

# XÂY DỰNG KỸ THUẬT REAL-TIME COLD-PCR CÓ ĐỘ NHẠY CAO ĐỂ PHÁT HIỆN ĐỘT BIẾN *RTA194T* KHÁNG THUỐC TENOFOVIR ĐIỀU TRỊ VIÊM GAN B

Chu Văn Sơn<sup>1</sup>, Lê Thị Ngân<sup>3</sup>, Vũ Thiên Sơn<sup>1</sup>, Phạm Thị Hạnh<sup>1</sup>  
Nguyễn Minh Hằng<sup>2</sup>, Nguyễn Văn Dũng<sup>3</sup>, Vũ Bích Thảo<sup>3</sup>  
Nguyễn Phạm Anh Hoa<sup>2</sup>, Phùng Thị Bích Thủy<sup>2</sup> và Nguyễn Thị Vân Anh<sup>1</sup>✉

<sup>1</sup>Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

<sup>2</sup>Bệnh viện Nhi Trung Ương

<sup>3</sup>Bệnh viện Bạch Mai

Đột biến *rtA194T* trên vùng gen mã hóa cho enzym *RTase* của *HBV* được chứng minh có liên quan đến tình trạng kháng thuốc Tenofovir disoproxil fumarate (*TDF*) trong điều trị viêm gan B mạn tính. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xây dựng thành công kỹ thuật *real-time COLD-PCR* sử dụng *TaqMan LNA probe* có độ nhạy cao với tỷ lệ 0,1% đột biến/thể dại (*mt/wt*) để phát hiện sớm đột biến *rtA194T* ở bệnh nhân viêm gan B điều trị *TDF*. Kỹ thuật sau đó đã được thử nghiệm để phát hiện đột biến *rtA194T* trên 75 mẫu huyết thanh bệnh nhân viêm gan B mạn tính đã và đang điều trị với *TDF*, và kết quả là chúng tôi không ghi nhận trường hợp bệnh nhân nào mang đột biến *rtA194T*. Kết luận lại, kỹ thuật *real-time COLD-PCR* sử dụng *TaqMan LNA probe* có độ nhạy cao (0,1% *mt/wt*) với thời gian thực hiện nhanh trong vòng 3 giờ có tiềm năng ứng dụng trong việc sàng lọc sớm đột biến *rtA194T* liên quan tới kháng thuốc *TDF* để tư vấn và theo dõi hiệu quả việc điều trị thuốc *TDF* cho bệnh nhân viêm gan B trong tương lai.

**Từ khóa:** *HBV*, *rtA194T*, *real-time COLD-PCR*, *TaqMan LNA probe*, Tenofovir disoproxil fumarate (*TDF*)

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tenofovir disoproxil fumarate (*TDF*) là thuốc kháng virus mạnh được sử dụng phổ biến nhất trên toàn thế giới trong điều trị viêm gan B mạn tính.<sup>1</sup> Mặc dù *TDF* có hàng rào kháng thuốc cao, tuy nhiên gần đây một số nghiên cứu trên thế giới đã cho thấy bắt đầu xuất hiện tình trạng kháng *TDF* của *HBV*.<sup>2-4</sup> Đột biến thay thế alanine thành threonine ở vị trí 194 (*rtA194T-G709A*) trên vùng gen mã hóa cho enzym *RTase* của *HBV* được chứng minh là

có liên quan đến tình trạng kháng thuốc *TDF*.<sup>5</sup> Phát triển một kỹ thuật có độ nhạy cao giúp sàng lọc hay phát hiện sớm đột biến xuất hiện trong quá trình điều trị thuốc giúp bác sĩ lâm sàng có hướng xử trí tiếp theo phù hợp hơn.<sup>6,7</sup> Trong công bố gần đây của nhóm nghiên cứu chúng tôi, Phùng và cộng sự<sup>8</sup> đã phát triển kỹ thuật *COLD-PCR* kết hợp với giải trình tự gen Sanger DNA sequencing và ứng dụng thành công trong phát hiện các đột biến kháng thuốc trên bệnh nhân nhi chưa từng điều trị tại Việt Nam với độ nhạy của kỹ thuật đạt 5% (đột biến/kiểu dại). Mặc dù đây là phương pháp tối giản về chi phí và dễ triển khai, tuy nhiên khả năng ứng dụng trong xét nghiệm lâm sàng của kỹ thuật này phần nào bị hạn chế do thời gian thực hiện kéo dài và khó áp dụng trong xử lý đồng thời số lượng mẫu

Tác giả liên hệ: Nguyễn Thị Vân Anh,

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Email: vananhbiolab@gmail.com

