

Mối liên quan của nồng độ HBV-RNA huyết tương tại thời điểm trước điều trị với đáp ứng virus sau điều trị ở bệnh nhân viêm gan virus B mạn tính

Relationship between pre-treatment serum HBV-RNA levels with post-treatment virological response in patients with chronic hepatitis B

Nguyễn Đình Ứng*, Bùi Tiến Sỹ**,
Nguyễn Trọng Chính***,
Hồ Hữu Thọ*,***

*Học viện Quân y,
**Bệnh viện Trung ương Quân đội 108,
***Bệnh viện Quân y 103, Học viện Quân y

Tóm tắt

Mục tiêu: Xác định mối liên quan của nồng độ HBV-RNA huyết tương tại thời điểm trước điều trị đối với tình trạng đáp ứng virus sau 6 tháng điều trị tenofovir disoproxil fumarate (TDF). **Đối tượng và phương pháp:** 77 bệnh nhân viêm gan virus B mạn tính được thu thập máu ngoại vi tại thời điểm khi trước điều trị; sau 3 và 6 tháng điều trị. Phương pháp realtime RT-PCR được sử dụng để định lượng nồng độ HBV-RNA và HBV-DNA huyết tương. Phân tích dữ liệu bằng phần mềm Medcalc 20.019. **Kết quả:** Ở bệnh nhân HBeAg ban đầu dương tính ($n = 34$), giá trị tiên lượng của nồng độ HBV-RNA huyết tương trước điều trị đối với tình trạng đáp ứng virus sau 6 tháng ở mức khá tốt ($AUC = 0,77$; 95% CI: 0,59-0,89, $p < 0,05$); điểm cắt tối ưu là 6,17 log copies/ml; độ nhạy đạt 94,12% và độ đặc hiệu đạt 70,59%. Bệnh nhân có HBeAg dương tính và nồng độ HBV-RNA ban đầu thấp hơn 6,17 log copies/ml có khả năng đạt tình trạng đáp ứng virus sau 6 tháng cao gấp 9,90 lần so với những người còn lại. **Kết luận:** Nồng độ HBV-RNA huyết tương thời điểm trước điều trị là một yếu tố dự báo đối với tình trạng đáp ứng virus sau 6 tháng điều trị ở những bệnh nhân có HBeAg dương tính, được điều trị bằng TDF.

Từ khóa: Viêm gan virus B mạn tính, đáp ứng virus, HBV-RNA, tiên lượng, dự trị dự báo.

Summary

Objective: To determine the relationship of serum HBV-RNA levels at baseline for virological response after 6 months of tenofovir disoproxil fumarate (TDF) treatment. **Subject and method:** 77 treatment-naïve chronic hepatitis B patients were collected peripheral blood at baseline, after 3 and 6 months of treatment. Realtime reverse transcriptase polymerase chain reaction method was used to quantify serum HBV-RNA and HBV-DNA levels, and Medcalc 20.019 version software was used to analyze the collected data. **Result:** In HBeAg positive patients ($n = 34$), the predictive value of

Ngày nhận bài: 24/4/2023, ngày chấp nhận đăng: 18/5/2023

Người phản hồi: Bùi Tiến Sỹ, Email: tiensy2015@yahoo.com - Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

baseline serum HBV-RNA levels for virological response status after 6 months of treatment was quite good (AUC = 0.77; 95% CI: 0.59-0.89, $p < 0.05$); the cut-off value was 6.17 log copies/ml; sensitivity was 94.12% and specificity was 70.59%. Patients who were HBeAg positive and baseline HBV-RNA levels lower than 6.17 log copies/ml were 9.90 times more likely to achieve virological response at 6 months than the rest. *Conclusion:* Baseline serum HBV-RNA levels were a predictor of virological response status after 6 months of TDF treatment in HBeAg-positive patients who were treated with tenofovir disoproxil fumarate.

Keywords: Chronic hepatitis B, Virological response, VR, HBV-RNA, prognosis, predictive value.

