsp509I* và sau đó được soi dưới đèn cực tím và so sánh với các đoạn gene chuẩn.

Sau khi cắt sản phẩm PCR bằng enzyme *Tsp509I* chúng tôi chạy điện di trên thạch (Agaro 3%) có nhuộm Ethidium Bromide 1% và soi dưới đèn soi cực tím.

- *Phương pháp giải trình tự gene của HBV:* trong một số trường hợp không xác định được kiểu gene của HBV bằng phương pháp nhân gene kết hợp tính đa hình của một đoạn giới hạn (Restricted Fragment Length Polymorphisms Polymerase Chain Reaction, RFLP-PCR) chúng tôi đã xác định kiểu gene bằng phương pháp giải trình tự gene. Đoạn mồi được sử dụng để giải trình tự là mồi xuôi: P1865: 5'□CAAGCCTCCAAGCTGTGCCTGGGTGCCTT-3' và mồi ngược là một trong hai mồi P2384: 5'□TTCTTCTCTAGGGGACCTGCCTCAGTCC-3' và P2384: 5'□TTCTTCTCTAGGGGACCTGCCTCATCGT-3'. Quá trình giải trình tự gene của HBV được tiến hành trên hệ thống CEQ 8800, Beckman Coulter, Mỹ, tại Khoa Sinh học phân tử, Bệnh viện TƯQĐ 108.

Sau khi giải trình tự gene kết quả được so sánh với trình tự chuẩn trên ngân hàng dữ liệu theo địa chỉ trang Web:

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome.

Sau đó được phân tích trên phần mềm Bioedit 7.05 trên trang Web:

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

2.3. Phương pháp thống kê: số liệu thu thập được phân tích trên phần mềm Stview 4.5 và Stata 7.0. Khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0.05$.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Phân bố kiểu gene HBV trên 108 bệnh nhân nghiên cứu

Trên tổng số 108 bệnh nhân ở 2 nhóm nghiên cứu chúng tôi xác định được 5 kiểu gene đơn và 5 kiểu gene đồng/bội nhiễm của HBV. Các kiểu gene đơn phát hiện được là B, C, D, E và F. Các kiểu gene đồng/bội nhiễm phát hiện được là BC, BD, BE, CE và CF. Trong đó các kiểu gene chiếm đa số là C (64,8%), BC (12,9%) và CE (11,1%).

2. Phân bố kiểu gene của HBV trên 2 nhóm bệnh nhân UTG và NMVR

Khi phân tích sự phân bố kiểu gene HBV trên 2 nhóm bệnh nhân UTG và NMVR chúng tôi thấy tần suất xuất hiện các kiểu gene là không giống nhau. Trong đó kiểu gene C gặp nhiều hơn ở nhóm NMVR chiếm 43/54 bệnh nhân (79,6%) so với nhóm UTG có 27/54 bệnh nhân chiếm 50%. Tuy nhiên, khi tính tất cả các kiểu gene đồng/bội nhiễm có C thì không có sự khác biệt giữa 2 nhóm (45/54 trên nhóm UTG so với 52/54 trên nhóm NMVR);

Bảng 1. Phân bố kiểu gene trên 2 nhóm nghiên cứu

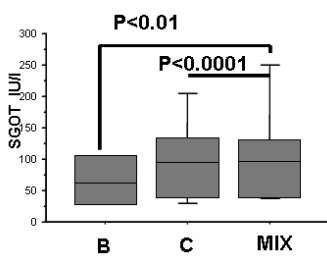
Kiểu gene	B	C	D	E	F	BC	BD	BE	CE	CF	TỔNG
UTG	4	27	1	1	1	10	1	1	7	1	54
%	7.5	50	1.85	1.85	1.85	18.5	1.85	1.85	12.9	1.85	100
NMVR	1	43	1	0	0	4	0	0	5	0	54
%	1.85	79.6	1.85	0	0	7.4	0	0	9.3	0	100

Khi tất cả các kiểu gene đồng/bội nhiễm được gọi chung là kiểu gene Mix chúng tôi thấy kiểu gene Mix ở nhóm UTG được tìm thấy nhiều hơn có ý nghĩa so với ở nhóm NMVR (OR = 2.94; 95% [1.1-8.23], P < 0.05; Chi 2(1) = 5.7).