Ngày nhận: 27/07/2021

Ngày được chấp nhận: 02/08/2021

lớn. Phương pháp real-time PCR sử dụng TaqMan LNA probe dạng cầu khóa (Locked Nucleic Acid: các nucleotide được bổ sung liên kết cộng hóa trị giữa vị trí 2' và 4' trên gốc đường) có nhiệt độ nóng chảy cao hơn nucleotide thông thường từ 2 - 8°C, do vậy được nhiều nhóm nghiên cứu phát triển ứng dụng trong phát hiện đột biến điểm với ưu điểm cho độ nhạy và độ đặc hiệu cao, có khả năng xử lý đồng thời số lượng mẫu lớn và quy trình đơn giản.<sup>9,10</sup> Trong nghiên cứu này, chúng tôi xây dựng kỹ thuật real-time COLD-PCR sử dụng TaqMan LNA probe kết hợp giữa làm giàu có định hướng các đột biến hiếm trong quần thể bằng COLD-PCR và nhận biết chọn lọc với TaqMan LNA probe để tăng độ nhạy của phản ứng. Kỹ thuật được đánh giá về độ nhạy và áp dụng thử nghiệm sàng lọc đột biến *rtA194T* kháng thuốc TDF của HBV trên các mẫu huyết thanh của bệnh nhân viêm gan B mạn tính đã và đang điều trị với TDF.

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 1. Đối tượng

Tổng cộng 75 mẫu huyết thanh của bệnh nhân viêm gan B mạn tính đã và đang điều trị với TDF, có tải lượng HBV không giảm trong quá trình điều trị > 10<sup>6</sup> IU/mL (trung bình 10<sup>8</sup> IU/mL), hoặc đang giảm xuống thấp không phát hiện được mà sau đó lại tăng bất thường (> 10<sup>3</sup> IU/mL) được thu thập tại khoa Truyền nhiễm, khoa Khám bệnh theo yêu cầu, Bệnh viện Bạch Mai.

### 2. Phương pháp

*Phân tích chỉ số huyết thanh học:* Xét nghiệm chức năng gan: AST, ALT được thực hiện trên hệ thống máy sinh hóa tự động Cobas (Roche)

và máy AU 5822 (Beckman Coulter). Định lượng tải lượng HBV sử dụng bộ sinh phẩm COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®HBV Test trên hệ thống máy COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®Analyzer (Roche Diagnostics). Định lượng HBsAg: Xét nghiệm định lượng bằng kỹ thuật miễn dịch điện hóa phát quang ECLIA (ElectroCheluminescent Immunoassay), sử dụng bộ thuốc thử Elecsys HBsAg II Quant (Roche Diagnostics). Xét nghiệm định tính HBeAg bằng kỹ thuật miễn dịch điện hóa phát quang ECLIA (ElectroCheluminescent Immunoassay), sử dụng bộ thuốc thử HBeAg Elecsys (Roche Diagnostics). Kiểu gen HBV được xác định bằng kỹ thuật Sanger DNA sequencing.

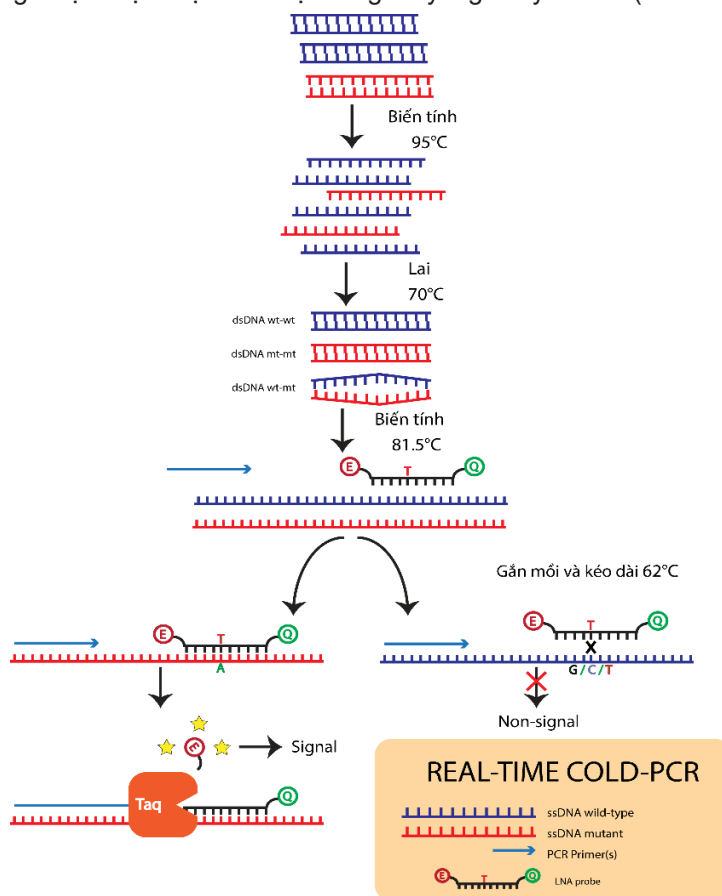
*Thiết kế các cặp mồi và TaqMan LNA probe đặc hiệu:* Cặp mồi khuếch đại đặc hiệu đoạn trình tự 194 bp chứa vị trí alanin/threonin 194 được mô tả trong công bố của Phung và cộng sự<sup>8</sup>, mồi xuôi 5' ACCCTGTATTCCCATCCCATC 3'; mồi ngược: 5' AGGGACTCAAGATGCTGTACA 3'. TaqMan LNA probe bắt cặp bổ sung với khuôn kiểu đại chứa vị trí alanin 194 (mã codon: GCT) với đầu 5' gắn chất nhuộm phát huỳnh quang fluorescent reporter dye 6-carboxyfluorescein (FAM) và đầu 3' gắn chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ, TaqMan LNA probe bắt cặp bổ sung với khuôn đột biến chứa vị trí threonin 194 (mã codon ACT) với đầu 5' gắn chất nhuộm phát huỳnh quang 6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein (HEX) và đầu 3' gắn chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ. Thông tin về trình tự TaqMan LNA probe được trình bày trong Bảng 1.

