

ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HỒ CHÍ MINH
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

☞★★★★★☞



Chủ đề:

**ỨNG DỤNG KỸ THUẬT REAL-TIME PCR SỬ
DỤNG DISPLACING PROBE ĐỂ CHẨN ĐOÁN
HIỆN TƯỢNG VIRUS HBV KHÁNG THUỐC
LAMUVIDINE Ở BỆNH NHÂN MẮC BỆNH VIÊM
GAN SIÊU VI B**

Sinh viên thực hiện: Đỗ Hữu Nhật

Giảng Viên: Nguyễn Ngọc Hải

Lớp: DH06SH

Mã số sinh viên: 06126104

Tp. Hồ Chí Minh, tháng 10/20

Đặt vấn đề:

Mặc dù chương trình tiêm ngừa vi rút viêm gan B (HBV) đã làm giảm đáng kể tỷ lệ bệnh viêm gan do vi rút B, nhưng HBV vẫn còn là một “tên sát nhân giấu mặt” vì đôi khi triệu chứng của bệnh rất mơ hồ làm cho ta lầm tưởng với một trường hợp rối loạn tiêu hóa hay gặp, và đa số trường hợp không có triệu chứng lâm sàng ở những trường hợp viêm gan vi rút B mãn tính mà chỉ có xét nghiệm máu chúng ta mới chẩn đoán được bệnh. Do đó, vai trò của xét nghiệm trong chẩn đoán viêm gan do vi rút B giữ một vai trò cực kỳ quan trọng. Có nhiều loại xét nghiệm khác nhau được sử dụng trong chẩn đoán viêm gan virus HBV, mỗi loại có một ý nghĩa khác nhau tùy vào từng giai đoạn của bệnh mà người bác sĩ sẽ lựa chọn xét nghiệm thích hợp.

Có 5 xét nghiệm hay được dùng trong chẩn đoán, đánh giá vi rút viêm gan siêu vi B trước đây là HBsAg, AntiHBs, HBeAg, AntiHBe, AntiHBc IgM và AntiHBc IgG. Các xét nghiệm này là những xét nghiệm cơ bản, dùng phương pháp miễn dịch để phát hiện nhưng vẫn có một số hạn chế.

Vào những năm cuối thế kỷ 20, kỹ thuật sinh học phân tử ra đời và có tốc độ phát triển nhanh chóng, đặc biệt là kỹ thuật PCR mà điển hình là Real-time PCR đã mở ra một kỷ nguyên mới về chẩn đoán gen nên chúng ta đã có thể chẩn đoán được vi rút viêm gan B ở mức độ phân tử (Đó là các xét nghiệm phân tích trên phân tử di truyền của HBV là DNA). Nhờ ứng dụng các kỹ thuật về phân tích DNA của HBV mà chúng ta có thể giải quyết được các hạn chế của các kỹ thuật miễn dịch kinh điển cũng như phân tích DNA vi rút giúp chúng ta có những cơ sở đánh giá tình trạng bệnh, khả năng diễn tiến của bệnh, theo dõi điều trị bệnh và lựa chọn phương thuốc điều trị thích hợp.

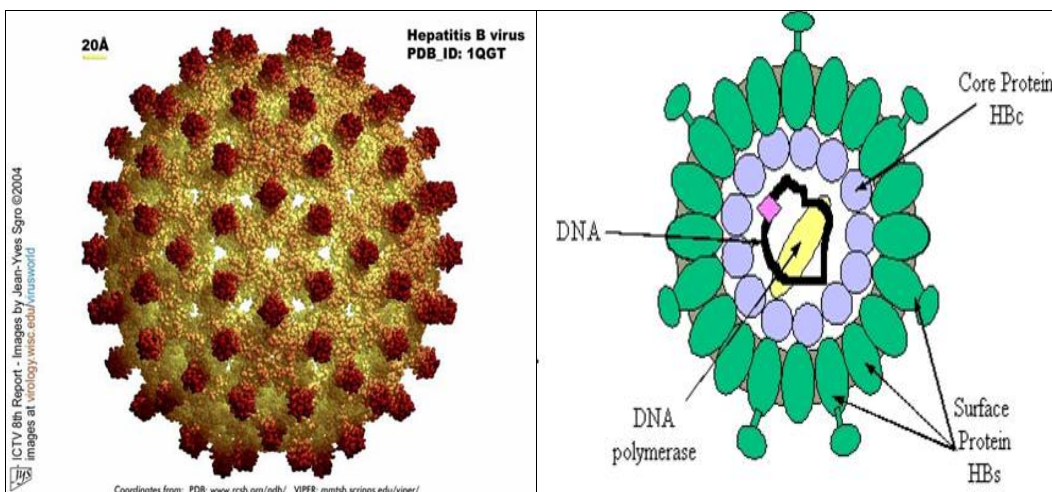
I.

TỔNG QUAN VỀ ĐỀ TÀI:

I.1 Tổng quan về virus HBV:

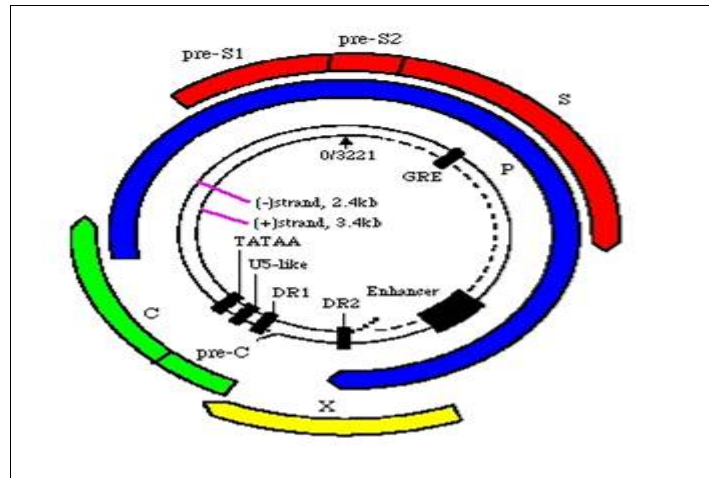
HBV thuộc loại siêu vi trùng (hay virus): Nhóm VII (**dsDNA-RT**) **Ho** (*familia*): **Hepadnaviridae**. **Chi** (*genus*): **Orthohepadnavirus**. **Loài** (*species*): **viêm gan B**. Có khả năng tồn tại cao. HBV bền vững với nhiệt độ :100 độ C virut sống được 30', ở -20 độ C sống tới 20 năm, HBV kháng ete (eter), nhưng bất hoạt trong formalin(fócmon).

