

XÂY DỰNG KỸ THUẬT COLD - PCR ĐỂ PHÁT HIỆN SỚM QUẦN THỂ ĐỘT BIẾN KHÁNG THUỐC NUCLEOS(T)IDE ANALOGS Ở HEPATITIS VIRUS B

Chu Văn Sơn¹, Lê Thị Ngân⁴, Nguyễn Đăng Hoàn³, Vũ Thiên Sơn¹, Phạm Thị Hạnh¹,
Nguyễn Minh Hằng², Nguyễn Văn Dũng⁵, Vũ Bích Thảo⁶, Nguyễn Phạm Anh Hoa⁷,
Phùng Thị Bích Thủy², Nguyễn Thị Vân Anh¹

¹Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein,
Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội;

²Khoa Nghiên cứu Sinh học Phân tử các Bệnh truyền nhiễm, Bệnh viện Nhi Trung Ương;

³Khoa Nhi Tiêu hóa - Dinh dưỡng- Lây, Bệnh viện Đa khoa Xanh Pôn;

⁴Khoa Vi sinh, Bệnh viện Bạch Mai;

⁵Trung tâm Bệnh nhiệt đới, Bệnh viện Bạch Mai;

⁶Khoa Khám bệnh theo yêu cầu, Bệnh viện Bạch Mai;

⁷Khoa Gan mật, Bệnh viện Nhi Trung Ương

Kỹ thuật PCR biến tính ở nhiệt độ thấp (CO - amplification at Lower Denaturation temperature - PCR; COLD - PCR) được cải tiến để ưu tiên làm giàu các đột biến (mt) chiếm tỉ lệ thấp trong quần thể thể đại (wt) qua quá trình nhân bản, nhờ đó giúp phát hiện quần thể đột biến kháng thuốc Nucleos(t)ide Analogs của HBV với độ nhạy 5% mt/wt. Thử nghiệm kỹ thuật này trên 50 mẫu huyết thanh của bệnh nhân nhiễm HBV ($10^7 - 10^8$ IU/ml), chúng tôi phát hiện 38 mẫu đột biến, trong đó 32 mẫu đột biến kháng thuốc gồm: 24 mẫu đột biến đơn rtV207M và rtV173G kháng LMV, rtN238A/K/T kháng ADV; 8 mẫu đột biến kép rtV207M/I - rtI187V kháng LMV, rtM204I - rtV207M/I và rtL180M - rtM204I - rtV207M/I kháng LMV, ADV và giảm hiệu quả của ETV. Với 2 mẫu đột biến kháng LMV, kỹ thuật COLD - PCR đã cho phép phát hiện đột biến kép rtV207M - rtV207I, trong khi kỹ thuật PCR thông thường chỉ phát hiện đột biến đơn rtV207M. Như vậy, kỹ thuật COLD - PCR có tiềm năng ứng dụng trong phát hiện sớm đột biến kháng thuốc để tư vấn kịp thời thuốc điều trị phù hợp cho bệnh nhân.

Từ khoá: HBV, NAs, đột biến kháng thuốc, COLD-PCR.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhóm thuốc có cấu trúc tương tự Nucleos(t)ide Analogs (NAs), gồm 5 loại Lamivudine (LMV), Telbivudine (LdT), Adefovir dipivoxil (ADV), Tenofovir dipivoxil (TDV) và Entecavir (ETV), được sử dụng phổ biến trong điều trị viêm gan B mạn tính hiện nay. Nhóm thuốc này

có tác dụng ức chế enzym reverse transcriptase (RTase) xúc tác quá trình phiên mã ngược từ mRNA thành DNA của HBV, do đó làm giảm sự nhân lên của HBV [1,2]. Tuy nhiên, thời gian điều trị kéo dài xuất hiện các đột biến trên vùng gen mã hóa cho enzym RTase của HBV dẫn đến tình trạng kháng thuốc ở các bệnh nhân, gây khó khăn trong việc xác định hướng điều trị [3]. Hiện nay, PCR kết hợp giải trình tự gen được coi là phương pháp “chuẩn vàng” để phát hiện đột biến điểm kháng NAs. Tuy nhiên kỹ thuật này có độ nhạy thấp, khó phát hiện

Tác giả liên hệ: Nguyễn Thị Vân Anh, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG_ Hà Nội

Email: vananhbiolab@gmail.com

Ngày nhận: 27/03/2019

Ngày được chấp nhận: 13/05/2019

được quần thể đột biến (mutant; mt) chiếm tỷ lệ thấp dưới 20% so với thể dại (wild-type; wt) nên không phù hợp để phát hiện sớm các đột biến xuất hiện trong quá trình điều trị thuốc [1]. Phương pháp xác định đột biến bằng giải trình tự thế hệ mới (Next Generation Sequencing; NGS) cho phép phát hiện tất cả các đột biến tồn tại trong quần thể với độ nhạy cao (khoảng 1%), tuy nhiên vì có giá thành cao, khó phân tích và yêu cầu thời gian phân tích dữ liệu kéo dài nên chưa thể áp dụng rộng rãi cho xét nghiệm HBV kháng thuốc tại cộng đồng [1]. Để khắc phục nhược điểm độ nhạy thấp do sự nhân bản không chọn lọc của PCR kết hợp giải trình tự Sanger, PCR biến tính ở nhiệt độ thấp được phát triển bởi nhóm nghiên cứu của Li và cộng sự [3], Liu và cộng sự [4] là một cải tiến của PCR truyền thống nhằm làm giàu có định hướng các allele hiếm trong quần thể, từ đó làm tăng tỉ lệ các allele hiếm/allele ưu thế, cuối cùng tăng độ nhạy của phản ứng.

