

ĐỊNH LƯỢNG HBV DNA BẰNG KỸ THUẬT REALTIME PCR ĐỂ CHẨN ĐOÁN HBV VÀ THEO DÕI ĐIỀU TRỊ Ở BỆNH NHÂN VIÊM GAN MẠN CÓ DÙNG THUỐC KHÁNG VIRUS

*Lê Văn An¹, Ngô Việt Quỳnh Trâm¹, Huỳnh Hải Đường¹,
Nguyễn Chiên Thắng¹, Pietro Cappuccinelli²*

1. Bộ môn Vi sinh, Trường Đại Học Y Dược Huế

2. Đại học Sassari, Italia

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Hiện nay kỹ thuật realtime PCR được sử dụng thường quy ở nhiều phòng thí nghiệm cho mục đích chẩn đoán và theo dõi lượng HBV DNA trong quá trình điều trị kháng virus. Bằng kỹ thuật định lượng realtime PCR chúng tôi tiến hành xét nghiệm theo dõi lượng DNA của HBV ở những bệnh nhân viêm gan mạn có dùng thuốc kháng virus nhằm mục đích xác định nguyên nhân virus HBV ở bệnh nhân nhiễm trùng mạn HBV và khảo sát sự thay đổi lượng HBV DNA qua hai lần xét nghiệm theo dõi ở đối tượng bệnh nhân có dùng thuốc kháng virus. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Nghiên cứu được thực hiện trên 56 bệnh nhân nhiễm trùng HBV mạn tính với triệu chứng lâm sàng và xét nghiệm, những bệnh nhân này có dùng thuốc kháng virus trong thời gian xét nghiệm theo dõi. Thực hiện xét nghiệm realtime PCR theo kiểu TaqMan probe để xác định HBV DNA máu lần đầu và lần theo dõi cách nhau từ 6 đến 9 tháng. Ngưỡng xác định của kỹ thuật 3×10^2 bản sao/ml. Kết quả định lượng HBV DNA trong mẫu nghiệm được tính bằng lượng bản sao /ml. Phân tích kết quả của 2 lần xét nghiệm bằng phương pháp thống kê. **Kết quả:** Lượng HBV DNA lần 1 thay đổi từ 3×10^2 đến 10^{10} bản sao/ml, trong đó tỷ lệ bệnh nhân có lượng HBV DNA từ 10^8 đến 10^{10} bản sao/ml chiếm 30% (17/56), không có bệnh nhân nào có HBV DNA âm tính. Trong lần xét nghiệm thứ 2 có 23,2% (13/56) bệnh nhân không xác định được, tỷ lệ bệnh nhân có lượng HBV DNA cao từ 10^8 đến 10^{10} bản sao/ml giảm so với lần 1 còn 5,3% (03/56). Có 44 bệnh nhân (78%) giảm lượng HBV DNA ở lần xét nghiệm theo dõi so với lần 1 và 12 bệnh nhân (21,4%) tăng lượng HBV DNA, giảm lượng HBV DNA liên quan đến dùng các thuốc trung bình từ $2,3 \times 10^8$ bản sao/ml (adefovir) đến $4,2 \times 10^8$ bản sao/ml (lamivudine). Tăng lượng HBV DNA thay đổi từ $1,4 \times 10^8$ bản sao/ml (lamivudine) và $7,5 \times 10^7$ bản sao/ml (entecavir). **Kết luận:** Kỹ thuật realtime PCR cho phép định lượng được HBV DNA trong huyết thanh giúp xác định virus và theo dõi lượng HBV DNA trong quá trình sử dụng thuốc kháng virus.

Từ khóa: Realtime PCR, HBV DNA, viêm gan mạn do HBV, HBV.

Abstract

QUANTIFICATION OF HBV DNA BY REALTIME PCR FOR HBV DETECTION AND VIRAL LOAD FOLLOW-UP IN PATIENTS WITH CHRONIC B HEPATITIS USING ANTIVIRAL DRUGS

*Le Van An, Ngo Viet Quynh Tram, Huynh Hai Duong,
Nguyen Chien Thang, Pietro Cappuccinelli*