Cấu tạo của virus HBV cũng giống đại đa số các virus khác. Chúng có lớp vỏ ngoài bằng protein, có chứa trên bề mặt nhiều kháng nguyên HBs, và cấu trúc DNA bên trong. HBV là chủng virus duy nhất có cấu trúc DNA có khả năng lây truyền qua đường máu.



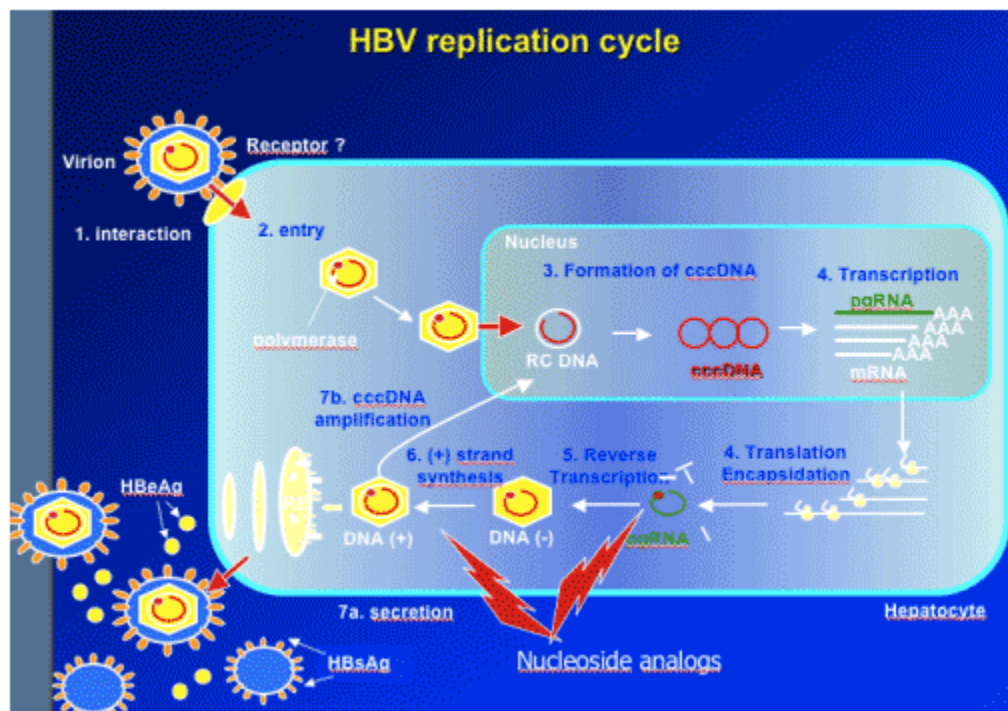
H1.1 Cấu trúc của virus HBv. Chuỗi DNA, Protein nhân HBc, Protein bề mặt HBs (phải)

Cấu trúc DNA của virus HBV là một chuỗi DNA có phân gập đôi khoảng 3,2 kbp. Chứa các gene cần thiết cho quá trình xâm nhập, sinh sản cũng như gây bệnh. DNA của BBV có khả năng bị đột biến cao khi lạm dụng thuốc điều trị, gây nên chứng kháng thuốc ở người bệnh mãn tính.



H1.2 Cấu trúc bộ gene của virus HBV

Cơ chế xâm nhập và nhân bản: virus HBV sẽ bám trên tế bào chủ thông qua một thụ thể trên màng tế bào. Sau đó bơm DNA vào trong tế bào chất. Tiếp đó, DNA của virus sẽ di chuyển vào nhân của tế bào chủ, sau đó nhân lên. Tiếp tục quá trình là sự phiên mã ra mRNA. mRNA sẽ đi ra ngoài tế bào chất, tiến hành tổng hợp các protein cần thiết cho sự tạo thành virus mới. Sau đó viruse sẽ thoát ra ngoài tế bào và tiếp tục chu trình mới.



H1.3 Cơ chế xâm nhập và nhân bản của HBV

1.2 Tổng quan về kĩ thuật Real Time PCR:

I.2.1 Định nghĩa:

Real Time PCR (RT PCR) là một kĩ thuật dùng để định lượng sự tích lũy DNA ngay khi phản ứng khuếch đại đang xảy ra.

I.2.2 Nguyên lí hoạt động:

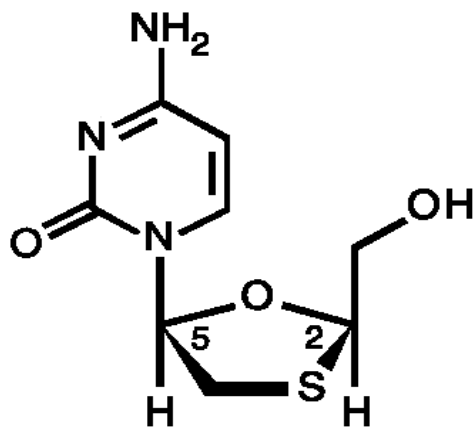
RT PCR có khả năng định lượng là nhờ sử dụng một loại phân tử phát huỳnh quang có tên gọi là Probe. Probe là một đoạn DNA có gắn phân tử phát huỳnh quang. Máy luân nhiệt có trang bị một bộ phận đặc biệt có khả năng nhận biết và đo lường các tín hiệu huỳnh quang. Tín hiệu huỳnh quang được đo lường và được phân tích, từ đó phản ánh được lượng DNA trong mỗi chu kỳ.



