

PHÁT HIỆN TÌNH TRẠNG NHIỄM VIRUS VIÊM GAN B BẰNG KỸ THUẬT ELISA VÀ REALTIME PCR Ở SINH VIÊN KHỐI Y2 - K45 TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÁI BÌNH

Hà Thị Hải*, Khổng Thị Diệp¹

TÓM TẮT

Mục tiêu: Nghiên cứu này nhằm đánh giá tình trạng nhiễm virus viêm gan B bằng kỹ thuật ELISA và Realtime PCR.

Phương pháp: mô tả cắt ngang trên 475 mẫu ở sinh viên khối Y2 - K45

Kết quả: Trường Đại học Y Dược Thái Bình có tỷ lệ mang HBsAg ở các sinh là 5,68%. Trong 27 mẫu xét nghiệm có HBsAg (+) có khoảng OD dao động từ 0,097 OD đến 6,3 OD (cut off của phản ứng là 0.073). Trong đó có 6 mẫu có mật độ quang $\leq 2OD$. 15 mẫu có mật độ quang từ 2 - 4 OD và 6 mẫu có mật độ quang trên 4OD. Kết quả định lượng HBV-DNA ở 27 mẫu có HBsAg (+) dương tính cho thấy tất cả các mẫu xét nghiệm đều có tải lượng virus từ $7,67 \cdot 10^3$ đến $2,54 \cdot 10^9$ copi/ml. Trong đó có 15 đối tượng (chiếm 55,5%) có tải lượng virus dưới 10^5 copi/ml.

Kết luận: nghiên cứu của chúng tôi cho thấy nhóm có OD dưới 2OD có tải lượng HBV-DNA là dưới 10^5 copi/ml. Đồng thời có sự tuyến tính giữa mật độ quang của nhóm có OD dưới 2OD với tải lượng HBV-DNA trong 93,36 % các trường hợp ($R^2=0,9336$) với đường tuyến tính là $y = 39317x+1374,2$.

Từ khóa: ELISA, HBV-DNA,

ABSTRACT

Objectives: This study aims to evaluate the status of hepatitis B virus infection by ELISA and Realtime PCR techniques.

Methods: A cross-sectional descriptive Research results on 475 samples in students from Y2 - K45.

Results: Thai Binh University of Medicine and Pharmacy had 5.68% HBsAg carrier rate among the students. In 27 samples tested for HBsAg (+) there was an OD range ranging from 0.097 OD

to 6.3 OD (cut off of the reaction was 0,073). In which, there are 6 samples with optical density $\leq 2OD$. 15 samples have optical density from 2 - 4 OD and 6 samples have optical density above 4OD. Quantitative results of HBV-DNA in 27 samples with positive HBsAg (+) showed that all samples tested had a viral load from 7.67,103 to 2,54,109 copi/ml. Of which, 15 subjects (accounting for 55,5%) had a viral load of less than 105 copi/ml.

Conclusion: Our study showed that the group with OD below 2OD had a HBV-DNA load of less than 105 copi/ml. At the same time, there was a linearity between the optical density of the group with OD less than 2OD and the HBV-DNA load in 93,36% of cases ($R^2=0,9336$) with a linear line of $y = 39317x+1374.2$.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Viêm gan virus (VGVR) là bệnh nhiễm trùng phổ biến nhất trên thế giới. Tỷ lệ lưu hành VGVR ở các nước rất khác nhau, nhưng đặc biệt cao ở các nước đang phát triển.

Hiện nay, HBsAg (+) là tiêu chuẩn chính yếu để chẩn đoán viêm gan B. Việc phát hiện HBsAg thường dựa vào kỹ thuật ELISA hoặc sử dụng kỹ thuật sắc ký miễn dịch (test nhanh). Trong đó kỹ thuật ELISA thường được dùng vì kỹ thuật này dễ thực hiện, tốc độ nhanh, chi phí thấp, dễ sản xuất, an toàn với độ nhạy và độ đặc hiệu chấp nhận được. Tuy nhiên kết quả của kỹ thuật này chỉ có giá trị chẩn đoán mà ít có ý nghĩa trong việc đưa ra các quyết định điều trị, cũng như theo dõi và tiên lượng bệnh.