Background: Real-time PCR assay has been routinely used in many laboratories for HBV determination and follow-up of the HBV DNA levels in serum of chronic HBV patients

during antiviral therapy. We used a commercialized real-time PCR procedure based on TaqMan chemistry to quantify HBV DNA levels from patients with chronic HBV hepatitis for HBV detection and monitoring HBV DNA during antiviral drug using. **Materials and method:** This study was carried out in 56 patients with chronic HBV hepatitis using antiviral drugs. A commercialized real-time PCR assay based on TaqMan chemistry was used to quantify HBV DNA concentration in double serum samples from each patient, the first sample was collected at the first quantitative testing and the second sample was collected for a follow-up in 6 or 9 months of interval. The assay has a dynamic range from 3×10^2 copies/ml at minimum level to 10^{10} copies/ml. Sample testing was always run with triple dilutions of standard, the HBV DNA quantitations were analysed by Stratagene software and calculated in number of copies per ml of serum sample. **Results:** The HBV DNA levels in all the first serum samples had a wide range from 3×10^2 to 10^{10} copies/ml, of these first samples there were 30% (17/56) with the highest levels from 10^8 to 10^{10} copies/ml and there was no sample negative for HBV DNA. With the second serum samples, there were 23,2% (13/56) underdetectable for HBV DNA and the sample percentage with the highest HBV DNA levels was only 5,3% (3/56). The HBV DNA levels at the second serum samples were lower in 44 patients (78%) and were higher in 12 patients (21.4%) in comparison with that of the first samples. The average amounts of HBV DNA decrease in patients using antiviral drugs were $2,3 \times 10^8$ copies/ml with adefovir and 4.2×10^8 copies/ml with lamivudine, and the average numbers of HBV DNA increase were 1.4×10^8 copies/ml with lamivudine and 7.5×10^7 copies/ml with entecavir. **Conclusions:** Real-time PCR assay was found to be very useful in quantification of HBV DNA level in chronic HBV patients and also for monitoring the therapeutic effects of antiviral drugs.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh viêm gan virus B (HBV) là một bệnh phổ biến trên toàn cầu, tỷ lệ chuyển sang mạn tính cao, hậu quả thường dẫn tới xơ gan hay ung thư gan. Hiện nay trên thế giới có hơn 2 tỷ người nhiễm virus viêm gan B, hơn 360 triệu người mang virus viêm gan B mạn tính [7]. Viêm gan cấp do HBV thường có diễn tiến đến viêm gan mạn, ở người lớn có từ 10-15% đưa đến viêm gan mạn, ở trẻ em tỷ lệ này lên đến 70%. Ở một số quốc gia vùng Đông Nam Á, Tây Thái Bình Dương, Châu Phi tỷ lệ người nhiễm virus viêm gan B rất cao từ 5-20% [9].

Việt Nam là một quốc gia thuộc vùng dịch lưu hành cao của viêm gan B. Các số liệu thu thập được từ nhiều nghiên cứu cho

thấy tỷ lệ người mang HBsAg mạn tính vào khoảng 15-20% [2].

Định lượng HBV DNA trong huyết thanh bệnh nhân bằng kỹ thuật realtime PCR hiện được thực hiện ở nhiều phòng thí nghiệm của các bệnh viện và các trung tâm chẩn đoán. Xét nghiệm có giá trị không những để chẩn đoán nguyên nhân mà còn cho phép định lượng cung lượng virus/ thể tích máu. Lượng HBV DNA máu cung cấp một chỉ điểm rất quan trọng giúp các nhà lâm sàng có chỉ định và theo dõi điều trị kháng virus trong trường hợp viêm gan mạn do HBV.

Bằng kỹ thuật định lượng realtime PCR chúng tôi tiến hành xét nghiệm theo dõi lượng DNA của HBV ở những bệnh nhân viêm gan mạn có dùng thuốc kháng virus đến xét nghiệm với mục tiêu xác định

nguyên nhân virus HBV đồng thời khảo sát sự thay đổi lượng HBV DNA qua hai lần xét nghiệm theo dõi ở đối tượng bệnh nhân có dùng thuốc kháng virus.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện trên 56 bệnh nhân viêm gan mạn do virus HBV.

- Bệnh nhân chẩn đoán viêm gan mạn khi có đủ các tiêu chuẩn lâm sàng và xét nghiệm nêu dưới đây kéo dài trên 6 tháng

+ Lâm sàng: mệt mỏi, chán ăn, có vàng da kín đáo hay rõ, có gan lớn hoặc không

+ Có HBsAg dương tính, có HBV DNA dương tính, có HBeAg dương tính hoặc âm tính

+ Enzym transaminase bình thường hoặc tăng từ nhẹ đến cao

- Có sử dụng một liệu trình điều trị với thuốc kháng virus.