1. Đặt vấn đề

Đáp ứng virus (Virological response - VR) ở bệnh nhân viêm gan virus B mạn tính (VGBMT) được điều trị bằng các thuốc đồng đẳng nucleoside/ nucleotide analogues (NAs) là tình trạng khi không phát hiện được HBV-DNA trong máu ngoại vi bằng xét nghiệm polymerase chain reaction (PCR) nhạy cảm, thường được thực hiện mỗi 3-6 tháng [1]. VR là điểm mấu chốt của tất cả các phương pháp điều trị hiện nay và có vai trò quan trọng trong việc đạt các mục tiêu của quá trình điều trị, bao gồm cải thiện khả năng sống cũng như chất lượng cuộc sống, ngăn chặn sự tiến triển của bệnh và hạn chế các biến chứng nguy hiểm như xơ gan và ung thư biểu mô tế bào gan.

Các xét nghiệm như HBV-DNA, HBsAg, HBeAg hoặc HBcrAg hiện được sử dụng phổ biến trong điều trị VGBMT, tuy nhiên chúng có giới hạn trong việc dự báo sớm đạt tình trạng VR khi điều trị bằng NAs. Nồng độ HBV DNA huyết tương thường giảm mạnh khi được điều trị bằng các thuốc thế hệ mới như entecavir hay tenofovir [2], nhưng dễ dàng phục hồi sau khi ngừng thuốc [3]. HBsAg thường được tạo ra một cách dư thừa trong máu ngoại vi, do đó đã làm giảm vai trò của nồng độ HBsAg trong các tiên lượng về sự nhân lên của HBV [4]. HBcrAg chủ yếu thể hiện vai trò khá tốt trong tiên lượng chuyển đảo

HBeAg huyết thanh và những thông số dương tính giả, âm tính giả của xét nghiệm cần được tiếp tục làm sáng tỏ [5]. Chính vì vậy, việc bổ sung những xét nghiệm mới đóng vai trò quan trọng góp phần cải thiện hiệu quả theo dõi điều trị và tiên lượng bệnh.

Gần đây, các nghiên cứu đã xác nhận HBV-RNA huyết tương có nguồn gốc từ HBV pregenomic RNA và có vai trò tiềm năng trong theo dõi đáp ứng điều trị, dự báo chuyển đảo HBeAg và tái hoạt động của virus sau khi ngừng thuốc NAs [6], [7]. Việt Nam là một trong những nước có tỷ lệ lưu hành HBV trong cộng đồng ở mức cao trên thế giới [8], tuy nhiên, hiện chưa có nghiên cứu đánh giá vai trò của HBV RNA đối với dự báo đáp ứng điều trị ở bệnh nhân VGBMT người Việt. Do vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này với mục tiêu: *Đánh giá khả năng dự báo của nồng độ HBV-RNA huyết tương trước điều trị đối với tình trạng VR ở những bệnh nhân VGBMT được điều trị bằng TDF.* Từ đó, giúp cung cấp thêm các thông tin về vai trò của dấu ấn HBV-RNA trên đối tượng người Việt Nam, làm cơ sở cho các nghiên cứu tương lai về ứng dụng của dấu ấn mới này trong thực hành lâm sàng.

2. Đối tượng và phương pháp

2.1. Đối tượng

Đối tượng là 77 bệnh nhân VGBMT điều trị tại Khoa Truyền nhiễm, Bệnh viện Quân y 103, Học viện Quân y; thời gian từ năm 2017 đến năm 2020. Tiêu chuẩn lựa chọn gồm: (1) BN được chẩn đoán xác định mắc bệnh VGBMT; (2) Bệnh nhân chưa từng được điều trị thuốc kháng virus; (3) Bệnh nhân được chỉ định sử dụng TDF; (4) Bệnh nhân đồng ý tham gia nghiên cứu. Tiêu chuẩn loại trừ gồm: (1) Phụ nữ đang mang thai hoặc cho con bú, trẻ em dưới 15 tuổi; (2) Bệnh nhân mắc các biến chứng nặng về gan như xơ hoặc ung thư gan; (3) Bệnh nhân bị đồng nhiễm HIV hoặc HCV; (4) Bệnh nhân có tiền sử dùng thuốc kháng virus; (5) Bệnh nhân không hợp tác.

Bệnh nhân được theo dõi trong vòng 6 tháng với 3 lần thu thập mẫu máu ngoại vi, tại thời điểm bắt đầu, sau 3; 6 tháng điều trị TDF.

2.2. Phương pháp

Thiết kế nghiên cứu: Sử dụng phương pháp tiến cứu và chọn mẫu theo phương pháp thuận tiện.