**Bảng 1. Thông tin trình tự TaqMan LNA probe phát hiện đột biến *rtA194T* kháng thuốc TDF của HBV**

TaqMan LNA probe	Trình tự (5' - 3')	Kích thước (bp)	Nhiệt độ nóng chảy T <sub>m</sub> (°C)
<i>rtA194</i> (wt)	FAM/TC+GTAGG+ <u>G</u> CTT+TCC/3IABkFQ	14	60,67
<i>rtA194T</i> (mt)	HEX/GTT+CGTAG+G+ <u>A</u> +CT+TTC/3IABkFQ	15	64,39

Ghi chú: Các LNA nucleotide được ký hiệu có "+" phía trước và nucleotide đột biến (mt) và kiểu dại (wt) được xác định bằng dấu gạch chân.

Xây dựng chu trình LNA probe real time COLD-PCR phát hiện đột biến *rtA194T* dựa trên các mẫu chuẩn: Chu trình COLD-PCR làm giàu đột biến hiếm của HBV đã được thiết lập bởi nhóm nghiên cứu.<sup>8</sup> Khi chuyển đổi chu trình này để phù hợp với kỹ thuật real-time COLD-PCR sử dụng TaqMan LNA probe giúp làm giàu và phát hiện tỷ lệ quần thể đột biến *rtA194T* kháng thuốc TDF của HBV, chúng tôi đã mô tả các bước cơ bản của kỹ thuật trong Hình 1. Chu trình nhiệt của phản ứng gồm: 95°C - 10 phút, 10 chu kỳ gồm 95°C - 15 giây, 62°C - 45 giây (không thu tín hiệu huỳnh quang) và 35 chu kỳ 95°C - 15 giây, 70°C - 90 giây (lai), 81,5°C - 15 giây, 62°C - 45 giây (thu tín hiệu huỳnh quang). Tất cả các phản ứng được thực hiện trên hệ thống máy Light Cycler 96 (Roche Diagnostics, Đức).



**Hình 1. Sơ đồ các bước của kỹ thuật real-time COLD-PCR làm giàu và phát hiện quần thể đột biến *rtA194T* kháng thuốc TDF của HBV**

Thực hiện PCR tiền khuếch đại làm giàu vật liệu khuôn ban đầu. Sau khi biến tính ở 95°C, các sản phẩm PCR được ủ ở 70°C để lai chéo tạo các dạng lai tạo DNA heteroduplex (sợi lai tạo mt-wt) và DNA homoduplex (sợi đôi wt-wt hoặc mt-mt). Nhiệt độ PCR được nâng lên nhiệt độ biến tính tới hạn 81,5°C (critical temperature-Tc) để ưu tiên biến tính các dạng sợi đôi DNA heteroduplex so với sợi đôi DNA homoduplex, tiếp đó hạ nhiệt độ xuống 62°C để TaqMan LNA probe chọn lọc bổ sung với sợi khuôn mt/wt tiếp đó sẽ bị phân hủy bởi DNA polymerase, phát ra tín hiệu huỳnh quang cho máy real-time PCR phân tích. Quy trình LNA probe real-time COLD-PCR ưu tiên khuếch đại và phát hiện đặc hiệu các đột biến hiếm.