- Bệnh nhân có theo dõi xét nghiệm HBV DNA ít nhất 2 lần

- Thời gian xét nghiệm định lượng HBV DNA trong khoảng từ tháng 02 năm 2008 đến tháng 12 năm 2009.

Không nhận vào nghiên cứu bệnh nhân có đặc điểm sau: bệnh nhân không hợp tác nghiên cứu; bệnh nhân không có thông tin và các xét nghiệm theo yêu cầu; bệnh nhân có đủ tiêu chuẩn viêm gan mạn nêu trên kèm theo nghiện rượu, ung thư gan

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thu thập dữ liệu và lấy mẫu xét nghiệm

- Mỗi bệnh nhân đến xét nghiệm được lập 1 phiếu theo dõi để thu thập các dữ kiện cá nhân và lịch sử bệnh, dùng thuốc và xét nghiệm, lấy bệnh phẩm lần đầu để xét nghiệm HBV DNA, đề nghị làm các xét nghiệm HBsAg, HBeAg, enzym transaminase huyết thanh

- Khi bệnh nhân đến xét nghiệm theo dõi lần 2, thu thập các dữ liệu về diễn tiến bệnh, thuốc kháng virus và phương thức dùng

trong thời gian sau xét nghiệm lần 1, lấy mẫu nghiệm xét nghiệm HBV DNA lần 2, và đề nghị làm các xét nghiệm như lần 1.

Định lượng HBV DNA:

- Mẫu 3ml máu tĩnh mạch bệnh nhân không có chất chống đông, được tách huyết thanh bằng ly tâm không quá 2 giờ sau khi lấy. 100 μ l huyết thanh bệnh nhân được tách DNA theo phương pháp phenol/ chloroform với bộ sinh phẩm và quy trình của công ty công nghệ Việt Á [1], [3].

- Thực hiện kỹ thuật realtime PCR với bộ sinh phẩm realtime PCR chẩn đoán HBV của công ty công nghệ Việt Á. Cặp mồi thuận 5' TTCCTCTTCATCCTGCTGCTATGC 3', mồi ngược 5' GTGCTGGTTGTTGTTGATCCTGG 3', và đoạn dò TaqMan với chất màu như sau 5'-FAM-CTGGATTATCAAGGTATGTTGC CCGTTTGTCTC- TAMRA-3'. Các cặp mồi này nhằm khuếch đại và phát hiện đoạn gen 88bp trong vùng gen S [3].

- Thực hiện phản ứng trong ống PCR 0,2 μ l trong đó 20 μ l dung dịch phản ứng (chứa các thành phần phản ứng gồm dNTP, muối đệm, mồi thuận, mồi ngược, probe và Taq DNA polymerase); và 5 μ l dịch tách HBV DNA để có tổng thể tích cuối cùng 25 μ l. các mẫu nghiệm luôn được thực hiện song song với 3 mẫu dương tính chuẩn có nồng độ DNA được biết 10^6 , 10^4 , 10^2

- Thực hiện kỹ thuật trên máy realtime PCR của hãng Stratagene Mx 3000 với chương trình 95°C trong 5 phút, tiếp theo 40 chu kỳ với 95°C trong 15 giây, 60°C trong 1 phút và đọc kết quả ở bước này. Lượng DNA của mẫu nghiệm/ phản ứng được đọc với phần mềm của máy theo đơn vị lượng bản sao (copy). Lượng bản sao/ml = lượng bản sao của phản ứng x 100 (hệ số pha loãng) [3], [8].

Các xét nghiệm enzym transaminase được thực hiện ở bộ môn Sinh hóa ĐHY Dược Huế, HBsAg, HBeAg được thực hiện ở khoa Miễn dịch Đại học Y Dược Huế.

2.3. Xử lý số liệu

Số liệu được nhập với phần mềm excel, tính toán với phương pháp thống kê thông thường bằng tính tổng số, tỷ lệ và trị trung bình.

3. KẾT QUẢ

3.1. Kết quả định lượng HBV DNA qua 2 lần xét nghiệm

Nghiên cứu thực hiện trên 56 bệnh nhân

người lớn từ 15 tuổi đến 63 tuổi, độ tuổi trung bình chung của các đối tượng là 32,2 tuổi, trong đó trung bình của nam là 33,5 tuổi và của nữ là 30,2. Trong đó có 34 nam chiếm tỷ lệ 60% và 23 nữ chiếm tỷ lệ 40%.