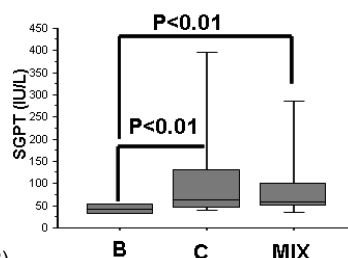
2. Mối liên quan giữa kiểu gene của HBV với biến đổi các chỉ số sinh hoá

Do NMVR không có các biến đổi sinh hoá nên từ đây chúng tôi chỉ phân tích trên nhóm bệnh nhân UTG. Thêm vào đó, do các kiểu gene khác xuất hiện không nhiều nên chúng tôi chỉ phân tích trên các kiểu gene phổ biến là kiểu gene B, C và Mix. Khi tìm hiểu mối liên quan giữa biến đổi men gan SGOT với kiểu gene HBV chúng tôi thấy nồng độ SGOT tăng cao hơn ở nhóm có kiểu gene Mix so với 2 kiểu gene B và C (152 ± 52 IU/l so với 94 ± 12 IU/l và 67 ± 22 IU/l; P < 0.01 và P < 0.0001). Hình A.

Trong khi đó ở bệnh nhân mang kiểu gene B nồng độ men SGPT lại thấp hơn có ý nghĩa so với những bệnh nhân mang kiểu gene C và Mix (43 ± 6 IU/l so với 125 ± 25 IU/l và 104 ± 23 IU/l; P < 0.01). Hình B.

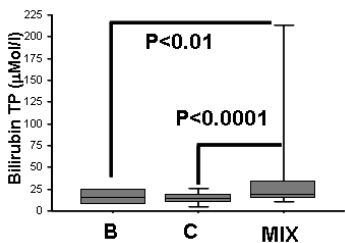


Hình A)

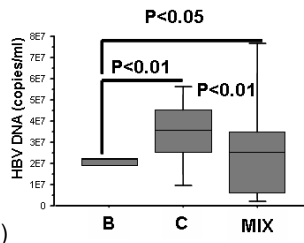


Hình B)

Trong khi đó nồng độ Bilirubin toàn phần tăng cao hơn ở nhóm có kiểu gene Mix so với các kiểu gene B và C (56 ± 22 µMol/l so với 15.9 ± 1.7 µMol/l và 16.6 ± 4.6 µMol/l, P < 0.01 và P < 0.0001). Hình C. Đi sâu phân tích về mối liên quan giữa kiểu gene HBV với mức độ nhân lên của virus chúng tôi thấy nồng độ HBV DNA cao nhất ở nhóm có kiểu gene C tiếp đó đến kiểu gene Mix và cuối cùng là kiểu gene B (3.6 × 10⁷ ± 3.4 × 10⁶ copies/ml so với 2.9 × 10⁷ ± 6.1 × 10⁶ và 2 × 10⁷ ± 1.4 × 10⁶ copies/ml; P < 0.01). Ngoài ra so với kiểu gene B thì kiểu gene Mix cũng có nồng độ HBV DNA cao hơn có ý nghĩa với P < 0.05). Hình D.