**Xác định độ nhạy của kỹ thuật LNA probe real-time COLD-PCR:** Các plasmid tái tổ hợp chứa đoạn trình tự thể đại *rtA194T* (wt) và đột biến *rtA194T* (mt) được tổng hợp theo công bố của Phung và cộng sự<sup>8</sup>, sau đó trộn lẫn để chuẩn bị các mẫu plasmid hỗn hợp có tỉ lệ phần trăm đột biến/thể đại (mt/wt) lần lượt là 100%, 50%, 10%, 5%, 1%, 0,1% và 0% và được sử dụng làm khuôn cho phản ứng real-time PCR và real-time COLD-PCR để tính toán độ nhạy của phản ứng. Thành phần phản ứng gồm 5 µL hỗn hợp plasmid với các tỷ lệ khác nhau, TOPreal™ qPCR 2XPreMIX, 2 U HotTaq (Enzymomics, Hàn Quốc), 400 nM mỗi xuôi/ngược, 40 nM TaqMan LNA probe dạng đặc hiệu với wt (gắn huỳnh quang FAM) và dạng đặc hiệu với mt (gắn huỳnh quang HEX), và H<sub>2</sub>O vừa đủ cho thể tích 25 µL. Chu trình nhiệt của real-time PCR gồm 95°C- 10 phút, 5 chu kỳ gồm 95°C -15 giây, 62°C - 45 giây (không thu tín hiệu huỳnh quang) và 40 chu kỳ 95°C -15 giây, 62°C - 45 giây (thu tín hiệu huỳnh quang). Chu trình nhiệt của real-time COLD-PCR được thực hiện giống như đã mô tả ở mục trên.

*Phát hiện đột biến rtA194T trong mẫu huyết*

*thanh bệnh nhân bằng kỹ thuật LNA probe real-time COLD-PCR:* Các mẫu huyết thanh của bệnh nhân viêm gan B mạn tính đã và đang điều trị với TDF được sử dụng để tinh sạch DNA bằng kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Đức) và được sử dụng làm khuôn cho real-time COLD-PCR phát hiện quần thể đột biến *rtA194T* kháng thuốc TDF của HBV. Thành phần và điều kiện tiến hành phản ứng giống như mô tả ở mục trên, chỉ khác là thay vì 5 µL hỗn hợp plasmid chứa mt/wt thì 5 µL DNA tinh sạch của các mẫu huyết thanh được sử dụng. Phản ứng được thực hiện trên đĩa PCR 96 giếng có 01 đối chứng âm là nước cất và 02 đối chứng dương là hỗn hợp plasmid-wt ở tỷ lệ 100% và 0,1%.

### 3. Xử lý số liệu

Nhập và phân tích số liệu bằng phần mềm SPSS 22.0. Các phân tích mô tả: tỷ lệ phần trăm, giá trị trung bình và giá trị nhỏ nhất (min), giá trị lớn nhất (max), sai số chuẩn (standard error).

### 4. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu đã được thông qua Hội đồng Y đức số 39/BVNTW-VNCSKTE ngày 9/1/2019 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, kiểu gen HBV, thời gian điều trị thuốc và các chỉ số cận lâm sàng như nồng độ men gan (ALT, AST), HBV kháng nguyên (HBeAg/ HBsAg) và tải lượng HBV trong huyết thanh của bệnh nhân tham gia nghiên cứu được thu thập theo mô tả ở phần phương pháp và được tổng hợp ở Bảng 2.

Bảng 2. Thông tin bệnh nhân tham gia nghiên cứu

Đặc điểm	Số lượng n (%)	Min-max	Trung bình
Tuổi (Năm)		16 - 71	41
Nam/nữ	50/25 (66,7/33,3)		
ALT (IU/L)		9,2 - 3034,0	350,72 ± 63,97
AST (IU/L)		16,8 - 1896,0	259,21 ± 47,21
HBeAg (+/-)	53/22 (70,7/29,3)		
HBsAg định lượng (IU/mL)		$5,5 \times 10^3$ - $1,7 \times 10^5$	$1,2 \times 10^4$
Tải lượng HBV (IU/mL)		$1,4 \times 10^3$ - $2,7 \times 10^8$	$5,4 \times 10^8$
Kiểu gen B/C	52/23 (69,3/30,7)		
Thời gian điều trị TDF	Điều trị lần đầu (30), < 6 tháng (7), 6 -12 tháng (7), 13 - 24 tháng (12), 25 - 36 tháng (6), 37 - 48 tháng (4), 49 - 60 tháng (3), 61 - 72 tháng (1), > 72 tháng (5).		