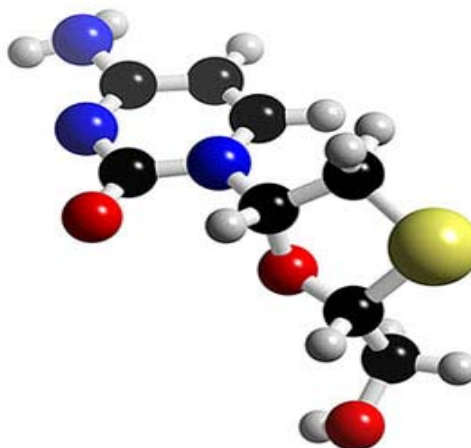
H1.4 Máy Real Time PCR

I.3 **Thuốc điều trị Lamivudine:**(tên biệt dược Zeffix)

Lamivudine là thuốc điều trị HBV đặc hiệu. Nó có công thức cấu tạo $C_8H_{11}N_3O_3S$ (4-amino-1-[(2R,5S)-2-(hydroxymethyl)-1,3-oxathiolan-5-yl]-1,2-dihydropyrimidin-2-one).



H1.5 Công thức cấu tạo của Lamivudine.



H1.6 Công thức cấu tạo 3D của Lamivudine.

Lamivudine thuộc nhóm thuốc Nucleosides analogues tức là nhóm có cấu trúc tương tự tương tự Purine hay pyrimidine, nó làm ngăn chặn quá trình tổng hợp DNA của virus bằng cách gắn kết vào DNA polymerase của Virus. Thuốc rất an toàn, dễ dung nạp và ít hại cho tế bào. Tuy nhiên khả năng làm mất cccDNA thì không bền vững, vì vậy phải duy trì thuốc trong thời gian dài.

Cơ chế tác động: Cơ chế tác động chủ yếu của Lamivudine bao gồm sự ức chế tổng hợp DNA virus. Tác động này xảy ra chủ yếu qua sự kết hợp vào HBV DNA vừa mới tổng hợp, gây kết thúc chuỗi tiến trình tổng hợp. Sự ức chế tương tranh trên DNA polymerase mã hóa DHBV cũng đã được chứng minh. Lamivudine là một chất ức chế cạnh tranh yếu trên DNA polymerase của tế bào người bệnh và không làm kết thúc chuỗi tổng hợp DNA của tế bào người bệnh. Lamivudine không ức chế trực tiếp sự tổng hợp protein của virus, tuy nhiên việc giảm tổng hợp protein virus là hậu quả của sự ức chế tổng hợp DNA virus. Nhất quán với cơ chế này, việc giảm HBeAg và HBsAg trong huyết thanh ở bệnh nhân xảy ra chậm hơn nhiều so với giảm virus trong máu. (HbeAg: kháng nguyên nội sinh nếu có trong máu bệnh nhân đang có khả năng lây rất cao. HbsAg: kháng nguyên bề mặt thuộc lớp vỏ của HBV - dùng trong xét nghiệm máu để biết có HBV trong cơ thể).

Zeffix cần có sự phosphoryl hóa nội bào để thể hiện tác động kháng virus. Vì vậy, khả năng kháng virus của nó liên hệ chặt chẽ với hàm lượng Zeffix triphosphate sản sinh trong tế bào nhiễm HBV. Khi ở trong các lympho bào máu ngoại vi, Zeffix được phosphoryl hóa thành dẫn xuất 5'-triphosphate ở các tế bào.

I.4 Nguyên nhân hiện tượng kháng thuốc Lamivudine:

Việc lạm dụng thuốc điều trị, cũng như việc sử dụng thuốc lâu dài ở các bệnh nhân viêm gan mãn tính gây ra hiện tượng kháng thuốc ở virus HBV. Đây là một hiện tượng nguy

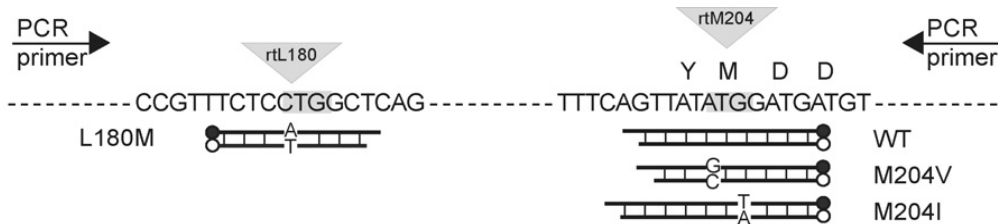
hiêm, làm giảm tác dụng của thuốc, đồng thời kéo dài thời gian điều trị có thể gây nhiều biến chứng nguy hiểm.