Định lượng HBV-RNA huyết tương: Sử dụng quy trình định lượng HBV-RNA huyết

tương, là sản phẩm của đề tài nghiên cứu mã số 01C-0808-2017-3 do Sở KH&CN Hà Nội tài trợ. Thông tin ngắn gọn: Quy trình dựa trên cơ sở phản ứng realtime RT-PCR, sử dụng cặp mồi đặc hiệu vùng gen S của HBV, thí nghiệm được thực hiện lặp lại hai lần cho mỗi mẫu bệnh phẩm, sử dụng hệ thống Rotor Gene Q (Qiagen). Ngưỡng phát hiện của phản ứng là 100 copies/ml.

2.3. Xử lý số liệu

Sử dụng phần mềm MedCalc version 20.019 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Bỉ). Sự khác biệt của các nhóm được đánh giá bằng các phép thử kiểm định phù hợp như Mann-Whitney hoặc t-Student. Phân tích đường cong ROC được sử dụng để xem xét giá trị dự báo của các yếu tố. Hệ số nguy cơ tương đối (Relative Risk) được tính toán để mô tả mức độ liên quan giữa các biến số.

2.4. Đạo đức nghiên cứu

Toàn bộ hồ sơ quy trình nghiên cứu đều được thông qua Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu Y sinh của Học viện Quân y, số 780/QĐ-HVQY ngày 28/03/2018.

3. Kết quả

3.1. Đặc điểm của đối tượng tham gia nghiên cứu

Bảng 1. Đặc điểm về tình trạng đáp ứng virus theo thời gian điều trị

| Thời điểm | | Nhóm HBeAg âm tính | Nhóm HBeAg dương tính | Chung | p |
|-------------|---------------|--------------------|-----------------------|-------------|------|
| T3 (n = 63) | Không đáp ứng | 24 (88,89%) | 34 (94,44%) | 58 (92,06%) | 0,64 |
| | Đáp ứng virus | 3 (11,11%) | 2 (5,56%) | 5 (7,94%) | |
| T6 (n = 59) | Không đáp ứng | 6 (24,00%) | 17 (50,00%) | 23 (38,98%) | 0,04 |
| | Đáp ứng virus | 19 (76,00%) | 17 (50,00%) | 36 (61,02%) | |

Nhận xét: Tỷ lệ bệnh nhân VR theo thời gian điều trị có xu hướng tăng dần. Bên cạnh đó, tỷ lệ bệnh nhân VR ở nhóm HBeAg dương tính thấp hơn so với nhóm HBeAg âm tính tại tháng thứ 6 ($p < 0,05$) nhưng không có sự khác biệt tại thời điểm tháng thứ 3 của quá trình điều trị.

Bảng 2. Mối liên quan giữa nồng độ HBV-RNA huyết tương đối với tình trạng đáp ứng virus tại tháng thứ 6 sau điều trị

| Chỉ tiêu đánh giá | Nhóm không VR (n = 23) | Nhóm VR (n = 36) | p |
|--|------------------------|------------------|------|
| HBV DNA (T0) (log copies/ml) | 6,67 ± 1,43 | 5,98 ± 1,37 | 0,07 |
| Tốc độ giảm HBV DNA (T0-T3) (log copies/ml/tháng) | 0,99 (0,65-1,44) | 1,12 (0,75-1,33) | 0,48 |
| HBV RNA (T0) (log copies/ml) | 6,29 (3,59-7,04) | 4,57 (3,16-5,43) | 0,02 |
| Tốc độ giảm HBV RNA (T0-T3) (log copies/ml/tháng) | 0,46 ± 0,46 | 0,42 ± 0,34 | 0,74 |

Nhận xét: Trong các yếu tố được xem xét, chỉ nồng độ HBV-RNA huyết tương thời điểm trước điều trị có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai nhóm bệnh nhân VR và không VR tại thời điểm sau 6 tháng điều trị ($p=0,02<0,05$).