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

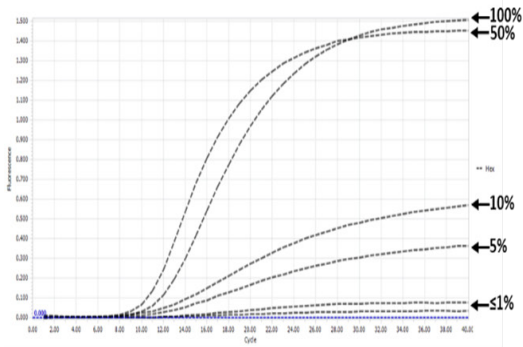
## 2. Xác định độ nhạy của kỹ thuật real-time COLD-PCR TaqMan LNA probe phát hiện đột biến *rtA194T*

Độ nhạy của kỹ thuật real-time COLD-PCR TaqMan LNA probe được xác định dựa trên bộ mẫu chuẩn là hỗn hợp plasmid mang đột biến *rtA194T* và thể đại với tỷ lệ mt/wt lần lượt là 0%, 0,1%, 1%, 5%, 10%, 50% và 100%, qua đó mẫu chuẩn có tỷ lệ % mt/wt thấp nhất cho tín hiệu huỳnh quang phân tích dương tính với giá trị chu kỳ ngưỡng ( $C_t$ ) và tín hiệu huỳnh quang bão hoà (Endpoint fluorescent signal-EPF) phân biệt rõ ràng với tín hiệu nền thì được kết luận là độ nhạy của kỹ thuật.

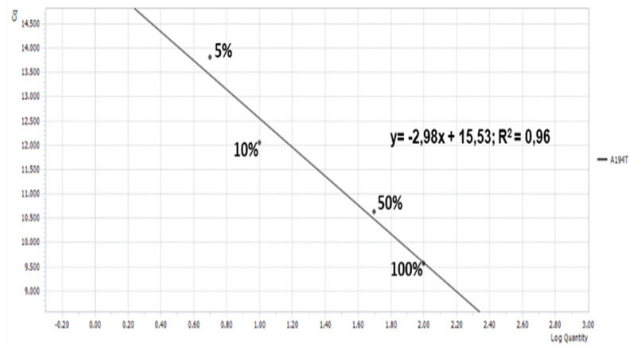
Kết quả tại Hình 2A1 và 2B1 cho thấy, đường biểu diễn tín hiệu khuếch đại HEX (mt) của phản ứng real-time PCR và real-time COLD-PCR với khuôn là mẫu chuẩn chứa đột biến với tỷ lệ mt/wt là 5%, 10%, 50% và 100% cho đường cong tín hiệu huỳnh quang khuếch đại rõ nét (dương tính) với giá trị xác định của chu kỳ ngưỡng ( $C_t \leq$

13,80) và tín hiệu huỳnh quang bão hoà (EPF  $\geq$  0,36). Trong khi đó, tín hiệu huỳnh quang không phát hiện thấy (âm tính) ở mẫu chuẩn kiểu đại (0% mt/wt). Tuy nhiên, với khuôn là mẫu chuẩn chứa đột biến với tỷ lệ mt/wt thấp xuống tới 1% và 0,1%, kỹ thuật real-time COLD-PCR cho tín hiệu khuếch đại dương tính với giá trị  $C_t$  tương ứng là 12,40 và 15,52, và giá trị EPF tương ứng là 0,51 và 0,29, trong khi đó không thu được tín hiệu khuếch đại với kỹ thuật real-time PCR. Ngoài ra, kết quả mô tả tại Hình 2B2 cho thấy có mối tương quan tuyến tính chặt chẽ giữ tỷ lệ mt/wt (%) và giá trị chu kỳ ngưỡng với hệ số tương quan  $R^2 = 0,99$  thể hiện tại đường chuẩn xây dựng với dải mẫu chuẩn chứa tỷ lệ mt/wt từ 0,1% - 100%, trong khi đó với dải tỷ lệ mt/wt (%) từ 5, 10, 50 và 100% kỹ thuật real-time PCR chỉ thu được mối tương quan tuyến tính với hệ số tương quan  $R^2 = 0,96$ . Như vậy, độ nhạy của kỹ thuật real-time COLD-PCR LNA probe phát hiện đột biến *rtA194T* tối ưu được trong nghiên cứu này là 0,1% mt/wt.

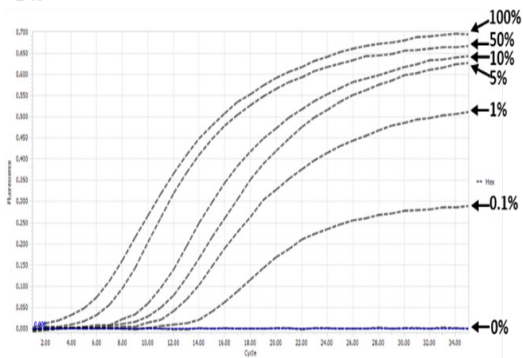
A1.



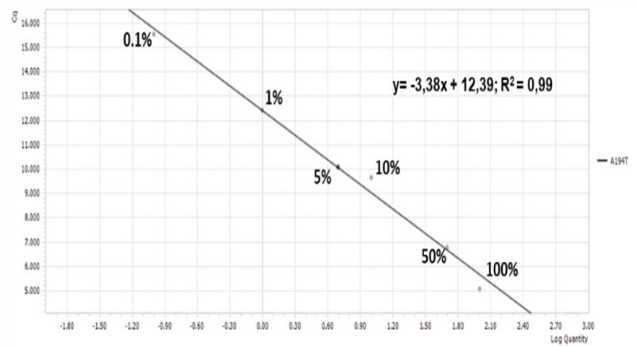
A2.