Trong nghiên cứu này chúng tôi xây dựng kỹ thuật COLD-PCR áp dụng cho việc nhân bản đặc hiệu 2 vùng gen có kích thước < 200 bp chứa hầu hết các đột biến kháng NAs của gen mã hoá enzym RTase của HBV. Kỹ thuật này kết hợp với giải trình tự gen được đánh giá về độ nhạy và áp dụng thử nghiệm phát hiện đột biến kháng thuốc NAs của HBV trên các mẫu huyết thanh của bệnh nhân viêm gan B mạn tính, và thể hiện tiềm năng ứng dụng trong phát hiện sớm đột biến kháng thuốc để tư vấn kịp thời thuốc điều trị phù hợp cho bệnh nhân.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

Tổng cộng 50 mẫu huyết thanh của bệnh nhân viêm gan B mạn tính được thu thập từ tháng 1 đến tháng 3 năm 2019, trong đó:

+ 30 mẫu huyết thanh của bệnh nhân nhi

chưa được điều trị thuốc NAs có tải lượng HBV > 10^6 IU/ml (trung bình 10^7 IU/ml) được thu thập tại bệnh viện Nhi Trung Ương và bệnh viện Đa khoa Xanh Pôn;

+ 20 mẫu huyết thanh của bệnh nhân người lớn đã và đang điều trị với thuốc ba loại thuốc là ETV, ADV và TDF, có tải lượng HBV không giảm trong quá trình điều trị > 10^6 IU/ml (trung bình 10^8 IU/ml), hoặc đang giảm xuống thấp không phát hiện được mà sau đó lại tăng bất thường (> 10^2 IU/ml) được thu thập tại bệnh viện Bạch Mai.

Các mẫu được bảo quản ở -80°C để phục vụ cho việc tách chiết DNA hệ gen, nhân bản đoạn gen chứa đột biến kháng thuốc NAs bằng kỹ thuật PCR và COLD-PCR theo chu trình nhiệt được trình bày ở mục 2.2 và 2.4, và giải trình tự đoạn gen để phân tích sự xuất hiện của điểm đột biến.

2. Phương pháp

2.1. Thiết kế các cặp mồi đặc hiệu cho PCR và COLD-PCR nhân bản vùng gen chứa đột biến kháng thuốc NAs

Các cặp mồi xuôi và ngược được thiết kế dựa trên vùng bảo thủ của trình tự gen mã hóa cho domain B-C-D-E của enzym RTase của HBV [3] và kết quả so sánh cơ sở dữ liệu genome của 8 genotype HBV (A-I) trên ngân hàng gen NCBI. Với kỹ thuật PCR, mồi xuôi rtHBV-Fw và mồi ngược rtHBV - Rv được thiết kế để khuếch đại đoạn trình tự P1-2 mang các vị trí đột biến thường gặp như rtV173G/L/T, rtL180M, A181V/T, rtA194T, rtS202I/G, rtM204I/V, rtV207I/M/L, rtN236T, rtN/H238A/K/T, rtM250I/V thuộc cả 4 domain B-C-D-E. Với kỹ thuật COLD-PCR, mồi xuôi rtHBV-Fw1/Fw2 và mồi ngược rtHBV- Rv1/Rv2 được thiết kế để khuếch đại đoạn trình tự P1/P2 tương ứng thuộc domain B-C/D-E. P1 và P2 đều < 200 bp để đảm bảo sự chênh lệch về nhiệt độ nóng chảy (T_m) của sợi đôi homoduplex (mt-

mt; wt-wt) và heteroduplex (mt-wt). Thông tin mỗi và gen nhân bản được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Thông tin mỗi, trình tự, kích thước vùng gen chứa đột biến kháng NAs của HBV

Cặp mỗi	Trình tự (5' - 3')	Vị trí gen	Kích thước (bp)	Vị trí axit amin (đột biến đại diện trong vùng)
rtHBV-Fw	TCCTGCTCAAGGAACCTCTATG	Nu 532-929	398	rtI169-rtG258
rtHBV-Rv	TGTACAATATGTTCTGTGG			
rtHBV-Fw1	CACCTGTATTCCCATCCCATC	Nu 595-788	194	rtI169-rtS213
rtHBV-Rv1	AGGGACTCAAGATGCTGTACA			<i>rtM204I (LMV, LdT)</i> <i>rtV207L/M/I (LMV, LdT)</i> <i>rtA194T (TDF)</i>
rtHBV-Fw2	CAGTTATATGGATGATGTGG-TATTGG	Nu 732-929	198	rtG210- rtG258
rtHBV-Rv2	TGTACAATATGTTCTGTGG			<i>rtN236T (ADV)</i> <i>rtM250V(ETV)</i>