Hình C)



Hình D)

BÀN LUẬN

Do HBV không có khả năng tự đọc sửa trong quá trình nhân lên nên hậu quả là làm xuất hiện các đột biến với tần suất cao, ước tính mỗi năm có từ 1,5 × 10⁻⁵ đến 5 × 10⁻⁵ nucleotid thay thế trên một vị trí ở những người có HBeAg(+) [8]. Sự thay đổi trên bộ gene của HBV xảy ra sau những đột biến rải rác và có thể là sự lựa chọn ưu thế đối với đáp ứng miễn dịch của vật chủ và các yếu tố khác như kháng thuốc điều trị. Các đột biến cộng hợp được tìm thấy cao

hơn ở những virus trên các bệnh nhân có HBeAg âm tính, điều này gợi ý rằng đáp ứng miễn dịch của vật chủ có thể có vai trò quan trọng trong sự tiến hóa của HBV [8]. Trong một số trường hợp quá trình nhân lên của HBV không được thực hiện một cách đúng tuân tự và chính xác dẫn đến việc xuất hiện một số kiểu gene khác nhau và hơn nữa là sự xuất hiện các đột biến gene của HBV.

Việt Nam là nước nằm trong khu vực có tỷ lệ nhiễm HBV cao nhất thế giới với hơn 15% dân số có

HBsAg (+). Đó là một trong những nguyên nhân làm cho HBV có cơ hội để pha trộn các kiểu gene khi một bệnh nhân có thể không chỉ nhiễm HBV một lần trong đời. Hơn nữa, dân tộc ta sau hơn 4 nghìn năm lịch sử với một thời gian dài bị đô hộ bởi các thế lực phương bắc và chế độ thuộc địa thực dân. Đó cũng là nguyên nhân làm tăng tính giao lưu rộng rãi giữa các nguồn virut gây viêm gan. Đó là những lý do mà sự phân bố phong phú của các kiểu gene HBV ở Việt Nam. Thực tế các nghiên cứu trước đây cũng đã cho thấy những kiểu gene tổ hợp mới giữa kiểu gene A và C đã xuất hiện ở Việt Nam [9]. Gần đây tác giả Tuấn Huy cũng đã phát hiện một kiểu gene mới và tự đặt tên là kiểu gene I [10].

Như vậy, tính đa dạng, phong phú về kiểu gene HBV ở Việt Nam cũng đã được đề cập đến. Mặc dù từ trước tới nay các tác giả trong nước vẫn cho rằng chủ yếu ở Việt nam chỉ có 2 kiểu gene là B và C.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy kiểu gene C là chiếm tỷ lệ cao nhất với hơn 64,8%, trong khi đó kiểu gene B chỉ có 4,6%. Tuy nhiên, nếu tính chung với các kiểu gene đồng/bộ nhiễm với kiểu gene B và C chúng tôi thấy có 21/108 bệnh nhân có kiểu gene B chiếm 19,4% và kiểu gene C có 97/108 bệnh nhân chiếm 89,8%. Phải chăng đây là một lý giải cho sự khác biệt về số liệu giữa các nghiên cứu.

Hiện tượng trên một bệnh nhân nhiễm hơn 1 kiểu gene HBV cũng như HCV đã được thông báo [7]. Trong đó theo nghiên cứu của Hannoun và cs khi sử dụng phương pháp phát hiện kiểu gene bằng RFLP-PCR tác giả thấy có 67% bệnh nhân có nhiễm hơn 1 kiểu gene. Như vậy, đồng/bộ nhiễm hơn 1 kiểu gene trên một bệnh nhân là tương đối phổ biến. Tuy nhiên, việc phát hiện sự đồng/bộ nhiễm các kiểu gene HBV là tương đối khó và chưa có phương pháp chuẩn. Người ta thấy rằng nếu sử dụng phương pháp giải trình tự gene thì rất khó phát hiện sự đồng/bộ nhiễm các kiểu gene. Chỉ có phương pháp sử dụng tính đa hình của một đoạn giới hạn như chúng tôi đang áp dụng thì mới có thể phát hiện được sự đồng/bộ nhiễm của các kiểu gene [7].