B1.



B2.

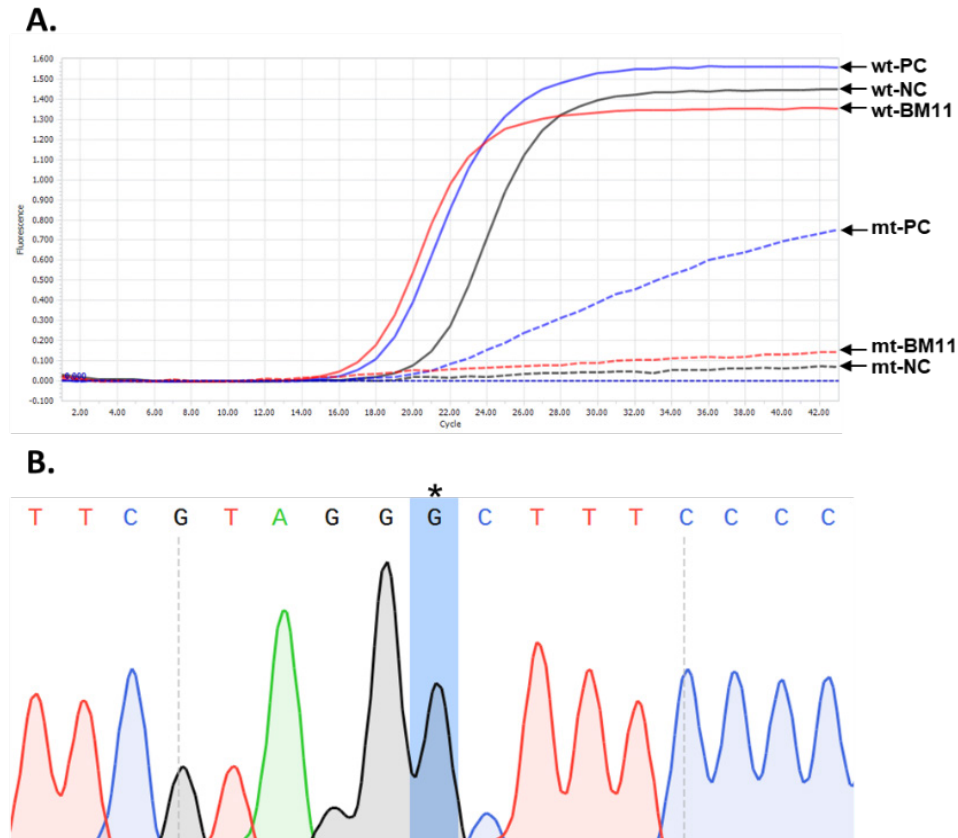


**Hình 2. Đường biểu diễn tín hiệu khuếch đại huỳnh quang HEX (bên trái) và đường chuẩn biểu diễn mối tương quan giữa tỷ lệ mt/wt (%) và giá trị chu kỳ ngưỡng (bên phải) của phản ứng real-time PCR (A) và phản ứng real-time COLD-PCR (B) sử dụng khuôn là mẫu chuẩn chứa hỗn hợp plasmid dạng thể đại và đột biến *rtA194T* với tỷ lệ % mt/wt khác nhau từ 0%, 0,1%, 1%, 5%, 10%, 50% đến 100%**

### 3. Ứng dụng kỹ thuật real-time COLD-PCR TaqMan LNA probe trong sàng lọc đột biến *rtA194T* trên các mẫu huyết thanh bệnh nhân viêm gan mạn tính điều trị với TDF

Thử nghiệm ứng dụng kỹ thuật real-time COLD-PCR đã được xây dựng trong nghiên cứu này để sàng lọc đột biến *rtA194T* trên 75 mẫu DNA tách chiết từ huyết thanh của bệnh nhân viêm gan B mạn tính điều trị bằng TDF trong đó có 30 bệnh nhân điều trị lần đầu, 7 bệnh nhân điều trị dưới 6 tháng, 7 bệnh nhân điều trị từ 6 tháng đến 1 năm, 18 bệnh nhân điều trị 1 - 3 năm và 13 bệnh nhân đã điều trị trên 3 năm, chúng tôi không phát hiện thấy bệnh nhân nào (0/75 bệnh nhân) mang đột biến *rtA194T*. Kết quả này cũng được xác nhận lại bằng phương pháp COLD-PCR kết hợp với giải trình tự gen Sanger DNA sequencing cho thấy vị trí G709 của tổng cộng 75 mẫu đều không bị đột biến thành A và vì vậy các mẫu này không mang đột biến *rtA194T*. Kết quả đại diện của một mẫu nghiên cứu trong số 75 mẫu được sàng lọc được trình bày ở Hình 3.