2.2. Nhân dòng tạo plasmid chứa trình tự gen thể đại

DNA hệ gen HBV được tách chiết từ một số mẫu huyết thanh của các bệnh nhân viêm gan B mạn tính sử dụng bộ sinh phẩm ANAPURE VIRAL DNA/RNA mini kit (ANABIO R&D, Việt Nam) và sau đó được sử dụng làm khuôn cho PCR nhân bản đoạn gen P1-2 có kích thước 398 bp bằng cặp mỗi rtHBV-Fw và rtHBV-Rv với chu trình nhiệt 95°C - 10 phút; 35 chu kỳ gồm các bước: 95°C - 15 giây, 60°C - 20 giây, 72°C - 20 giây; 72°C - 5 phút. Các sản phẩm PCR được giải trình tự và kiểm tra sự vắng mặt của các đột biến kháng thuốc NAs, sau đó được nhân dòng vào vector pTOP-TA (Enzymomics, Hàn Quốc). Chủng *E. coli* mang plasmid tái tổ hợp chứa đoạn gen 398 bp được sàng lọc dựa trên phương pháp sàng lọc khuẩn lạc "xanh - trắng" và khẳng định bằng colony-PCR sử dụng cặp mỗi đặc hiệu rtHBV Rv/Fw. Khuẩn lạc tái tổ hợp được sử dụng để

tách plasmid dạng thể đại.

2.3. Thiết kế và tổng hợp gen tạo mẫu chuẩn chứa trình tự gen đột biến

Các đoạn oligonucleos(t)ide mang đột biến điểm thay thế các nucleos(t)ide tại 5 vị trí tương ứng với các đột biến đại diện được thuê tổng hợp và nhân dòng vào vector pUC19 bởi Phusa Biochem, Việt Nam. Trong đó, đoạn gen 194 bp chứa các đột biến *rtA194T (G709A)*, *rtM204I (G741T)*, *rtV207M (G748A)*; đoạn gen 198 bp chứa các đột biến *rtN236T (A836C)*, *rtM250V (A877G)*. Các plasmid chứa đột biến đều được giải trình tự để khẳng định vị trí đột biến.

2.4. Xây dựng chu trình COLD-PCR phát hiện đột biến kháng thuốc NAs của HBV dựa trên các mẫu chuẩn.

Dựa vào T_m của từng dạng sợi đôi (đột biến và thể đại), nhiệt độ biến tính tới hạn T_c được xác định bằng cách sử dụng DNA mang gen thể đại làm khuôn mẫu với cùng hệ thống PCR

như được mô tả ở trên với chu trình nhiệt 95°C - 10 phút, 10 chu kỳ gồm 95°C - 15 giây, 60°C - 20 giây, 72°C - 20 giây và 35 chu kỳ Tx - 15 giây, 60°C - 20 giây và 72°C - 20 giây. Giá trị Tx nhỏ nhất mà tại đó không xuất hiện sản phẩm PCR trên gel điện di agarose được lựa chọn là nhiệt độ biến tính tới hạn Tc cho hệ thống này. Sau khi xác định giá trị Tc, điều kiện cho COLD-PCR được thiết lập như sau: 95°C-10 phút, 10 chu kỳ (95°C - 15 giây, 60°C - 20 giây, 72°C - 20 giây), và 30 chu kỳ (95°C - 15 giây, 70°C - 90 giây, Tc - 15 giây, 60°C - 20 giây, 72°C - 20 giây; 72°C - 5 phút). Các phương pháp tinh sạch DNA và giải trình tự tương tự như được sử dụng cho các sản phẩm PCR thông thường.

2.5. Xác định ngưỡng phát hiện của kỹ thuật COLD-PCR

Các plasmid tái tổ hợp chứa đoạn trình tự thể đại và đột biến được trộn lẫn để chuẩn bị các mẫu plasmid hỗn hợp có tỉ lệ phần trăm đột biến/thể đại lần lượt là 100%, 10%, 5% và 1%,

và được sử dụng làm khuôn cho PCR, COLD-PCR sau đó kết hợp giải trình tự Sanger để tính toán độ nhạy của phản ứng. Thành phần phản ứng gồm 1X Hot-Taq Buffer; 0,2 mM dNTP; 1U Hot-Taq; 500 nM rtHBV-Rv/Fw (cho PCR) hoặc rtHBVRv1/Fw1 hay rtHBV Rv2/Fw2 (cho COLD-PCR) và H₂O vừa đủ 25 µl. Chu trình nhiệt của PCR và COLD-PCR được thực hiện giống như đã tối ưu ở mục 2.2 và 2.4. Sản phẩm PCR và COLD-PCR được gửi tinh sạch và giải trình tự bởi hãng First base (Singapore).

3. Đạo đức trong nghiên cứu

Nghiên cứu đã được thông qua Hội đồng Y đức số 39/BVNTW-VNCSKTE ngày 9/1/2019 của Bệnh viện Nhi Trung Ương theo đề tài mã số 108.04-2017.307 và được thực hiện theo đúng các quy định về đạo đức nghiên cứu trong Y học. Bệnh nhân được cung cấp đầy đủ thông tin về nghiên cứu, được bảo mật thông tin cá nhân và ký vào phiếu đồng thuận tham gia nghiên cứu.