Các kỹ thuật sinh học phân tử đã được ứng dụng rộng rãi trong y học để phát hiện sự tồn tại của các vi sinh vật trong các mẫu bệnh phẩm. Trong đó kỹ thuật Realtime PCR là kỹ thuật có độ nhạy và độ đặc hiệu cao, đồng thời cho phép xác định chính xác số lượng mầm bệnh trong mẫu bệnh phẩm trong thời gian ngắn. Việc xác định được nồng độ virus viêm gan B trong cơ thể sẽ giúp các bác sĩ lâm sàng ra quyết định điều trị. Chính vì vậy, định lượng nồng độ HBV-DNA bằng phương pháp Real time PCR đã được ứng

1. Trường Đại học Y Dược Thái Bình

*Chịu trách nhiệm chính: Hà Thị Hải

Email: hahai1982@gmail.com

Ngày nhận bài: 11/11/2021

Ngày phản biện KH: 23/11/2021

Ngày duyệt bài: 06/12/2021

dụng rất nhiều trong chẩn đoán và theo dõi điều trị viêm gan B. Vì vậy chúng tôi thực hiện đề tài này nhằm mục tiêu:

“Phát hiện tình trạng nhiễm virus viêm gan B bằng kỹ thuật ELISA và Realtime PCR ở sinh viên khối Y2 - K45, Trường Đại học Y Dược Thái Bình”.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng, địa điểm và thời gian nghiên cứu

2.1.1. Địa điểm và thời gian nghiên cứu:

Nghiên cứu được tiến hành tại Trường Đại học Y Dược Thái Bình từ tháng 1 đến tháng 6 năm 2017

2.1.2. Đối tượng nghiên cứu: 475 mẫu của sinh viên đa khoa hệ chính quy năm thứ 2 khóa 45 của Trường Đại học Y Dược Thái Bình

- Tiêu chuẩn lựa chọn: Sinh viên đa khoa hệ chính quy năm thứ 2 khóa 45 của Trường Đại học Y Dược Thái Bình đồng ý tham gia nghiên cứu.

- Tiêu chuẩn loại trừ: Những sinh viên mới tiêm phòng HBsAg trong vòng 3 tháng; Bệnh nhân đang mắc các bệnh cấp và mạn tính.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu được tiến hành theo phương pháp mô tả cắt ngang

2.2.2. Phương pháp chọn mẫu và tính cỡ mẫu

2.2.2.1. Tính cỡ mẫu: Cỡ mẫu được tính toán cho xét nghiệm ELISA là 385 mẫu. Thực tế chúng tôi thu thập được 475 mẫu.

2.2.2.2. Phương pháp chọn mẫu

- Chọn mẫu làm xét nghiệm ELISA: Chúng tôi chọn có chủ đích toàn bộ sinh viên đa khoa hệ chính quy năm thứ 2 khóa 45, Trường Đại học Y Dược Thái Bình

- Chọn mẫu làm xét nghiệm realtime PCR: Các mẫu đã làm ELISA cho kết quả dương tính

2.2.3. Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu

- Kỹ thuật lấy mẫu và bảo quản: Thực hiện theo quy trình hướng dẫn lấy mẫu và bảo quản mẫu của Bộ Y tế

- Kỹ thuật ELISA xác định HbsAg: Thực hiện dựa trên nguyên lý kỹ thuật ELISA - sandwich 1 pha. Các bước tiến hành được thực hiện bởi bộ kit Human (Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Kỹ thuật xác định HBV - DNA bằng phản ứng Realtime PCR theo phương pháp Taqman Probe: DNA được tách chiết bằng phương pháp Boom. Phản ứng Realtime PCR được thực hiện theo hướng dẫn và bộ sinh phẩm của hãng Primer Design trên hệ thống máy Realtime PCR LightCycler 480 của hãng Roche (Đức) với kỹ thuật Taqman – Probe.