**Hình 3.** Kết quả sàng lọc đột biến *rtA194T* bằng kỹ thuật real time COLD-PCR và xác nhận lại bằng kỹ thuật COLD-PCR kết hợp giải trình tự gen sanger DNA sequencing. **A.** Tín hiệu khuếch đại (FAM-wt và HEX-mt) real-time COLD-PCR của bệnh nhân được mã hóa BM11, PC (đối chứng dương 0,1% mt/wt), NC (đối chứng âm, 100% wt); **B.** Kết quả COLD-PCR kết hợp giải trình tự gen sanger DNA sequencing tương ứng của bệnh nhân: vị trí nucleotide G709 (mã hoá cho Alanine194) được đánh dấu sao\*.

#### IV. BÀN LUẬN

TDF là thuốc kháng virus mạnh trong điều trị viêm gan B mạn tính (sau 1 năm điều trị HBV-DNA giảm > 6 log) với ưu điểm có hàng rào kháng thuốc cao. Đột biến *rtA194T* trên vùng gen mã hóa cho enzyme *RTase* của HBV đã được báo cáo là có liên quan đến tình trạng kháng thuốc TDF. Việc phát hiện sớm đột biến *rtA194T* ở các bệnh nhân chưa phơi nhiễm với thuốc hoặc đang điều trị TDF có dấu hiệu không giảm tải lượng HBV-DNA hoặc tăng nhanh bất thường giúp bác sĩ lâm sàng sớm có biện pháp thay thế kịp thời và nâng cao hiệu quả điều trị. Kỹ thuật giải trình tự gen Sanger DNA

sequencing được coi là tiêu chuẩn vàng trong phát hiện đột biến điểm với ưu điểm có khả năng phân tích đồng thời nhiều đột biến điểm trên vùng gen nhân bản, tuy nhiên hạn chế lớn nhất của phương pháp thời gian thực hiện và phân tích kết quả kéo dài 2 - 3 ngày cũng như độ nhạy của kỹ thuật còn hạn chế (chỉ có thể phát hiện alen đột biến với tỷ lệ > 20%). Kỹ thuật COLD-PCR cải tiến giải quyết được hạn chế về độ nhạy (độ nhạy lên tới 5% đột biến/quần thể), tuy nhiên hạn chế về thời gian thực hiện và phân tích kết quả chưa được giải quyết. Trong nghiên cứu này chúng tôi đã xây dựng kỹ thuật real-time COLD-PCR TaqMan LNA probe

để phát hiện đặc hiệu đột biến *rtA194T* với độ nhạy của kỹ thuật được xác định là 0,1% mt/wt, với thời gian thực hiện và phân tích kết quả chỉ trong 3 giờ, phương pháp này dễ áp dụng ở điều kiện các phòng xét nghiệm của Việt Nam vì thực hiện trên thiết bị sẵn có ở các khoa xét nghiệm của bệnh viện là máy real time PCR. Trong 75 mẫu bệnh nhân viêm gan B mạn tính điều trị với TDF được tiến hành sàng lọc, chúng tôi chưa ghi nhận trường hợp bệnh nhân nào mang đột biến *rtA194T*. Đây là thông tin đáng mừng vì kết quả này chứng tỏ thuốc TDF vẫn đang có hiệu quả điều trị rất tốt cho bệnh nhân viêm gan B ở Việt Nam và khả năng cao là chưa xuất hiện tình trạng kháng thuốc TDF trong quần thể người Việt Nam. Trong khi đó, một số nghiên cứu của các tác giả trên thế giới lại phát hiện tỷ lệ đột biến *rtA194T* tương đối cao. Có thể kể đến là nghiên cứu của Motahar và cộng sự<sup>11</sup>, Alacam và cộng sự<sup>12</sup> phát hiện tỷ lệ bệnh nhân mang đột biến *rtA194T* lần lượt là 13/64 (20,3%) và 10/318 (3,14%).

## V. KẾT LUẬN

Kỹ thuật real-time COLD-PCR TaqMan LNA probe có độ nhạy cao với tỷ lệ phát hiện 0,1% mt/wt, vì vậy có tiềm năng ứng dụng trong việc sàng lọc sớm đột biến *rtA194T* liên quan tới kháng thuốc TDF để tư vấn và theo dõi hiệu quả việc điều trị thuốc TDF cho bệnh nhân viêm gan B trong tương lai. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi không ghi nhận trường hợp bệnh nhân nào mang đột biến *rtA194T* cho thấy thuốc TDF vẫn có hiệu quả rất tốt trong điều trị viêm gan B tại Việt Nam.