Bảng 3. Mối liên quan giữa nồng độ HBV-RNA và HBV-DNA huyết tương trước điều trị với tình trạng đáp ứng sau 6 tháng, phân nhóm theo đặc điểm HBeAg T0 (n = 59)

| Chỉ tiêu đánh giá (log copies/ml) | HBeAg (T0) | Không VR (n = 23) | VR (n = 36) | p |
|---|---------------------|-----------------------------|------------------------------|------|
| HBV DNA T0 ($\bar{X} \pm SD$) | Dương tính (n = 34) | (n = 17) 6,81 ± 1,48 | (n = 17) 6,34 ± 1,27 | 0,31 |
| | Âm tính (n = 25) | (n = 6) (6,24 ± 1,30) | (n = 19) 5,67 ± 1,42 | 0,39 |
| HBV RNA T0 ($\bar{X} \pm SD$) (Median-IQR) | Dương tính (n = 34) | (n = 17) (6,01 ± 1,77) | (n = 17) 4,48 ± 1,49 | 0,01 |
| | Âm tính (n = 25) | (n = 6) 3,83 (2,00-5,01) | (n = 19) 4,51 (2,99-5,43) | 0,57 |

Nhận xét: Chỉ duy nhất nồng độ HBV-RNA huyết tương trước điều trị ở những bệnh nhân HBeAg dương tính có sự khác biệt giữa hai nhóm bệnh nhân VR và không VR sau 6 tháng điều trị ($p=0,01<0,05$). Trái lại, nồng độ HBV-RNA huyết tương trước điều trị ở những bệnh nhân HBeAg âm tính không có sự khác biệt giữa những bệnh nhân không đáp ứng và VR sau 6 tháng ($p>0,05$).

Bảng 4. Giá trị dự báo của nồng độ HBV-RNA huyết tương trước điều trị đối với tình trạng đáp ứng virus sau 6 tháng điều trị, phân chia theo đặc điểm HBeAg (T0) (n = 59)

| Chỉ tiêu đánh | HBeAg T0 | AUC | 95%CI | Cut-off value | p |
|---------------|----------|-----|-------|---------------|---|
|---------------|----------|-----|-------|---------------|---|

| giá | | | | (log copies/ml) | |
|--------------|---------------------|------|-----------|-----------------|-------|
| HBV DNA (T0) | Dương tính (n = 34) | 0,62 | 0,44-0,78 | 7,34 | 0,22 |
| | Âm tính (n = 25) | 0,60 | 0,39-0,79 | 6,43 | 0,47 |
| HBV RNA (T0) | Dương tính (n = 34) | 0,77 | 0,59-0,89 | 6,17 | 0,003 |
| | Âm tính (n = 25) | 0,58 | 0,37-0,77 | 2,69 | 0,58 |

Nhận xét: Nồng độ HBV-RNA huyết tương trước điều trị có giá trị dự báo khá tốt đối với VR sau 6 tháng điều trị, nhưng chỉ ở bệnh nhân HBeAg ban đầu dương tính (AUC = 0,77, 95%CI: 0,59-0,89), với điểm cắt tối ưu là 6,17 log copies/ml, độ nhạy 94,12% và độ đặc hiệu 70,59%. Trái lại, ở nhóm HBeAg ban đầu âm tính, nồng độ HBV-RNA huyết tương trước điều trị không có giá trị dự báo tình trạng VR sau 6 tháng điều trị ($p > 0,05$). Khác với HBV RNA, nồng độ HBV-DNA huyết tương trước điều trị không có giá trị dự báo VR sau 6 tháng điều trị ở cả hai nhóm bệnh nhân HBeAg ban đầu dương tính và âm tính ($p > 0,05$).

Bảng 5. Mức độ liên quan giữa nồng độ HBV-RNA huyết tương trước điều trị và tình trạng đáp ứng virus sau 6 tháng điều trị ở nhóm HBeAg (T0) dương tính (n = 34)

| Tình trạng VR sau 6 tháng | HBV RNA T0 (log copies/ml) | | RR | 95% CI | p |
|---------------------------|----------------------------|--------|------|------------|------|
| | < 6,17 | ≥ 6,17 | | | |
| Không VR | 5 | 12 | 9,90 | 1,48-66,10 | 0,02 |
| VR | 16 | 1 | | | |
| Chung | 21 | 13 | | | |

Nhận xét: Nhóm bệnh nhân có mức nồng độ HBV RNA huyết tương trước điều trị thấp hơn 6,17 log copies/ml có khả năng đạt tình trạng VR sau 6 tháng điều trị cao gấp 9,90 lần so với những bệnh nhân có mức HBV RNA trước điều trị cao hơn 6,17 log copies/ml (RR = 9,90, 95% CI: 1,48-66,10, $p = 0,02 < 0,05$).