III. KẾT QUẢ

1. Thông tin bệnh nhân và mẫu bệnh phẩm thu thập

Thông tin tổng hợp về tuổi, giới và các chỉ số cận lâm sàng như nồng độ men gan (ALT, AST), HBV kháng nguyên (HBeAg) và tải lượng HBV trong huyết thanh của bệnh nhân được thu thập theo mô tả ở phần Phương pháp và tổng hợp ở bảng 2,

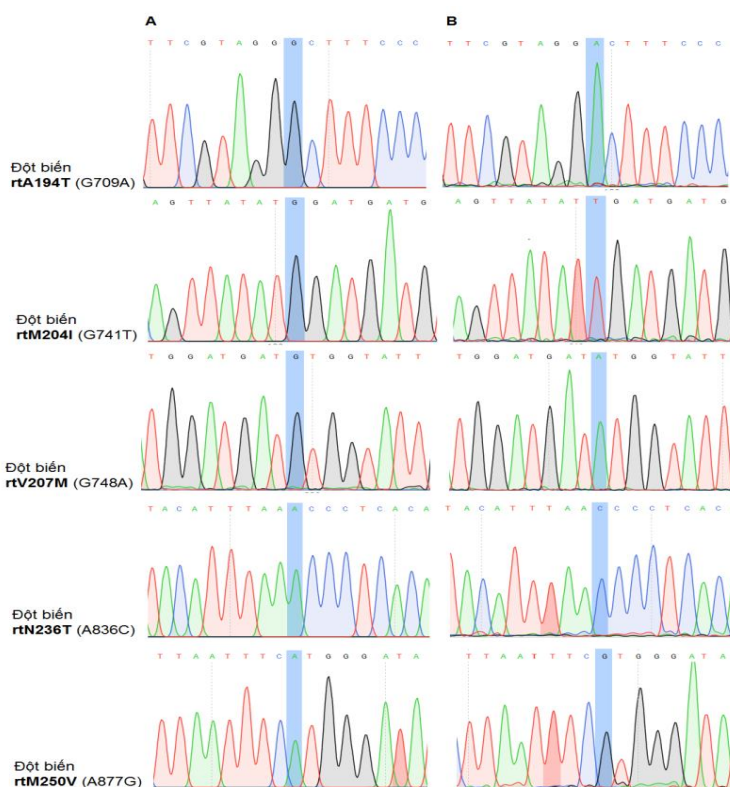
Bảng 2. Thông tin bệnh nhân tham gia nghiên cứu

Đặc điểm	Trẻ em			Người lớn		
	N = 30	Min - max	Trung bình	N = 20	Min - max	Trung bình
Tuổi (min - max)		0,1 - 18,2	4,92		23 - 63	38,7
Giới						
Nam	19			14		
Nữ	11			6		
ALT(IU/L)		18,9 - 889,4	125		225,1 - 666	125,7

Đặc điểm	Trẻ em			Người lớn		
	N = 30	Min - max	Trung bình	N = 20	Min - max	Trung bình
AST(IU/L)		21,3 - 1919,8	143		27,3 - 937	155,6
HBeAg (+/-)						
Dương tính	28			16		
Âm tính	2			4		
Tải lượng HBV (IU/mL)			10 ⁶ - 10 ⁹ 10 ⁷			10 ² - 10 ⁹

Ghi chú: Các chữ viết tắt: ALT, Alanine Amino Transferase; AST, Aspartate Amino Transferase; IU, đơn vị quốc tế; HBeAg, Kháng nguyên HBV; HBV, hepatitis B virus,

2. Plasmid chứa gen thể đại và gen mang đột biến điểm



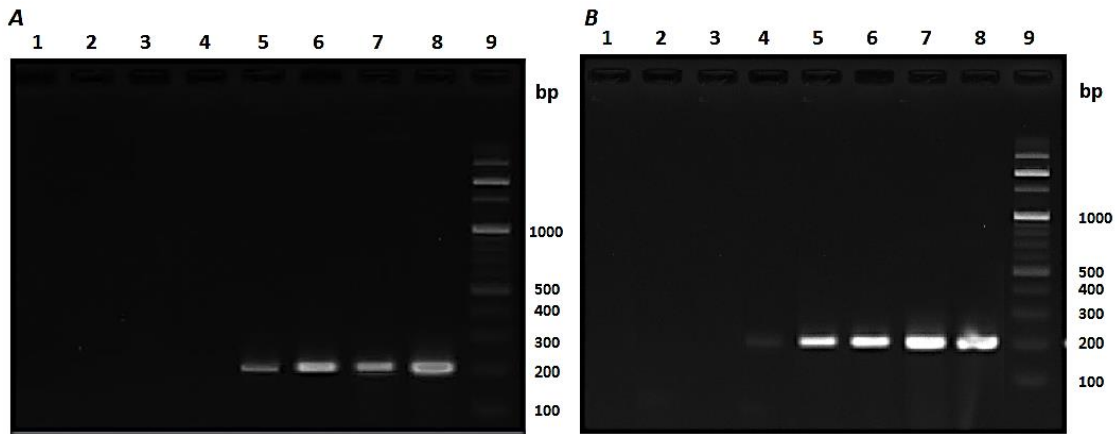
Hình 1. Peak trình tự DNA của các sản phẩm PCR nhân bản từ plasmid mang đoạn gen thể đại và đột biến.

(A) Các trình tự thể đại; (B): các trình tự đột biến tại các điểm tương ứng rtA194T (G709A), rtM204I (G741T), rtV207M (G748A), rtN236T(A836C), và rtM250V(A877G). Vị trí đột biến thay thế nucleotide được đánh dấu trên nền màu xanh.