Sự kháng thuốc chủ yếu là do đột biến điểm gây nên. Đó là sự thay thế một acid amin nào đó ở vị trí codon trên chuỗi DNA. Người ta đã xác định được các đột biến điểm sau:

- Từ leucin thành methionin ở codon 180 (rtL 180M).
- Từ methionin thành valine hoặc isoleucine ở codon 204 (rtM 204V, rtM 204I)

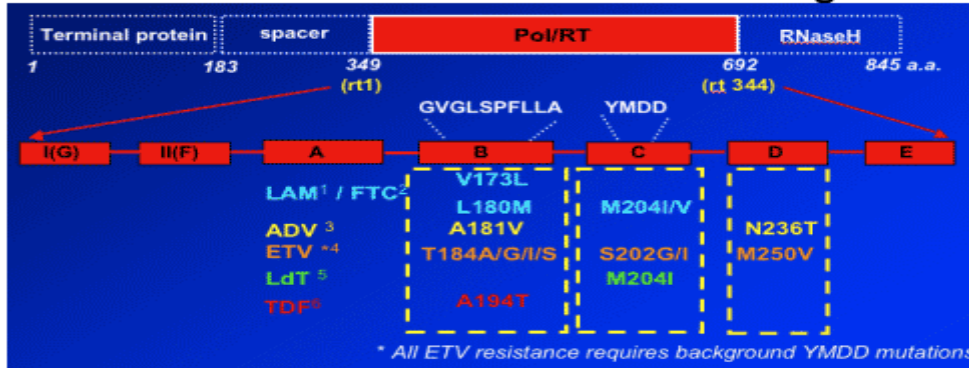
Từ những đột biến điểm này người ta phân ra làm ba nhóm virus kháng thuốc:

- rtM 204V kết hợp với rtL 180M.
- rtL 204I.
- rtM 204I và rtL 180M.



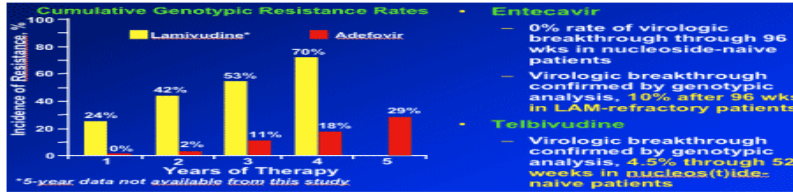
H1.7 Các đột biến điểm xảy ra gây nên hiện tượng kháng thuốc Lamivudine.

Identified Mutations Associated With Drug Resistance



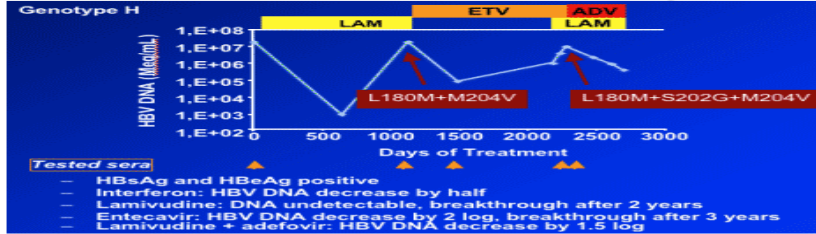
1. Allen et al. Hepatology. 1998; 27:1670-1677. 2. Gish et al. J Hepatol. 2005;43:60-66.
3. Qi et al. J Hepatol. 2004;40(Suppl 1):20-21. 4. Tenney et al. AAC. 2004;48:3498-3507. 5. Lai et al. Gastroenterology. 2005;129:528-536. 6. Sheldon et al. Antivir Ther. 2005;10:727-734.

H1.8 Tổng hợp các dạng đột biến trên virus HBV



1. Lai et al. Clin Infect Dis. 2003;36:687-96 2. Colonna et al. Hepatology 2004;40: 661A. 3. Xiong et al. EASL 2005. 4. Gish et al. AASLD 2005. Abstract 67146. 5. Sherman et al. AASLD 2004. Abstract 1152. 6. Chang et al Gastroenterology 2005.

Resistance in a Patient Treated Successively with LAM and ETV



Cross-Resistance Analysis

Several resistance mutations affect sensitivity to other drugs in laboratory analyses
 —Impact on treatment outcomes unclear

H1.9 Biểu đồ thể hiện sự kháng thuốc ở một bệnh nhân sử dụng Lamivudine và ETV

II. Nguyên lý và phương pháp:

II.1 Nguyên lý chung:

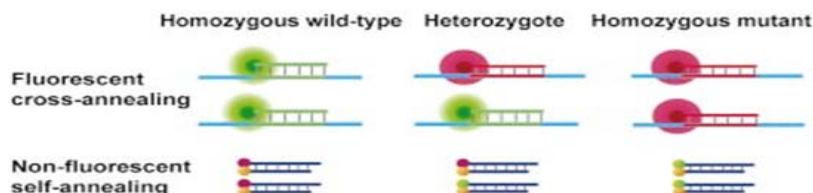
Sử dụng các probe có trình tự kết dính đặc hiệu với các đoạn chứa các đột biến kể trên. Khi vào chu trình nhiệt, các đoạn này sẽ được nhân lên, các displacing probe sẽ gắn kết đặc hiệu vào đoạn DNA cần phân tích, tín hiệu huỳnh quang sẽ được phát ra và được ghi nhận lại bằng máy huỳnh quang. Từ đó xác định được có hay không có sự kháng thuốc trong mẫu được phân tích.

II.2 Phương pháp thực hiện:

II.2.1 Probe:

Probe được sử dụng ở đây là Displacing probe. Là một mạch đôi oligonucleotic có trình tự đặc hiệu. Một mạch mang chất phát huỳnh quang ở đầu 5', một mạch mang chất nhận ở đầu 3'. Thông thường mạch mang chất phát huỳnh quang sẽ dài hơn so với mạch mang chất nhận. Khi ở trạng thái bắt cặp với nhau, chất hấp thụ sẽ liên kết với chất nhận, khi đó tín hiệu huỳnh quang bị hấp thụ bởi chất phát huỳnh quang hấp thụ, nên ta không nhận được tín hiệu huỳnh quang.

Trong bước bắt cặp, mạch ngắn của probe sẽ được tách ra, mạch dài sẽ được gắn vào trình tự đích trên chuỗi DNA mẫu. Và tín hiệu huỳnh quang được phát ra. Lượng tín hiệu huỳnh quang nhận được sẽ tỉ lệ thuận với số lượng trình tự đích có trong mẫu.



H Displacing Probe.