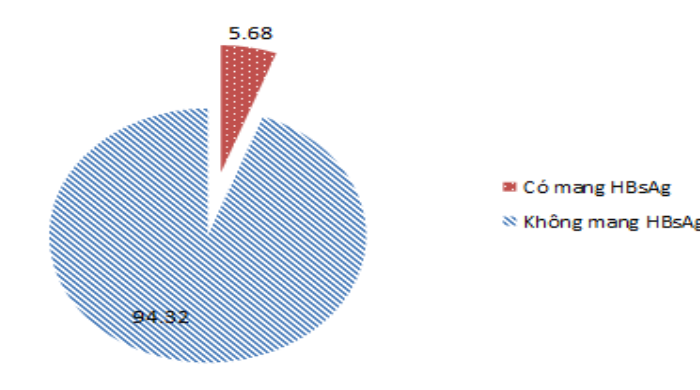
2.3. Phương pháp xử lý số liệu: Bằng phần mềm thống kê y sinh học

2.4. Đạo đức nghiên cứu: Nghiên cứu có sự tham gia tự nguyện của các sinh viên và không có sự ép buộc nào. Sau khi có kết quả nghiên cứu, sẽ có phản hồi và tư vấn cho sinh viên về kết quả xét nghiệm.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

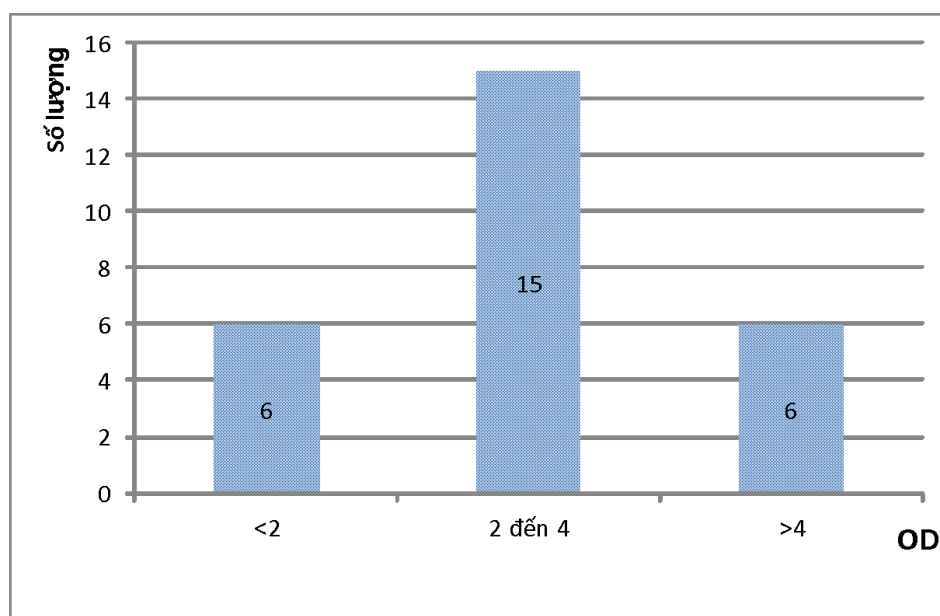
Qua nghiên cứu 475 mẫu của sinh viên đa khoa hệ chính quy năm thứ 2 khóa 45 của Trường Đại học Y Dược Thái Bình chúng tôi thu được kết quả sau:

3.1. Tỷ lệ mang HBsAg ở đối tượng nghiên cứu

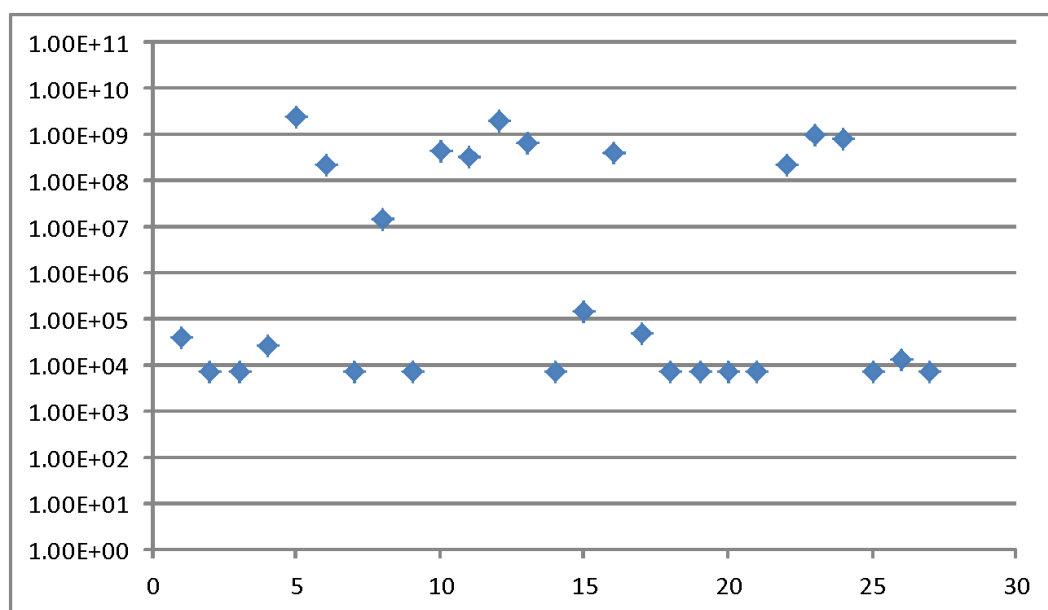


Biểu đồ 1. Tỷ lệ mang HBsAg ở đối tượng nghiên cứu

Nhận xét: Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy tỷ lệ mang HBsAg ở các sinh viên đa khoa khối Y2 - K45, Trường Đại học Y Dược Thái Bình là 5,68%.

3.2. Phân bố mật độ quang (kết quả ELISA) của các mẫu HBsAg(+)**Biểu đồ 2. Phân bố mật độ quang (kết quả ELISA) của các mẫu HBsAg(+)**

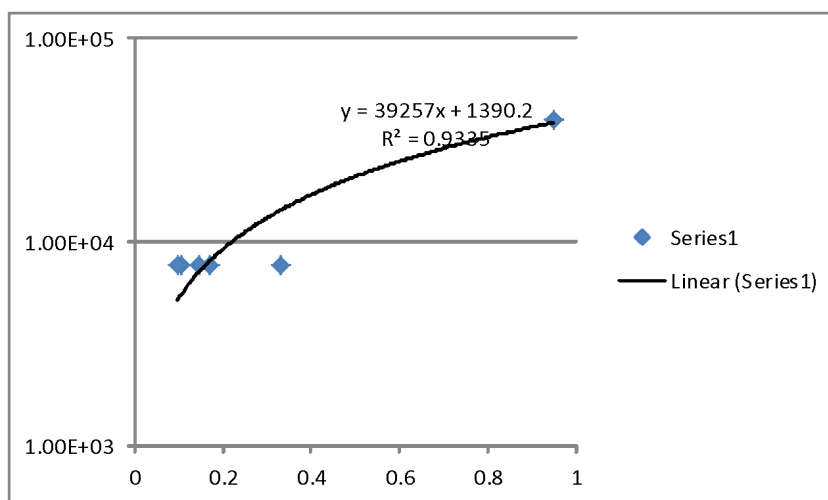
Nhận xét: Trong 27 mẫu xét nghiệm có HBsAg (+) có khoảng OD dao động từ 0,097 OD đến 6,3 OD (cut off của phản ứng là 0.073). Trong đó có 6 mẫu có mật độ quang ≤ 2 OD. 15 mẫu có mật độ quang từ 2 - 4 OD và 6 mẫu có mật độ quang trên 4OD.

3.3. Tải lượng HBV-DNA ở đối tượng nghiên cứu.**Biểu đồ 3. Phân bố tải lượng virus ở các mẫu HBsAg (+)**

Kết quả định lượng HBV-DNA ở 27 mẫu có HBsAg (+) dương tính cho thấy tất cả các mẫu xét nghiệm đều có tải lượng virus từ $7,67 \cdot 10^3$ đến $2,54 \cdot 10^9$ copi/ml.

3.4. Mối liên quan giữa nồng độ HBsAg và tải lượng virus.

Nhằm đánh giá vai trò việc xác định HBsAg bằng kỹ thuật ELISA bán định lượng (thông qua đo mật độ quang học của giếng phản ứng) đối việc tiên lượng tải lượng HBV-DNA chúng tôi tìm hiểu mối quan hệ tuyến tính giữa tải lượng HBV-DNA và nồng độ HBsAg trong các mẫu mẫu có HBsAg (+) dương tính (bán định lượng qua OD đo được). Các mẫu này được chúng tôi chia làm 3 nhóm nồng độ OD.