Qua hai lần xét nghiệm định lượng DNA HBV ở các đối tượng khảo sát kết quả thay đổi về lượng DNA ở lần 1 và lần 2 được trình bày ở bảng 1

Bảng 1. Lượng HBV DNA của HBV qua 2 lần xét nghiệm ở bệnh nhân khảo sát

Lần 1			Lần 2		
Số lượng bản DNA/ml	số bệnh nhân	tỷ lệ %	Số lượng bản DNA/ml	Số bệnh nhân	tỷ lệ %
$> 10^8$ đến 10^{10}	17	30,4	$> 10^8$ đến 10^{10}	03	5,3
$> 10^6$ đến 10^8	11	19,6	$> 10^6$ đến 10^8	10	17,8
$> 10^4$ đến 10^6	18	32,2	$> 10^4$ đến 10^6	17	30,4
$> 3 \times 10^2$ đến 10^4	10	17,8	$> 3 \times 10^2$ đến 10^4	13	23,2
dưới ngưỡng	0	0	dưới ngưỡng	13	23,2
tổng số	56	100	tổng số	56	100

Bảng trên cho thấy ở lần xét nghiệm 1 số bệnh nhân có lượng DNA máu $> 10^8$ đến 10^{10} cao, và không có bệnh nhân nào âm tính. Trái lại trong lần xét nghiệm thứ 2 bệnh nhân có lượng DNA máu cao $> 10^8$ đến 10^{10} giảm chỉ còn 03 trường hợp (tỷ lệ 5,3%), và số bệnh nhân có lượng DNA trở nên âm tính là 13 (tỷ lệ 23,2%).

3.2. Sự thay đổi lượng HBV DNA ở bệnh nhân dùng thuốc kháng virus

Bảng 2. Các thuốc kháng virus sử dụng giữa 2 lần xét nghiệm

Loại thuốc kháng virus	Số bệnh nhân	Tỷ lệ %
Lamivudine	26	46,4
Adefovir	14	26,7
Entecavir	12	19,7
Dùng 2 thuốc *	4	7,2
Tổng số	56	100

* Bệnh nhân dùng 2 thuốc theo kiểu gồm lamivudine một thời gian rồi dùng tiếp adefovir hay adefovir một thời gian rồi ngừng thuốc này và tiếp entecavir.

Qua bảng trên tỷ lệ dùng lamivudine đứng hàng đầu 46,4%, rồi đến adefovir 26,7% và entecavir là 19,7%,

Bảng 3. Các thay đổi lượng HBV DNA của lần xét nghiệm 2 so với lần 1

Tổng số bệnh nhân	Thay đổi giảm		Thay đổi tăng	
	Số lượng	tỷ lệ %	Số lượng	tỷ lệ%
56	44	78,6	12	21,4

Đối chiếu lượng DNA của lần 1 và lần 2 kết quả cho thấy có 44 bệnh nhân chiếm tỷ lệ 78,6 % có giảm lượng DNA và 12 bệnh nhân với tỷ lệ 21,4 % có tăng lượng DNA của HBV.

Trong 44 bệnh nhân có giảm lượng HBV DNA, các thuốc kháng virus dùng và thời gian trung bình giữa hai lần xét nghiệm định lượng DNA như trình bày ở bảng

Bảng 4. Giảm lượng HBV DNA máu liên quan đến thuốc kháng virus và thời gian theo dõi

loại thuốc	Số bệnh nhân	Lượng giảm trung bình- bản sao/ml	thời gian xét nghiệm (X= tháng)
Lamivudine	19	$4,2 \times 10^8$	6
Adefovir	13	$2,3 \times 10^8$	6
Entecavir	8	$3,7 \times 10^8$	6
Dùng 2 thuốc *	4	$2,5 \times 10^6$	9
tổng số	44	-	-

Đối với 4 bệnh nhân dùng 2 loại thuốc kháng virus sau 9 tháng xét nghiệm lại thì lượng giảm trung bình HBV DNA là $2,5 \times 10^6$ /ml.