Các plasmid chứa gen thể dại và đột biến được kiểm tra sự có mặt của đoạn gen chèn vào bằng PCR kết hợp giải trình tự sử dụng các cặp mồi thiết kế đặc hiệu cho từng vùng chứa đột biến đại diện được trình bày ở bảng 1, Kết quả giải trình tự của 5 mẫu đột biến và 1 mẫu thể dại ở hình 1 cho thấy trình tự của đoạn gen thể dại và đoạn gen mang đột biến chỉ có sự khác biệt duy nhất ở một vị trí đột biến đúng như thiết kế, tương ứng rtA194T (G709A), rtM204I (G741T), rtV207M (G748A), rtN236T (A836C) và rtM250V (A877G), Như vậy, chúng tôi đã nhân dòng thành công đoạn gen thể dại và 2 đoạn gen chứa 5 đột biến như đã nêu ở trên để tạo bộ mẫu chuẩn đánh giá độ nhạy của COLD-PCR trong phát hiện tỷ lệ % quần thể đột biến,

3. Nhiệt độ biến tính tối hạn và chu trình nhiệt cho COLD-PCR

Nhiệt độ nóng chảy của vùng gen P1 dài 194 bp và P2 dài 198 bp lần lượt được xác định là 83,5°C và 81,5°C theo phương pháp đã được mô tả. Từ đó chúng tôi thiết lập giá trị T_x giao động trong khoảng nhiệt độ nóng chảy này để xác định nhiệt độ biến tính tối hạn T_c .



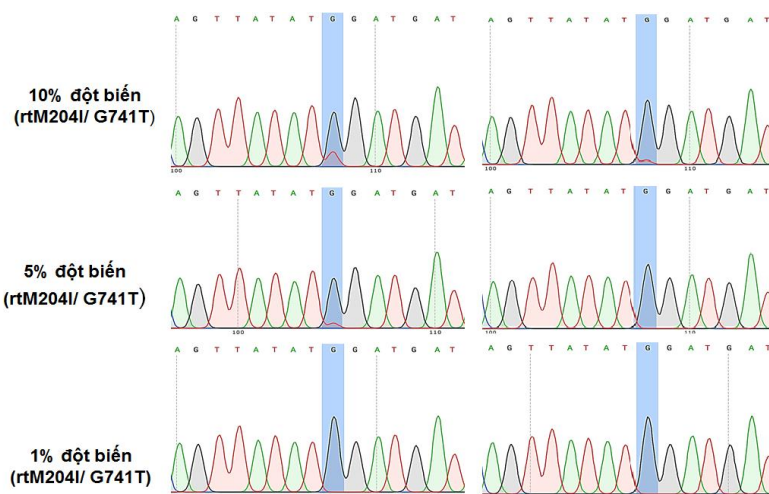
Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR gradient xác định nhiệt độ biến tính tối hạn trên 2 vùng gen P1 và P2.

(A): Vùng P1 nu 595 - 788; (B): Vùng P2 nu 732 - 929. Thứ tự giếng theo nhiệt độ biến tính. Giếng 1: đối chứng âm, giếng 2: 81°C, giếng 3: 81,5°C, giếng 4: 82°C, giếng 5: 82,5°C, giếng 6: 82°C, giếng 7: 82,5°C, giếng 8: 83°C, giếng 9: DNA 100 bp.

Kết quả ở hình 2 cho thấy băng sản phẩm PCR không xuất hiện bắt đầu từ nhiệt độ nhỏ hơn hoặc bằng 82°C đối với vùng gen P1 (hình 2A), nhỏ hơn hoặc bằng 81,5°C đối với vùng gen P2 (hình 2B). Do đó, 81,5°C được lựa chọn là nhiệt độ biến tính tối hạn cho COLD-PCR nhân bản P1 và P2 ở cùng một chu trình nhiệt, với hy vọng tại 81,5°C, các đoạn DNA sợi đôi heteroduplex tạo giữa sợi đơn thể dại và sợi đơn đột biến được ưu tiên nhân lên ở các chu kỳ PCR.

4. Xác định ngưỡng phát hiện của kỹ thuật COLD-PCR trên bộ mẫu chuẩn plasmid

Ngưỡng phát hiện của kỹ thuật PCR và COLD-PCR được xác định dựa trên bộ mẫu chuẩn hỗn hợp plasmid mang một loại đột biến nhất định rtL180M, rtA194T, rtM207V, rtN236T, và rtM250V và thể dại với tỷ lệ quần thể đột biến/thể dại lần lượt là 1%, 5%, và 10%.



Hình 3. Peak trình tự DNA chứa đột biến M204I ở mẫu chuẩn có tỷ lệ đột biến khác nhau được nhân bản bằng COLD-PCR (trái) và PCR (phải).