Gần đây người ta cũng đã quan tâm đến vai trò của các kiểu gene đồng/bộ nhiễm trong tiến triển UTG. Người ta cũng thấy rằng kiểu gene đồng/bộ nhiễm gặp nhiều hơn ở nhóm UTG và có tải lượng virut cao hơn các kiểu gene khác. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy kiểu gene đồng/bộ nhiễm thường gặp hơn ở nhóm UTG. Kết quả chỉ rõ nguy cơ UTG tăng 2,94 lần khi nhiễm hơn 1 kiểu gene HBV với độ tin cậy 95% là [1,1-8].

Khi phân tích đến mối liên quan giữa kiểu gene HBV với mức độ tổn thương gan Yin và cs cũng cho thấy khi nhiễm kiểu gene phối hợp thì tổn thương gan cũng nặng hơn so với các kiểu gene khác. Trong đó, men Transaminase và Bilirubin đều tăng hơn ở nhóm có kiểu gene phối hợp so với các kiểu gene khác.

Tương tự như vậy khi tìm hiểu mối liên quan giữa kiểu gene HBV với mức độ nhân lên của virut Yin và cs cũng thấy khi nhiễm kiểu gene phối hợp tải lượng virut tăng hơn rõ rệt so với khi nhiễm các kiểu gene khác. Kết quả này cũng đã được tìm thấy trong nghiên cứu của chúng tôi.

KẾT LUẬN

Như vậy, qua kết quả nghiên cứu trên 54 bệnh nhân UTG và 54 NMVR chúng tôi thấy khi nhiễm kiểu gene phối hợp thì nguy cơ tiến triển thành UTG là cao hơn. Tải lượng virut cũng như tổn thương gan cũng nhiều hơn trên các bệnh nhân mang kiểu gene đồng/bộ nhiễm này. Tuy nhiên, để đánh giá chính xác hơn vai trò của kiểu gene HBV chúng ta cần phải nghiên cứu theo dõi dọc và với số lượng nhiều hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lee, W. M (1997), "Hepatitis B virus infection", *New England Journal of Medicine*, 337, pp. 45-733.
2. Acharya SK, Panda SK, Saxena A and Gupta SD (2000), "Acute hepatic failure in India: a perspective from the East", *J Gastroenterol Hepatol*, 15, pp. 9-473.
3. Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnus LO (2002), "Geneotype H: a new Amerindian geneotype of hepatitis B virus revealed in Central America", *J Gene Virol*, 83, pp. 73-2059.
4. Norder H, Hammam B, Lee SD, Bile K, Courouce AM, Mushahwar IK, Magnus LO (1993), "Geneetic relatedness of hepatitis B viral strains of diverse geographical origin and natural variations in the primary structure of the surface antigene", *J Gene Virol*, 74, pp. 1341-1348.
5. Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M (1998), "Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigene subtypes", *J Gene Virol*, 69, pp. 2575-2583.
6. Stuyver L, De Genedt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF, Rossau R (2000), "A new geneotype of hepatitis B virus: complete geneome and phylogeneetic relatedness", *J Gene Virol*, 81, pp. 67-74.
7. Hannoun C, Krogsgaard K, Horal P, Lindh M (2002), "Interpret trial group. Geneotype mixtures of hepatitis B virus in patients treated with interferon", *J Infect Dis*, 186, pp. 9-752.
8. Desmond CP, Bartholomeusz A, Gaudieri S, Revill PA, Lewin SR (2008), "A systematic review of T-cell epitopes in hepatitis B virus: identification, geneotypic variation and relevance to antiviral therapeutics", *Antivir Ther*, 13(2), pp. 75-161.
9. Hannoun C, Norder H, Lindh M. An aberrant geneotype revealed in recombinant hepatitis B virus strains from Vietnam. *J Gen Virol*. 2000 Sep;81(Pt 9):2267-72
10. Tran TT, Trinh TN, Abe K. New complex recombinant geneotype of hepatitis B virus identified in Vietnam. *J Virol*. 2008 Jun;82(11):5657-63. Epub 2008 Mar 19.