Displacing Probe sử dụng trong trường hợp này được đánh dấu bằng những chất nhận huỳnh quang khác nhau tương ứng cho mỗi đột biến cần nhận diện. Ở đây sử dụng các chất đánh dấu huỳnh quang sau đây:

- WT(wild type) được đánh dấu bằng **6-carboxyfluorescein (FAM)**.
- M204V, M204I(dạng đột biến) được đánh dấu bằng 6-carboxy-**2⁺,4⁺,5⁺,7⁺,7⁺-hexachlorofluorescein (HEX)**.
- L180M(dạng đột biến) được đánh dấu bằng **carboxy-X-rhodamine (ROX)**.

Probe này được sử dụng đồng thời với 2 primer khác. 2 primer này đảm trách nhiệm vụ kéo dài đoạn DNA cho tới khi các probe bắt cặp vào chuỗi mục tiêu.

Cấu trúc cũng như trình tự của các loại displacing probe được thể hiện ở hình dưới đây.

The sequences of the primer, probes, and oligonucleotides used for YMDD analysis

Primers, probes, and oligonucleotides	Sequence ^a
Primers used for real-time PCR analysis	
PF	5 ⁺ -CCTGTATTCCCATCCCATCATCT-3 ⁺
PR	5 ⁺ -TTGGTAACAGCGGCATAAAGGGACTC-3 ⁺
Primers used for DNA sequencing	
PSFW	5 ⁺ -TTCTTGTTGGTTCTTCTGGAC-3 ⁺
PSRV	5 ⁺ -TTGGTAACAGCGGCATAAAGGGACTC-3 ⁺
Probes	
WT	<p style="text-align: center;">5' - FAM - TCATCCATATAACT - PO₄ - 3'</p> <p style="text-align: center;">3' - DABCYL - AGTAGGTATATTTG - 5'</p>

M204V	$5' - \text{HEX} - \text{TCATCCACATAAC} - \text{PO}_4 - 3'$ $3' - \text{DABCYL} - \text{AGTAGGTGTATT} - 5'$
M204I	$5' - \text{HEX} - \text{TCATCATAATAACTG} - \text{PO}_4 - 3'$ $3' - \text{DABCYL} - \text{AGTAGTTATATGA} - 5'$
L180M	$5' - \text{ROX} - \text{TTCTCATGGCT} - \text{PO}_4 - 3'$ $3' - \text{DABCYL} - \text{AAGAGTACCG} - 5'$
Oligonucleotides	
WT	5 [*] -GGCTTTCAGTTATATGGATGATGTGGTTTTGG-3 [*]
M204V	5 [*] -GGCTTTCAGTTATGTGGATGATGTGGTTTTGG-3 [*]
M204I	5 [*] -GGCTTTCAGTTATATTGATGATGTGGTTTTGG-3 [*]
L180M	5 [*] -TAAACTGAGCCATGAGAAACGGACT-3 [*]
180T	5 [*] -TAAACTGAGCCAAGAGAAACGGACT-3 [*]
180C	5 [*] -TAAACTGAGCCAGGAGAAACGGACT-3 [*]

^a Blocked bases denote mutation sites.

II.2.2 Quá trình thực hiện:

II.2.2.1 Lý trích DNA từ mẫu:

Mẫu huyết thanh sau khi được thu về, người ta lấy 50μl đem đi ly trích và định lượng DNA của virus bằng HBV PCR-Fluorescence Test Kit (Talent Biotech, Xiamen, China). Sau đó người ta sẽ thu hồi lượng DNA đã ly trích và cho vào 50μl elution buffer.

II.2.2.2 Khuếch đại mẫu:

Là một bước vô cùng quan trọng quyết định sự chính xác của việc chẩn đoán. Sở dĩ có bước này để khắc phục hạn chế về ngưỡng phát hiện của kỹ thuật chẩn đoán. Nếu lượng DNA trong mẫu thấp dưới ngưỡng phát hiện thì sẽ cho ra kết quả âm tính giả. Vì vậy việc khuếch đại mẫu sẽ giúp việc phát hiện được chính xác và dễ dàng hơn.

Qui trình thực hiện:

Lấy 25μl dung dịch buffer đã chứa mẫu (khoảng 5μl DNA mẫu) trộn với 0,04 μM forward primer (Pf, bảng trên), 0,4μM reverse primer (PR, bảng trên), Và

4,0mM MgCl₂ trong một PCR master mix bao gồm 10mM Tris-HCl pH 8,6, 50mM KCl, 3,0 U Taq DNA polymerase, 600μM dNTPs.

Chu trình nhiệt sử dụng là:

- Khởi động chu trình bằng cách nâng nhiệt độ lên 95°C trong 3 phút.
- 10 chu trình trước khi khuếch đại dùng 94°C trong 10s, 55°C trong 20s, 72°C 20s
- 30 chu trình tương tự như trên.

II.2.2.3 Sử dụng Real-time PCR để xác định hiện tượng kháng thuốc:

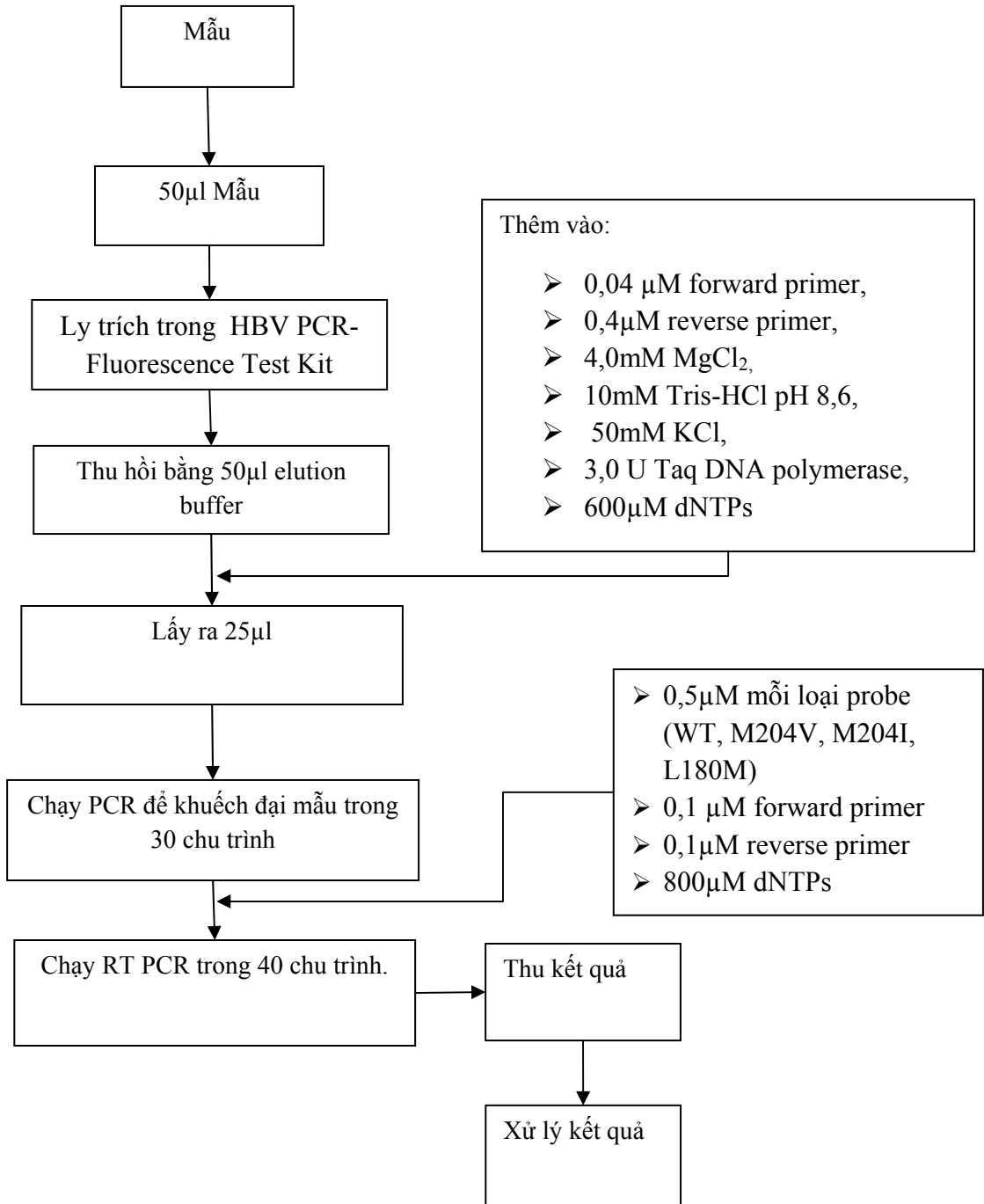
Sau bước khuếch đại mẫu ta tiếp tục quá trình chạy Real-time PCR để xác định mầm bệnh. Từ mẫu đã khuếch đại thêm vào 0,5μM mỗi loại probe (WT, M204V, M204I, L180M), 0,1 μM forward primer, 0,1μM reverse primer, 800μM dNTPs và làm tương tự như bước khuếch đại mẫu. Sau khi chạy tiếp 40 chu trình giống như trên.

Tiếp theo tới quá trình nhận tín hiệu huỳnh quang, qua 4 bước:

- Ba bước đầu được thực hiện : 94°C 10s => 55°C 20s => 72°C 20s
- Bước thứ 4 bắt đầu từ 39°C giảm xuống 34° với tốc độ giảm nhiệt là 0,3°C/s, và ngừng ở 34°C trong 18s. Lúc này ta tiến hành đo huỳnh quang phát ra.

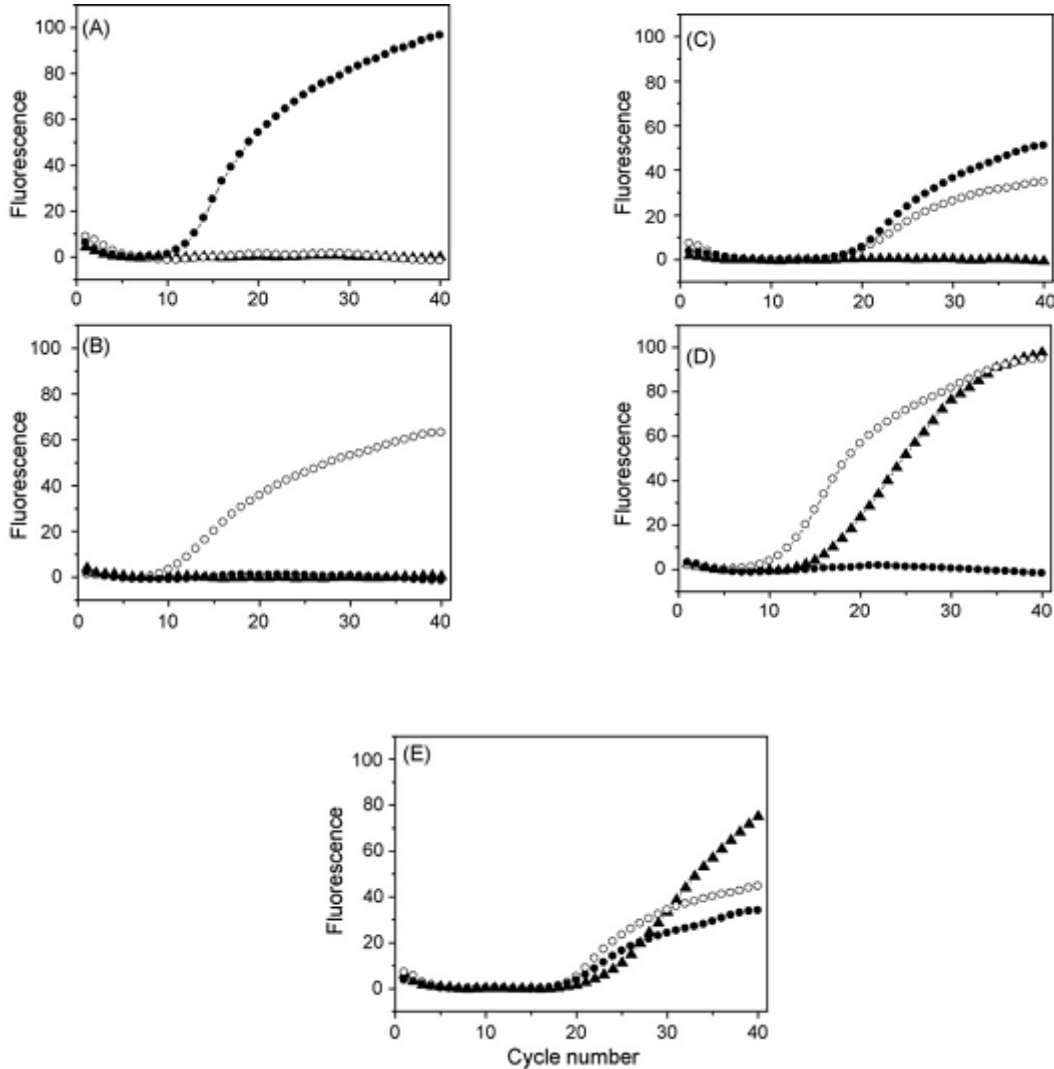
Sở dĩ phải đưa về 34°C vì huỳnh quang đo được tốt nhất ở 34°C (đối với những chất làm tín hiệu huỳnh quang trong trường hợp này). Từ đó ta thu được biểu đồ phát huỳnh quang của 4 loại probe kể trên. Từ đó có thể xác định được mẫu đó có chứa virus HBV kháng lại Lamivudine hay không.