## 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. World Health Organization. Guidelines for the Prevention Care and Treatment of Persons with Chronic Hepatitis B Infection. Geneva, Switzerland: *World Health Organization*; 2015.
2. Sharma V, Sharma R, Gaurav G. First Report of Primary Tenofovir Resistance in a Hepatitis B Viral Hepatitis Patient from India without Human Immunodeficiency Virus Co-infection. *J Liver Res Disord Ther.* 2016; 2(5): 37. doi:10.15406/jlrtd.2016.02.00037
3. Cho WH, Lee HJ, Bang KB, Kim SB, Song IH. Development of tenofovir disoproxil fumarate resistance after complete viral suppression in a patient with treatment-naïve chronic hepatitis B: A case report and review of the literature. *World J Gastroenterol.* 2018; 24(17): 1919 - 1924. doi:10.3748/wjg.v24.i17.1919
4. Park ES, Lee AR, Kim DH, et al. Identification of a quadruple mutation that confers tenofovir resistance in chronic hepatitis B patients. *J Hepatol.* 2019; 70(6): 1093 - 1102. doi:10.1016/j.jhep.2019.02.006
5. Rawal R, Konreddy A, Chu C. Mechanism of Adefovir, Tenofovir and Entecavir Resistance: Molecular Modeling Studies of How A Novel Anti-HBV Agent (FMCA) Can Overcome the Drug Resistance. *Curr Med Chem.* 2015; 22(34): 3922-3932. doi:10.2174/0929867322666150904144802
6. Liu C, Lin J, Chen H, et al. Detection of Hepatitis B Virus Genotypic Resistance Mutations by Coamplification at Lower Denaturation Temperature - PCR Coupled with Sanger Sequencing. *J Clin Microbiol.* 2014; 52(8): 2933-2939. doi:10.1128/JCM.01127-14
7. Wong DKH, Tsoi O, Huang FY, et al. Application of Coamplification at Lower Denaturation Temperature-PCR Sequencing for Early Detection of Antiviral Drug Resistance Mutations of Hepatitis B Virus. McAdam AJ,



ed. *J Clin Microbiol.* 2014; 52(9): 3209-3215. doi:10.1128/JCM.00343-14

8. Phung TTB, Chu SV, Vu ST, et al. COLD-PCR Method for Early Detection of Antiviral Drug-Resistance Mutations in Treatment-Naive Children with Chronic Hepatitis B. *Diagnostics.* 2020; 10(7): 491. doi:10.3390/diagnostics10070491

9. Sun Z, Zhou L, Zeng H, Chen Z, Zhu H. Multiplex locked nucleic acid probes for analysis of hepatitis B virus mutants using real-time PCR. *Genomics.* 2007; 89(1): 151-159. doi:10.1016/j.ygeno.2006.07.011

10. Truong H, Nguyen VA, Nguyen HL, Pham VA, Phan TN. Sensitive quantification

of mitochondrial mutation using new Taqman probes. *Cent Eur J Med.* 2014; 9(6): 839-848. doi:10.2478/s11536-013-0325-8

11. Motahar M, Arabzadeh SA, Mollaei H, Iranmanesh Z, Nikpour N, Soleimani F. Evaluation of HBV resistance to tenofovir in patients with chronic hepatitis B using ZNA probe assay in Kerman, southeast of Iran. *Asian Pacific J Trop Dis.* 2016; 6(7): 513-516. doi:10.1016/S2222-1808(16)61079-4

12. Alacam S, Karabulut N, Yolcu A, et al. Evaluation of drug resistance mutations in patients with chronic hepatitis B. *Folia Microbiol.* 2019; 64(2): 237-243. doi:10.1007/s12223-018-0650-z.

## Summary

# DEVELOPMENT OF HIGHLY SENSITIVE REAL-TIME COLD-PCR TAQMAN LNA PROBE ASSAY FOR DETECTION OF TENOFOVIR RESISTANT *RT-A194T* MUTATION IN CHRONIC HEPATITIS B

The *rtA194T* mutation on the gene coding for RTase of Hepatitis B Virus (HBV) has been reported to be associated with tenofovir disoproxil fumarate (TDF)-resistance in Chronic Hepatitis B (CHB). In this study, we successfully developed a novel real time COLD-PCR TaqMan LNA probe assay with high sensitivity of 0.1% (mutant/wild-type, mt/wt) for early detection *rtA194T* mutation in TDF-experienced patients with CHB. This assay was then applied in 75 serum samples, and as results no *rtA194T* mutation was found in any samples. In conclusion, the real time COLD-PCR TaqMan LNA probe assay with high sensitivity (0.1% mt/wt) and time-saving of 3 h performance is potential for early detection of *rtA194T* mutations, thereby providing a tool for consulting and efficient follow-up the efficacy of TDF treatment regimens for chronic hepatitis B patients in future.

**Keywords:** HBV, *rtA194T*, real-time COLD-PCR, TaqMan LNA probe, Tenofovir disoproxil fumarate (TDF)