Biểu đồ 4. Mối liên quan giữa OD và HBV-DNA ở nhóm có OD <2

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy nhóm có OD dưới 2OD có tải lượng HBV- DNA là dưới 10^5 copi/ml. Đồng thời có sự tuyến tính giữa mật độ quang của nhóm có OD dưới 2OD với tải lượng HBV-DNA trong 93,36 % các trường hợp ($R^2=0,9336$) với đường tuyến tính là $y = 39317x+1374,2$. Tuy nhiên số lượng mẫu ở nhóm này còn ít nên cần nghiên cứu với số lượng mẫu lớn hơn để có thể đánh giá chính xác mối quan hệ tuyến tính này.

IV. BÀN LUẬN

Chúng tôi nghiên cứu cắt ngang trên 475 mẫu của sinh viên đa khoa hệ chính quy năm thứ 2 khóa 45 của Trường Đại học Y Dược Thái Bình chúng tôi thu được kết quả tỷ lệ mang HBsAg là 5,68%. Thành phố Hồ Chí Minh tỷ lệ HBsAg (+) ở phụ nữ tuổi sinh đẻ là 12,6% [2]; Lâm Đông cho thấy tỷ lệ này trong cộng đồng dân cư là 16,74 % [3]. Có lẽ sự khác biệt này là do đối tượng nghiên cứu của chúng tôi là các sinh viên năm thứ 2, phần lớn các sinh viên này sinh năm 1990 là những đối tượng đã được tiêm phòng viêm gan B trong chương trình tiêm chủng mở rộng nên đã làm giảm đáng kể tình trạng nhiễm virus viêm gan B ở người khỏe mạnh.

Trong 27 mẫu xét nghiệm có HBsAg (+) có khoảng OD dao động từ 0,097 OD đến 6,3 OD (cut off của phản ứng là 0.073). Trong đó có 6 mẫu có mật độ quang ≤ 2 OD. 15 mẫu có mật độ quang từ 2-4 OD và 6 mẫu có mật độ quang trên 4OD. Kết quả này cho thấy các mẫu có HBsAg (+) có khoảng dao động khá lớn và phân bố rải rác ở nhiều vùng khác nhau có nghĩa là có nồng độ HBsAg của các mẫu tham gia phản ứng có khoảng dao động khá lớn nó phản ánh mức độ và tình trạng nhiễm HBsAg ở các mức độ khác nhau của các đối tượng nghiên cứu.

Trong đó có 15 mẫu (chiếm 55,5%) có tải lượng virus dưới 10^5 copi/ml (những người lành mang

virus); 44,5% (12 mẫu) các trường hợp HBsAg dương tính có tải lượng virus từ 10^5 copi/ml trở lên, đây là những trường hợp virus đã nhân bản khá mạnh trong tế bào gan và có thể gây tổn hại tế bào gan; cần tư vấn để kịp thời điều trị.

Từ kết quả nghiên cứu này cho thấy có mối tương quan giữa nồng độ HBsAg và tải lượng HBV-DNA ở một số đối tượng nhất định. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của các tác giả Günel O (2014) [4], Liu X (2016) [6] khi nghiên cứu trên bệnh nhân viêm gan B mạn tính cũng thấy có sự tương quan giữa nồng độ HBsAg và tải lượng HBV-DNA ở một số nhóm bệnh nhân, đặc biệt là nhóm bệnh nhân có tải lượng virus cao. Qua kết quả nghiên cứu này có thể gợi ý cho một số cơ sở chưa có kỹ thuật PCR đánh giá sơ bộ tải lượng HBV-DNA (với nhóm có OD<2) thì tải lượng HBV-DNA thường dưới 10^5 , với những bệnh nhân này cần tiếp tục theo dõi.

V. KẾT LUẬN

- Tỷ lệ mang HBsAg ở sinh viên Y2-K45 Trường Đại học Y Dược Thái Bình là 5,68%; Mật độ quang (OD) của các mẫu HBsAg dương tính khi xét nghiệm bằng ELISA dao động từ 0,097 đến 6,84.

- Tải lượng HBV-DNA ở các đối tượng mang HBsAg là từ 10^3 đến 10^9 ; Có mối quan hệ tuyến