Sơ đồ tổng quan các bước của chu trình Real-time PCR này:



II.2.3 Kết quả:

Sau khi chạy PCR và thu nhận tín hiệu huỳnh quang và xử lý tín hiệu thu được ta có thể nhận được các kết quả như sau:



H. Real-time PCR results obtained from five representative HBV sequences. (A) Wild-type; (B) rtM204V/rtM204I; (C) wild-type and rtM204V/rtM204I mixture; (D) rtM204V/rtM204I and rtL180M mixture; (E) wild-type, rtM204V/rtM204I, and rtL180M mixture. The fluorescence of each probe is indicated as follows: FAM (closed circles), HEX (open circles), ROX (closed triangles).

Ở hình A là kết quả thu được chỉ với loại WT không có đột biến. Tiếp theo, ở hình B chỉ có đột biến ở condon 204, tương tự ở hình C có chủng đột biến ở condon 204 và chủng không đột biến, hình D chứa cả 2 loại đột biến. Hình E có cả WT và 2 loại đột biến.

III. Ứng dụng thực tế và ưu nhược điểm của phương pháp:

III.1 Ứng dụng thực tiễn:

Hiện nay phương pháp Real-Time PCR đã và đang được áp dụng rộng rãi trong việc chẩn đoán nhiều bệnh liên quan tới virus nói chung và bệnh viêm gan B nói riêng. Đặc biệt là các bệnh viện tuyến đầu ở nước ta đều đã trang bị và thực hiện rất nhiều xét nghiệm cho bệnh nhân mắc phải Virus HBV.

Việc sử dụng Realtime PCR có thể phát hiện những đột biến nguy hiểm (đặc biệt là đột biến điểm) có thể gây ra những hậu quả nghiêm trọng cho người bệnh. Từ đó bác sĩ có thể đưa ra những liệu pháp trị liệu để có thể cứu được người bệnh.

Ngoài việc sử dụng cho HBV ra, Real time PCR còn có thể sử dụng cho rất nhiều loại virus hay vi khuẩn gây bệnh khác như virus gây viêm gan C, D, vi khuẩn lao... Bên cạnh khả năng xác định đột biến điểm RT PCR còn có khả năng định lượng giúp cho bác sĩ có cái nhìn tổng quan về tình trạng bệnh của bệnh nhân, từ đó đưa ra phương pháp trị liệu thích hợp.

III.2 Ưu nhược điểm của phương pháp:

III.2.1 Ưu điểm:

- Có thể xác định chính xác các đột biến điểm xảy ra.
- Có thể giúp xác định tình trạng bệnh bằng khả năng định lượng.
- Dễ thực hiện, giá thành khá rẻ (khoảng 300.000-400.000/ lần chạy).
- Độ nhạy cao.
- Độ chính xác cao.
- Thích hợp cho cả việc sử dụng cho chẩn đoán ban đầu trước khi áp dụng các phương pháp chẩn đoán khác.
- Có thể áp dụng rộng rãi cho nhiều chủng virus, vi khuẩn, nấm....
- Và đặc biệt có khả năng multidetection, phát hiện nhiều đột biến xảy ra trong cùng một lần chạy.

III.2.2 Nhược điểm:

- Nếu mẫu có nồng độ quá thấp, khi sử dụng phương pháp này sẽ cho kết quả sai lệch, do vậy cần phải qua một bước trung gian là khuếch đại mẫu.
- Phương pháp này vẫn còn gặp phải vấn đề các probe bắt cặp không đặc hiệu, gây sai lệch trong một số xét nghiệm. Tuy nhiên tỉ lệ này rất thấp (dưới 0,8%).
- Khó khăn trong việc thiết kế các probe đặc hiệu để hạn chế sự bắt cặp sai nói trên.

IV. Tổng kết lại:

Hiện tượng kháng thuốc của virus HBV là do các đột biến điểm tại các codon 180 và 204. Loại đột biến ở đây là đột biến thay thế.