Trong 12 bệnh nhân có tăng lượng HBV DNA, các thuốc kháng virus đã dùng và thời gian giữa hai lần xét nghiệm như bảng 5

Bảng 5. Lượng HBV DNA tăng liên hệ đến dùng thuốc kháng virus và thời gian theo dõi

Loại thuốc	Số bệnh nhân	Lượng tăng trung bình - bản sao/ml	thời gian xét nghiệm (X= tháng)
Lamivudine	7	$1,4 \times 10^8$	6
Adefovir	1	10^3	6
Entecavir	4	$7,5 \times 10^7$	6
tổng số	12	-	-

4. BÀN LUẬN

4.1. Định lượng DNA của HBV:

Với phương thức realtime PCR định lượng DNA của HBV theo kiểu Taqman có thể được

dùng trên các hệ thống máy của nhiều hãng khác nhau, nhưng đa số các quy trình Taqman thường được phát triển trên các hệ thống máy ABI prism 7700 (Applied biosystems),

Stratagene Mx4000, GeneAmp 5700. Trong lúc với hệ thống máy LightCycler của Roche thường sử dụng phương thức chất huỳnh quang SYBR green hay FRET [6].

Quy trình realtime PCR định lượng DNA của HBV chúng tôi dùng trong nghiên cứu này do công ty thương mại Việt Á xây dựng và phát triển. Gen mồi và probe của quy trình nhằm khuếch đại và xác định đoạn gen 88 bp của vùng gen S trong bộ gen của HBV với ngưỡng phát hiện của quy trình này là 3×10^2 bản sao/ml (số liệu do công ty Việt Á cung cấp) [3]. So sánh với một số quy trình realtime PCR kiểu Taqman đã được công bố như Abe và các tác giả đã khuếch đại vùng gen đích 174bp trên máy ABI Prism 7700 và có ngưỡng phát hiện là 2×10^2 bản sao/ml [4], trong lúc với Ren Wei Chen và các tác giả lại khuếch đại vùng gen 120bp của gen C trên máy ABI prism 7700 thì có ngưỡng phát hiện là $3,73 \times 10^2$ bản sao/ml [5], một nghiên cứu khác của Zanella và các tác giả khuếch đại vùng gen 123bp của gen S trên máy GeneAmp 5700 có ngưỡng phát hiện là 10^2 bản sao/ml [6], từ các số liệu này chúng tôi cho rằng đây là quy trình có độ tin cậy và dùng để định lượng HBV DNA

Trong thực tế quy trình này đã được công ty VA đưa vào thương mại để chẩn đoán và định lượng DNA của HBV ở nhiều phòng thí nghiệm ở Việt Nam.

Qua hai lần xét nghiệm định lượng trên 56 đối tượng nghiên cứu ở bảng 1 cho thấy số lượng bệnh nhân có lượng HBV DNA cao 10^8 đến 10^{10} bản sao/ml trong xét nghiệm lần đầu là và ở lần thứ 2 tỷ lệ này chỉ còn 5,3%. Trái lại ở lần xét nghiệm thứ 2 số bệnh nhân có lượng HBV DNA dưới ngưỡng tăng cao 13 bệnh nhân (tỷ lệ 23,2%) so với lần thứ 1 không có bệnh nhân nào điều này cho thấy có một sự giảm thấp lượng HBV DNA của lần xét nghiệm thứ 2 so với lần xét nghiệm đầu.

4.2. Sự thay đổi lượng virus qua 2 lần xét nghiệm theo dõi:

Việc sử dụng thuốc kháng virus ở bệnh nhân trong nghiên cứu này do các thầy thuốc lâm sàng chỉ định theo phương thức điều trị ngoại trú, các dữ liệu về điều trị chỉ được thu tập bằng hỏi người bệnh lúc bệnh nhân đến xét nghiệm tại phòng thí nghiệm mà không được theo dõi và kiểm soát chặt chẽ. Vì vậy, các liệu trình dùng thuốc kháng virus của bệnh nhân chỉ được dùng như là một yếu tố làm giảm hoặc tăng lượng HBV DNA trong quá trình thực hiện xét nghiệm định lượng HBV DNA với kỹ thuật realtime PCR chứ không nhằm mục tiêu đánh giá hiệu quả của bất kỳ một liệu trình thuốc chống virus trên bệnh nhân.