4. Bàn luận

Như vậy, nghiên cứu của chúng tôi ở 77 bệnh nhân VGBMT được điều trị bằng TDF cho thấy, nồng độ HBV-RNA huyết tương tại thời điểm trước điều trị có giá trị dự báo ở mức khá tốt đối với VR sau 6 tháng điều trị ở những bệnh nhân có HBeAg dương tính, nhưng không thể hiện giá trị dự báo ở bệnh nhân HBeAg âm tính. Hơn nữa, những

bệnh nhân HBeAg dương tính và có nồng độ HBV-RNA huyết tương trước điều trị thấp hơn 6,17 log copies/ml có thể đạt tình trạng VR sau 6 tháng điều trị dễ dàng hơn so với những bệnh nhân còn lại với nồng độ HBV-RNA huyết tương trước điều trị lớn hơn hoặc bằng 6,17 log copies/ml.

Tác giả I-chin Wu nghiên cứu trên 171 bệnh nhân VGBMT cũng kết luận tương tự về khả năng dự báo của nồng độ HBV-RNA huyết tương trước điều trị đối với tình trạng VR sau điều trị (nồng độ HBV-RNA < 6,4 so với ≥ 6,4 log copies/mL: HR = 1,57; 95%CI: 1,06-2,31; $p = 0,023$) [9]. Trái lại, mối liên quan giữa nồng độ HBV-DNA trước điều trị và tình trạng VR trong quá trình điều trị không có ý nghĩa thống kê (HR = 1,28;

95%CI: 0,86-1,92; $p=0,23>0,05$). Tuy nhiên, I-chin Wu không đề cập đến ý nghĩa của HBV-RNA đối với tiên lượng VR ở hai nhóm bệnh nhân có HBeAg âm tính và dương tính.

Tác giả Jiandan Qian và cộng sự, nghiên cứu ở 63 bệnh nhân VGBMT có ALT ở mức bình thường, cũng cho những kết quả tương tự nghiên cứu của chúng tôi khi kết luận HBV-RNA chỉ có ý nghĩa dự báo VR ở nhóm bệnh nhân HBeAg dương tính, mà không có ý nghĩa ở nhóm bệnh nhân HBeAg âm tính [10]. Hơn nữa, giá trị dự báo của nồng độ HBV-RNA huyết tương trước điều trị đối với tiên lượng VR sau 78 tuần ở mức khá tốt (AUROC = 0,751; 95% CI: 0,573-0,929, $p=0,019$) với giá trị cut-off là 4,47 \log_{10} copies/mL (độ nhạy = 0,533; độ đặc hiệu = 0,933). Tuy nhiên, kết quả của Jiandan và cộng sự chỉ áp dụng cho những bệnh nhân có hoạt độ ALT trong máu ngoại vi ở mức bình thường, không bao gồm những bệnh nhân với ALT tăng cao, một trong những chỉ định dùng thuốc kháng virus.

Trái lại, Xin Ji và cộng sự nghiên cứu trên 66 bệnh nhân VGBMT có tải lượng virus ở mức cao (HBV-DNA > $1,90 \times 10^6$ copies/ml) cho kết quả khác biệt về nồng độ HBV-RNA trước điều trị không có khả năng tiên lượng VR sau đó [7]. Kết quả cho thấy, nồng độ HBV-RNA huyết tương tại thời điểm sau 3 tháng điều trị có giá trị tiên lượng chắc chắn đối với tình trạng VR tại thời điểm sau 24 tháng điều trị (OR 1,908; 95% CI: 1,115-3,265; $p=0,018$). Nồng độ HBV-RNA huyết tương tại thời điểm sau 3 tháng điều trị là một yếu tố tiên lượng độc lập đối với tình trạng VR (AUC = 0,736, $p=0,011$), với giá trị cut-off là 9,05 \log_{10} copies/mL (độ nhạy = 0,583; độ đặc hiệu = 0,91). Trong khi đó, nồng độ HBV-RNA huyết tương tại thời điểm trước điều trị không liên quan với tình trạng đáp ứng

virus. Sự khác biệt này có thể là do nhóm đối tượng nghiên cứu có tải lượng virus cao, gây ảnh hưởng cả về xử lý thống kê vì sự mất cân đối của dữ liệu đầu vào và kỹ thuật định lượng HBV-RNA huyết tương do ảnh hưởng của tín hiệu nhiễu từ HBV-DNA sau tách chiết.