Vị trí đột biến nu 741 (G->T) được đánh dấu trên nền xanh da trời

Kết quả giải trình tự Sanger với mẫu chuẩn ở vị trí rtM204I (hình 3) cho thấy, đối với khuôn là mẫu chuẩn tỉ lệ 10% mt/wt, cả kỹ thuật COLD - PCR cải tiến và kỹ thuật PCR thông thường đều cho thấy sự xuất hiện của các peak đột biến (T) ở các vị trí nucleos(t)ide thể đại (G) tương ứng. Tuy nhiên, kỹ thuật COLD - PCR cho thấy tín hiệu nu (T) cao hơn hẳn so với kỹ thuật PCR thông thường. Tương tự với mẫu có tỷ lệ 5% mt/wt, COLD - PCR vẫn cho phép phát hiện được peak nhỏ tương ứng với đột biến ở nu (T) trong khi PCR chỉ thấy peak của nu (G). Ở tỉ lệ 1% mt/wt, cả 2 kỹ thuật đều chưa phát hiện được sự xuất hiện của đột biến. Kết quả tương tự như vậy cũng xảy ra với đột biến rtA194T (G709A), rtV207M (G748A), rtN236T (A836C) và rtM250V (A877G). Như vậy, ngưỡng phát hiện của kỹ thuật COLD - PCR chúng tôi tối ưu được là 5%.

5. Thử nghiệm kỹ thuật COLD - PCR phát hiện đột biến kháng thuốc NAs trên các mẫu huyết thanh bệnh nhân viêm gan mạn tính

DNA hệ gen HBV được tách chiết từ mẫu huyết thanh của 50 bệnh nhân viêm gan B mạn tính được sử dụng làm khuôn cho việc phát hiện các đột biến điểm kháng thuốc NAs bằng cả 2 kỹ thuật PCR và COLD - PCR đã xây dựng ở trên. Kết quả phân tích trình tự đột biến trên vùng P1 - 2, P1 và P2 của mỗi mẫu bệnh được tổng hợp và trình bày ở bảng 3.

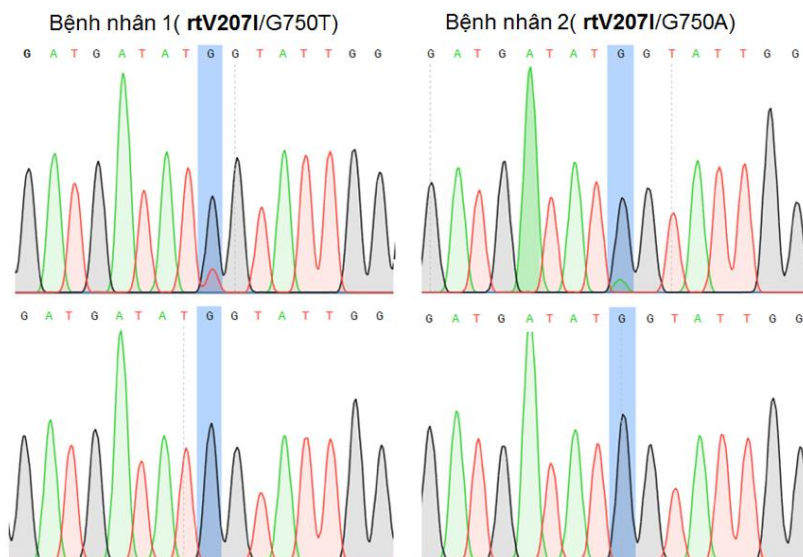
Bảng 3. Tính chất đột biến trên vùng gen rtHBV ở các mẫu huyết thanh được phát hiện bằng kỹ thuật COLD - PCR kết hợp giải trình tự gen

STT	Tổ hợp đột biến	Bệnh nhân trẻ em (n = 30)		Bệnh nhân người lớn (n = 20)		Phổ kháng thuốc			
		n	(%)	n	(%)	LMV	ADV	ETV	TDF
1	V207M	4	13,33	5	25	R	S	S	S

STT	Tổ hợp đột biến	Bệnh nhân trẻ em (n = 30)		Bệnh nhân người lớn (n = 20)		Phổ kháng thuốc			
		n	(%)	n	(%)	LMV	ADV	ETV	TDF
2	V173G	1	3,33	0	0	R	S	S	S
3	I187V*	2	6,67	4	20	S	S	S	S
4	N238T/A/K	11	36,67	3	15	S	R	S	S
5	V207M, V207I	2	6,67	0	0	R	S	S	S
6	V207M, I187V*	1	3,33	0	0	R	S	S	S
7	V207M, V207I, I187V*	1	3,33	2	10	R	S	S	S
8	V207M, V207I, M204I	0	0	1	5	R	S	I	S
9	V207M, L180M, M204I, V207I	1	3,33	0	0	R	R	I	S
Tổng mẫu có đột biến		23	76,67	15	71,43				
Tổng mẫu có đột biến kháng thuốc		21	70,00	11	52,38				

Chú thích: ADV, adefovir dipivoxil; ETV, entecavir; LMV, Lamivudine; TDF, Tenofovir; R (Resistant), kháng thuốc; I, (Intermediate), giảm hiệu quả của thuốc; S (Sensitive), nhạy cảm với thuốc; *đột biến làm giảm tốc độ sao chép của virus.