Với kết quả định lượng HBV DNA ở bệnh nhân dùng thuốc kháng virus với thời gian theo dõi trung bình là 6 tháng thì phần lớn 78,6% bệnh nhân có giảm lượng HBV DNA và có 21,4% bệnh nhân có tăng lượng HBV DNA. Các lượng giảm hay tăng HBV DNA trung bình tương ứng với từng loại thuốc sử dụng trong nghiên cứu của chúng tôi được thực hiện theo dõi 1 lần kể từ lần xét nghiệm thứ nhất. Các nghiên cứu trong tương lai ở bệnh nhân viêm gan mạn do HBV nhận một liệu trình điều trị kháng virus được kiểm soát chặt chẽ và thực hiện định lượng HBV DNA theo dõi lặp lại nhiều lần bằng kỹ thuật realtime PCR trong khoảng thời gian dài 2-3 năm, sẽ dễ dàng giúp đánh giá hiệu quả của điều trị.

Nhiều nghiên cứu thực hiện theo dõi lượng HBV DNA máu bằng xét nghiệm realtime PCR mỗi 6 tháng đến 3 năm ở bệnh nhân viêm gan mạn điều trị với các thuốc kháng virus, trong đó liệu trình dùng thuốc ở bệnh nhân được kiểm soát và theo dõi một cách chặt chẽ, khi phân tích xu hướng giảm hay tăng lượng HBV DNA so với mức ngưỡng (HBV DNA 10^5 /ml), đồng thời với enzym gan trở về bình thường và cải thiện về tổn thương tổ chức học qua sinh thiết gan có thể đánh giá được hiệu quả của liệu trình kháng virus HBV ở bệnh nhân [7].

5. KẾT LUẬN

Dùng kỹ thuật realtime PCR để định lượng HBV DNA ở bệnh nhân viêm gan B mạn điều trị kháng virus cho thấy ở lần xét nghiệm đầu 100% bệnh nhân có HBV DNA dương tính với lượng thay đổi từ rất thấp 3×10^2 đến 10^{10} bản sao/ml. Xét

NGHIỆM theo dõi sau 6 tháng có 87,6% giảm lượng HBV DNA và 21,4% tăng lượng HBV DNA. Kết quả của nghiên cứu cho thấy định lượng HBV DNA bằng kỹ thuật realtime PCR rất có ích để chẩn đoán và theo dõi đáp ứng điều trị ở bệnh nhân viêm gan mạn do HBV

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ môn Vi sinh trường Đại học Y Huế (2006), Kỹ thuật PCR: Nguyên lý và quy trình thực hành chẩn đoán vi khuẩn lao, HBV, HCV, virus Dengue
2. Phạm Văn Linh, Trần Thị Minh Diễm (2005), Nghiên cứu tình hình nhiễm virus viêm gan B và C tại tỉnh Thừa Thiên Huế và đề xuất biện pháp dự phòng lây nhiễm cho cộng đồng, Đề tài cấp tỉnh, Trường Đại học Y Dược Huế.
3. Việt Á company – Tài liệu hướng dẫn thực hiện bộ kit realtime PCR chẩn đoán virus HBV và tài liệu hướng dẫn phân tích định lượng HBV với phần mềm của máy Stratagene Mx 3000
4. Abe A and co-authors (1999), Quantitation of Hepatitis B Virus Genomic DNA by Real-Time Detection PCR, Journal of Clinical Microbiology, Vol. 37, No. 9, p. 2899–2903.
5. Chen RW, Piiparinen H, Seppanen M, Koskela P, Sarna S, and Lappalainen M (2001), Real-Time PCR for Detection and Quantitation of Hepatitis B Virus DNA, Journal of Medical Virology 65:250-256
6. Espy MJ, Uhl J.R, Sloan L.M, Buckwalter S.P, Jones M.F, Vetter E.A, Yao J. D. C. , Wengenack N. L, Rosenblatt J. E, Cockerill III F. R. , and Smith T. F. (2006), Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing, Clinical Microbiology Reviews, Jan. 2006, Vol. 19, No. 1, p. 165–256
7. Keefe EB, Dieterich DT, Steven-Huy B. Han, Jacobson IM, Martin P, Schiff ER, Tobias H, and Wright TL (2006), A Treatment Algorithm for the Management of Chronic Hepatitis B Virus Infection in the United States: An Update, Clinical Gastroenterology and Hepatology Vol. 4: 1-27
8. Rebrikov DV and Trofimov DY (2006), Real-Time PCR: A Review of Approaches to Data Analysis, Applied Biochemistry and Microbiology, 2006, Vol. 42, No. 5, pp. 455–463.
9. WHO, Hepatitis B, WHO/CDS/CSR/ LYO/ 2002.2