5. Kết luận

Nồng độ HBV-RNA huyết tương tại thời điểm trước điều trị có giá trị dự báo đối với tình trạng đáp ứng virus sau 6 tháng điều trị ở những bệnh nhân có HBeAg dương tính. Bệnh nhân có HBeAg dương tính và nồng độ HBV-RNA ban đầu thấp hơn 6,17 log copies/ml có khả năng đạt tình trạng VR sau 6 tháng dễ dàng hơn so với những người còn lại. Vì vậy, HBV-RNA là một dấu ấn có giá trị trong theo dõi điều trị và tiên lượng bệnh viêm gan virus B mạn tính điều trị bằng tenofovir disoproxil fumarate.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Sở Khoa học và Công nghệ Hà Nội, trong đề tài có mã số 01C-0808-2017-3. Đồng thời, nghiên cứu đã nhận được sự hỗ trợ quan trọng của Ông Phạm Văn Quyền, Bà Vũ Nguyễn Quỳnh Anh (Phòng Công nghệ Gen và Di truyền, Viện Nghiên cứu Y Dược học, Học viện Quân y) và Bà Đỗ Thị Lệ Quyên (Khoa Truyền nhiễm, Bệnh viện Quân y 103, Học viện Quân y).

Tài liệu tham khảo

1. European Association for the Study of the Liver. Electronic address: easloffice@easloffice.eu; European Association for the Study of the Liver (2017) *EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection*. Journal of hepatology 67(2): 370-398.
2. Mauro Viganò, Massimo Puoti, and Pietro Lampertico (2016) *Nucleos (t) ide*

- Analogue Based Therapy and Management of Patients. Hepatitis B Virus in Human Diseases: 339-359.*
3. Jeng WJ, Sheen IS, Chen YC, Hsu CW, Chien RN, Chu CM, Liaw YF (2013) *Off-therapy durability of response to entecavir therapy in hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B patients.* Hepatology 58(6): 1888-1896.
 4. Yun-Fan Liaw and Fabien Zoulim (2016) *Hepatitis B virus in human diseases.* Part of the book series: [Molecular and Translational Medicine](#) (MOLEMED), Springer 468.
 5. Adraneda C, Tan YC, Yeo EJ, Kew GS, Khakpoor A, Lim SG (2022) *A critique and systematic review of the clinical utility of hepatitis B core-related antigen.* J Hepatol 78(4): 731-741. doi: 10.1016/j.jhep.2022.12.017.
 6. Wang J, Shen T, Huang X, Kumar GR, Chen X, Zeng Z, Zhang R, Chen R, Li T, Zhang T, Yuan Q, Li PC, Huang Q, Colonno R, Jia J, Hou J, McCrae MA, Gao Z, Ren H, Xia N, Zhuang H, Lu F (2016) *Serum hepatitis B virus RNA is encapsidated pregenome RNA that may be associated with persistence of viral infection and rebound.* Journal of hepatology 65(4): 700-710.
 7. Ji X, Xia M, Zhou B, Liu S, Liao G, Cai S, Zhang X, Peng J (2020) *Serum hepatitis B virus RNA levels predict HBeAg seroconversion and virological response in chronic hepatitis B patients with high viral load treated with nucleos(t) ide analog.* Infection and Drug Resistance: 1881-1888.
 8. GBD 2019 Hepatitis B Collaborators (2022) *Global, regional, and national burden of hepatitis B, 1990-2019: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019.* The Lancet Gastroenterology & Hepatology 7(9): 796-829.
 9. Wu IC, Liu WC, Chiu YC, Chiu HC, Cheng PN, Chang TT (2021) *Clinical implications of serum hepatitis B virus pregenomic RNA kinetics in chronic hepatitis B patients receiving antiviral treatment and those achieving HBsAg loss.* Microorganisms 9(6): 1146.
 10. Qian J, Zhang C, Liu H, Wang G, Zhao H (2022) *Serum HBV RNA as a predictor of virological response in treatment-naive chronic HBeAg-positive HBV-infected patients with normal alanine aminotransferase.* Chinese Medical Journal 135(19): 2351-2353.