Từ kết quả trình bày ở bảng 3, có thể thấy mặc dù với số lượng mẫu khảo sát còn hạn chế (n = 50), chúng tôi nhận thấy vị trí rtV207 và rtN238 là các điểm thường xuyên xảy ra đột biến. Trên tổng số 38 bệnh nhân được phát hiện có đột biến thì có tới 32 bệnh nhân mang đột biến kháng thuốc gồm 21 bệnh nhân nhi và 11 bệnh nhân người lớn (chiếm tỷ lệ tương ứng 70% và 52,4% với mỗi đối tượng khảo sát khảo sát). Các trường hợp được phát hiện đột biến gồm: 9 mẫu đột biến rtV207M, 1 mẫu đột biến rtV173G kháng LMV, 14 mẫu đột biến rtN238A/K/T kháng ADV, 6 mẫu đột biến rtI187V làm giảm khả năng sao chép của virus, tương ứng 18% và 2%, 26% và 12% tỷ lệ mẫu đột biến/tổng số mẫu khảo sát; các mẫu đột biến kép gồm 4 mẫu chứa rtV207M và/hoặc rtV207I và/hoặc I187V kháng LMV, tương ứng 8%; 1 mẫu chứa tổ hợp rtM204I và rtV207M/I kháng LMV và giảm hiệu quả của ETV, tương ứng 2%; và 1 mẫu chứa tổ hợp rtL180M, rtM204I, rtV207M/I kháng đồng thời LMV, ADV, và giảm hiệu quả của ETV, tương ứng 2%.



Hình 4. Peak trình tự DNA chứa đột biến V207I (G750A và G750T) ở 2 mẫu huyết thanh được phát hiện bằng kỹ thuật COLD-PCR (hàng trên) mà không phát hiện được bằng kỹ thuật PCR (hàng dưới).

Đặc biệt, sự khác biệt giữa hai kỹ thuật được thể hiện trên 2 mẫu bệnh chứa đột biến kháng thuốc LMV mà tại đó COLD - PCR phát hiện được đồng thời đột biến rtV207M (G748A), và rtV207I (G750A/T), trong khi PCR thông thường chỉ phát hiện thấy đột biến rtV207M (hình 4). Với các đột biến còn lại, kết quả là tương đồng giữa 2 kỹ thuật, tuy nhiên với mẫu bệnh có tỉ lệ đột biến dưới 50% thì peak đột biến rõ ràng hơn ở mẫu nhân bản bằng COLD - PCR khi so sánh với PCR thông thường.

IV. BÀN LUẬN

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã xây dựng kỹ thuật COLD - PCR kết hợp với giải trình tự gen để phát hiện đột biến kháng thuốc nằm ở vùng RT của polymerase HBV (rtHBV) với ngưỡng phát hiện là 5% đột biến/quần thể, vượt trội hơn so với PCR truyền thống kết hợp với giải trình tự gen (ngưỡng phát hiện 10 - 20%). Nghiên cứu này đã giải quyết được hạn chế trong nghiên cứu của Liu và cộng sự (2014) về đoạn trình tự được nhân lên < 141 bp thuộc domain B - C nên bỏ sót các đột biến thuộc domain D - E như: rtN236T, rtN/H238A/K/T kháng ADV và rtM250I/V kháng ETV [5]. Kết

quả thử nghiệm bước đầu của kỹ thuật COLD - PCR trên 50 bệnh nhân cho thấy tỷ lệ đột biến liên quan tới tính kháng thuốc LMV và ADV ở 2 nhóm đối tượng bệnh nhân nhi chưa điều trị và bệnh nhân người lớn đã điều trị đều khá cao, lần lượt lên tới 70% và 52,4%. Các bệnh nhân nhi mang tỷ lệ đột biến khá cao như vậy có thể mắc phải có thể truyền từ mẹ sang con và các thông tin đột biến này góp phần quan trọng cho bác sĩ lâm sàng tư vấn điều trị. Tỷ lệ đột biến cao > 50% kháng LMV và ADV cũng được phát hiện trong nghiên cứu của Nguyễn Nghiêm Luật và cộng sự [6], nhưng cao hơn

so với tỷ lệ đột biến phát hiện trong một số nghiên cứu khác trên các mẫu huyết thanh có tải lượng HBV thấp hơn hoặc được lựa chọn ngẫu nhiên [7 - 9]. Sự đột biến kháng thuốc đa dạng và xảy ra ở nhiều điểm trong đó đột biến V207M (kháng LMV) và N238A/T (kháng ADV) là phổ biến nhất, ở cả đối tượng bệnh nhân nhi chưa qua điều trị và bệnh nhân người lớn đã qua điều trị thuốc. Những đột biến kháng LMV - ADF (M204I/+ - L180M) chiếm tỷ lệ 3,33% ở bệnh nhân nhi chưa qua điều trị và 5% ở các bệnh nhân đã/đang điều trị, tổ hợp đột biến này tồn tại trước tiếp cận liệu pháp ETV là nguyên nhân làm giảm hiệu quả sử dụng thuốc và làm tăng đột biến kháng ETV. Nghiên cứu của chúng tôi chưa phát hiện thấy trường hợp nào có đột biến điểm kháng ETV hay TDF, tương tự như báo cáo của Nguyễn Văn Dũng và cộng sự chưa phát hiện thấy trường hợp nào mang hai loại đột biến này trên 52 mẫu huyết thanh nhiễm HBV đang điều trị TDF [10]. Do ngưỡng phát hiện của kỹ thuật COLD - PCR được cải thiện, chúng tôi đã phát hiện được thêm 2 trường hợp bệnh nhân mang đột biến V207I quy định tính kháng LMV khi so sánh với PCR truyền thống. Tuy vậy, đây mới chỉ là nghiên cứu bước đầu áp dụng kỹ thuật COLD - PCR kết hợp giải trình tự để phát hiện đột biến kháng thuốc, và cần được thực hiện trên số lượng mẫu lớn hơn để khẳng định giá trị sử dụng của kỹ thuật này.

V. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã xây dựng kỹ thuật COLD - PCR cho phép làm giàu các đột biến kháng thuốc NAs với ngưỡng phát hiện là 5%, và bước đầu áp dụng kỹ thuật COLD - PCR trên các mẫu huyết thanh cho thấy hiệu quả phát hiện đột biến cao hơn kỹ thuật PCR truyền thống. Mặc dù nghiên cứu chỉ mới được thực hiện trên cỡ mẫu hạn chế và cần khảo sát ở cỡ

mẫu lớn hơn trong tương lai, kết quả cho thấy COLD - PCR kết hợp giải trình tự gen rất tiềm năng trong sàng lọc sớm các đột biến kháng thuốc, nhằm tư vấn thuốc điều trị phù hợp cho bệnh nhân.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 108.04 - 2017.307.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Lok A.S., Zoulim F., Locarnini S et al (2007).** Antiviral drug-resistant HBV: Standardization of nomenclature and assays and recommendations for management. *Hepatology*, **46**, 254 - 265.
2. **Karayiannis P. (2003).** Hepatitis B virus: old, new and future approaches to antiviral treatment. *J Antimicrob Chemother*, **51**, 761 – 785.
3. **Zoulim F. and Locarnini S. (2009).** Hepatitis B Virus Resistance to Nucleos(t)ide Analogues. *Gastroenterology*, **137**, 1593 - 1608.
4. **Li J., Wang L., Mamon H et al (2008).** Replacing PCR with COLD-PCR enriches variant DNA sequences and redefines the sensitivity of genetic testing. *Nature Medicine*, **14**, 579 – 584.
5. **Liu C., Lin J., Chen H et al (2014).** Detection of hepatitis B virus genotypic resistance mutations by coamplification at lower denaturation temperature-PCR coupled with Sanger sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, **52**, 2933 – 2939.
6. **Nguyễn Nghiêm Luật và cộng sự (2014)** Phát hiện các đột biến kháng thuốc của virus viêm gan B từ các bệnh nhân bị viêm gan B mạn ở miền Bắc Việt Nam. *Tạp chí Y học Việt Nam*, **421**, 158 - 163.

7. Nguyễn Thị Hải Yến, Nguyễn Thanh Bảo, Cao Minh Nga (2015). Phát hiện đột biến kháng thuốc của HBV trên bệnh nhân nhiễm HBV mạn tính chưa điều trị bằng kỹ thuật giải trình tự chuỗi. *Tạp chí Y học TP. Hồ Chí Minh*, **19**, 365 - 368.

8. Nguyễn Hùng Cường, Nguyễn Bảo Trân, Hoàng Thị Thanh Huyền (2013). Nghiên cứu tỉ lệ đột biến gen kháng thuốc của HBV ở đối tượng tiêm chích ma túy và gái mại dâm ở Hải Phòng. *Tạp chí Y- Dược học quân sự*, **6**, 57 - 63.

9. Đặng Mai Anh Tuấn, Võ Đức Xuyên An, Phạm Hùng Vân (2010). Tìm hiểu đột biến kháng Adefovir và lamivudine trên HBV tách chiết từ huyết thanh bệnh nhân viêm gan B mạn tính. *Tạp chí Y học TP. Hồ Chí Minh*, **4**, 287 - 293.

10. Nguyễn Văn Dũng, Trịnh Thị Ngọc, Nguyễn Thị Lan Anh (2016). Hiệu quả điều trị và đột biến kháng thuốc của virus viêm gan B trên bệnh nhân viêm gan virus B mạn điều trị bằng Tenofovir. *Tạp chí Y học lâm sàng*, **94**, 39 - 47.

Summary

MODIFICATION OF COLD-PCR FOR EARLY DETECTION OF NUCLEOSIDE ANALOGS DRUG-RESISTANCE MUTATIONS IN HEPATITIS B VIRUS

CO - amplification at Lower Denaturation temperature - PCR (COLD - PCR) method was modified to enrich rare mutations (mt) vs. wild types (wt) in a population during the amplification, thereby enabling detection of Nucleotide Analog (NA) resistant HBV mutations with high sensitivity of 5% mt/wt. Applying the modified method to test on 50 serum samples of patients with chronic hepatitis B infections (10^7 - 10^8 IU/ml), we found 38 samples having mutations, in which 32 samples having mutations associated NA drug - resistance. There were 24 samples containing single mutations including rtV207M and rtV173G associated to LMV resistance, rtN238A/K/T associated to ADV resistance; multiple mutations included: 4 samples containing multiple mutations including rtV207M/I - rtI187V associated to LMV resistance; rtM204I - rtV207M/I and rtL180M - rtM204I - rtV207M/I associated to LMV and ADV resistance and reduced ETV efficacy. On two samples containing LMV resistant mutations, COLD - PCR detected double rtV207M - rtV207I mutations whereas conventional PCR detected only single rtV207M mutations. In conclusion, COLD - PCR method is potential for early detection of drug - resistance mutations, thereby instructing appropriate treatment regimens for chronic hepatitis B patients.

Keywords: HBV, NAs, drug resistant mutations, COLD-PCR.