Kỹ thuật phát hiện được ứng dụng ở đây là Real-time PCR sử dụng Displacing Probe. Và nó đã chứng tỏ được hiệu quả của mình. Đây là một trong những phương pháp phát hiện đang được áp dụng rộng rãi trên thế giới cũng như ở Việt Nam.

Sự ra đời của phương pháp này đã giúp hàng triệu người đang mắc phải căn bệnh này có thể tìm ra được những phương pháp điều trị tối ưu hơn. Và góp phần đẩy lùi căn bệnh này. Ngoài ra, RT PCR còn được áp dụng rộng rãi cho nhiều lĩnh vực, nhiều đối tượng khác.

Chính vì vậy, việc áp dụng nó là điều vô cùng cần thiết, nhất là trong việc chẩn đoán các bệnh liên quan tới virus, vi khuẩn, nấm... Tuy nhiên, dù kỹ thuật có tiên tiến tới đâu cũng không tránh khỏi những khó khăn và trở ngại cần phải giải quyết. Vì thế, cần phải có những nghiên cứu kỹ lưỡng hơn để giải quyết những bất cập này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. *Aberle SW, Kletzmayr J, Watschinger B, Schmied B, Vetter N, Puchhammer- Stockl E. Comparison of sequence analysis and the INNO-LiPA HBV DR line probe assay for detection of lamivudine-resistant hepatitis B virus strains in patients under various clinical conditions. J Clin Microbiol 2001;39:1972–4.*

2. Allen MI, Deslauriers M, Andrews CW, Tipples GA, Walters KA, Tyrrell DL, et al. Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. *Lamivudine Clinical Investigation Group. Hepatology* 1998;27:1670–7.
3. Allen MI, Gauthier J, DesLauriers M, Bourne EJ, Carrick KM, Baldanti F, et al. Two sensitive PCR-based methods for detection of hepatitis B virus variants associated with reduced susceptibility to lamivudine. *J Clin Microbiol* 1999;37:3338–47.
4. Bozdayi AM, Uzunalimoglu O, Turkyilmaz AR, Aslan N, Sezgin O, Sahin T, et al. YSDD: a novel mutation in HBV DNA polymerase confers clinical resistance to lamivudine. *J Viral Hepatitis* 2003;10:256–65.
5. Chayama K, Suzuki Y, Kobayashi M, Kobayashi M, Tsubota A, Hashimoto M, et al. Emergence and takeover of YMDD motif mutant hepatitis B virus during long-term lamivudine therapy and re-takeover by wild type after cessation of therapy. *Hepatology* 1998;27:1711–6.
6. Cheng J, Zhang Y, Li Q. Real-time PCR genotyping using displacing probes. *Nucleic Acids Res* 2004;32:e61.
7. Geng H, Hua B, Wang H, Cao Y, Sun Y, Yu A. Dual-probe assay for detection of lamivudine-resistance hepatitis B virus by real-time PCR. *J Virol Methods* 2006;132:25–31.
8. Jang H, Cho M, Heo J, Kim H, Jun H, Shin W, et al. Oligonucleotide chip for detection of Lamivudine-resistant hepatitis B virus. *J Clin Microbiol* 2004;42:4181–8.
9. Li Q, Luan G, Guo Q, Liang J. A new class of homogeneous nucleic acid probes based on specific displacement hybridization. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e5.
10. Lok AS, Zoulim F, Locarnini S, Mangia A, Niro G, Decraemer H, et al. Monitoring drug resistance in chronic hepatitis B virus (HBV)-infected patients during lamivudine therapy: evaluation of performance of INNO- LiPA HBV DR assay. *J Clin Microbiol* 2002;40:3729–34.
11. Pas SD, de Man RA, Fries E, Osterhaus AD, Niesters HG. The dynamics of mutations in the YMDD motif of the hepatitis B virus polymerase gene during and after lamivudine treatment as determined by reverse hybridisation. *J Clin Virol* 2002;25:63–71.

12. Pillay D, Bartholomeusz A, Cane PA, Mutimer D, Schinazi RF, Locarnini SA. Mutations in the hepatitis B virus DNA polymerase associated with antiviral resistance. *Int Antiviral News* 1998;167–9.
13. Punia P, Cane P, Teo CG, Saunders N. Quantitation of hepatitis B lamivudine resistant mutants by real-time amplification refractory mutation system PCR. *J Hepatol* 2004;40:986–92.
14. Sasaki T, Tahira T, Suzuki A, Higasa K, Kukita Y, Bba S, et al. Precise estimation of allele frequencies of single-nucleotide polymorphisms by a quantitative SSCP analysis of pooled DNA. *Am J Hum Genet* 2001;68:214–8.
15. Schuurman R, Demeter L, Reichelderfer P, Tijnagel J, de Groot T, Boucher C. Worldwide evaluation of DNA sequencing approaches for identification of drug resistance mutations in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Clin Microbiol* 1999;37:2291–6.
16. Syvanen AC. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nat Rev Genet* 2001;2:930–42.
17. Tsuchihashi Z, Dracopoly NC. Progress in high throughput SNP genotyping methods. *Pharmacogenomics J* 2002;2:103–10.
18. Wightman F, Walters T, Ayres A, Bowden S, Bartholomeusz A, Lau D, et al. Comparison of sequence analysis and a novel discriminatory real-time PCR assay for detection and quantification of Lamivudine-resistant hepatitis B virus strains. *J Clin Microbiol* 2004;42: 3809–12.
19. Whalley SA, Brown D, Teo CG, Dusheiko GM, Saunders NA. Monitoring the emergence of hepatitis B virus polymerase gene variants during lamivudine therapy using the LightCycler. *J Clin Microbiol* 2001;39:1456–9.
20. Wolford JK, Blunt D, Ballecer C, Prochazka M. High-throughput SNP detection by using DNA pooling and denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC). *Hum Genet* 2000;107:483–7.

