

NGHIÊN CỨU SỰ LƯU HÀNH VÀ KIỂU GEN CỦA VI RÚT VIÊM GAN B Ở MỘT SỐ ĐỊA PHƯƠNG GIAI ĐOẠN 2012-2013

DƯƠNG TUẤN LINH⁽¹⁾, BÙI THỊ LAN ANH⁽²⁾, PHẠM NGỌC QUANG⁽²⁾
ĐOÀN TRỌNG TUYỀN⁽³⁾, DMITRIEV A.V⁽⁴⁾, KALININA O.V.⁽⁵⁾

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Mặc dù vaccine dự phòng bệnh viêm gan do vi rút viêm gan B (HBV) đã được sử dụng có hiệu quả, nhưng bệnh viêm gan B vẫn là vấn đề lớn cho sức khỏe cộng đồng. Hiện nay trên thế giới có khoảng 257 triệu người nhiễm HBV mạn tính, 887.000 người chết mỗi năm bởi viêm gan B cấp tính hay mạn tính [1, 6]. Ở Việt Nam có khoảng 8,4 triệu người nhiễm HBV mạn tính và 23.300 người chết liên quan tới HBV trong năm 2005 [12]. Viêm gan do HBV chiếm 50% số ca viêm gan cấp tính, 88% số ca xơ gan và 80% số ca ung thư gan [11]. Kết quả một số nghiên cứu cho thấy tỷ lệ dương tính với HBsAg trong cộng đồng từ 15÷20%, cá biệt lên tới 20÷40% trong nhóm tiêm chích ma túy và bệnh nhân HIV. Trong đó nhóm tuổi mang HBsAg dương tính cao nhất lần lượt là từ 30÷39 tuổi (19,3% ở nam và 14,0% ở nữ) và 40÷49 tuổi (18,6% ở nam và 13,4% ở nữ) [7, 15]. Nghiên cứu mô tả cắt ngang liên quan tới tình trạng nhiễm HBV ở các nhóm dân tộc khác nhau thuộc tỉnh Lào Cai cho thấy tỷ lệ HBsAg dương tính cao nhất ở nhóm dân tộc Hmong (19% ở nam và 15% ở nữ), Kinh và Dáy (gần 13%), thấp nhất ở nhóm dân tộc Phù La (4,7%) và Dao (4,1%) [10].

HBV có ít nhất 8 kiểu gene với sự khác biệt ít nhất 8% tổng số trình tự nucleotides, kí hiệu từ A đến H đã được xác định. Theo Tran Thien Tuan Huy kiểu gene I đã được phát hiện ở Việt Nam, tỷ lệ và sự phân bố kiểu gene HBV thay đổi theo vùng địa lí [8, 9]. Để xác định kiểu gene của HBV có ít nhất 10 kĩ thuật khác nhau về độ nhạy, độ đặc hiệu, thời gian tiến hành và giá thành. Trong đó, tiêu chuẩn vàng hiện nay cho việc xác định kiểu gene HBV là phương pháp phân tích cây phát sinh chủng loại dựa trên vùng gen S-HBV. Nhóm tác giả đã tiến hành xác định sự lưu hành và kiểu gen của HBV thu thập trong giai đoạn 2012÷2013 tại một số tỉnh, thành phố ở Việt Nam.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu huyết thanh thu thập trong cộng đồng dân cư trên 2 lứa tuổi sinh năm 1970÷1976 và sinh năm 1990÷1996 tại các tỉnh Hòa Bình, Quảng Trị, Kon Tum và thành phố Hồ Chí Minh trong khoảng thời gian từ 2012÷2013.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- *Thiết kế nghiên cứu: Mô tả cắt ngang.*

- *Phát hiện kháng nguyên HBsAg:* Phát hiện HBsAg bằng sinh phẩm chẩn đoán nhanh của hãng SD-Bioline (Hàn Quốc).

- *Kỹ thuật sinh học phân tử*: Tách chiết HBV-DNA bằng bộ sinh phẩm DNA-Sorb-B (Amplisens, Nga). Khuếch đại vùng gene S của virus viêm gan B với cặp mồi FA3-L: CTG CTG GTG GCT CCA GTT và FA3-R: GCC TTG TAA GTT GGC GAG AA, sản phẩm PCR có kích thước 1000bp. Điều kiện nhiệt độ của phản ứng PCR là: 95°C/2 phút; (95°C/30 giây, 53°C/30giây, 68°C/90 giây) 35 chu kỳ; 68°C/5 phút. Điện di trên gel agarose 1% (Thermal Scientific, Mỹ), giải trình tự tại 1st BASE (website: <http://www.base-asia.com>). So sánh, phân tích trình tự bằng phần mềm MEGA7. Xây dựng cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen S theo phương pháp Neighbour-Joining, các nhánh của cây được tính toán lặp lại 1000 lần. Phần mềm FigTree 1.4.2 để biểu diễn cây.

- *Xử lý số liệu thống kê*: bằng phần mềm SPSS 20.0.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Kết quả thu thập mẫu huyết thanh

Thu thập được 664 mẫu huyết thanh trong cộng đồng (bảng 1). Tiến hành sàng lọc phát hiện HBsAg dương tính cho 664 mẫu huyết thanh đã thu thập.

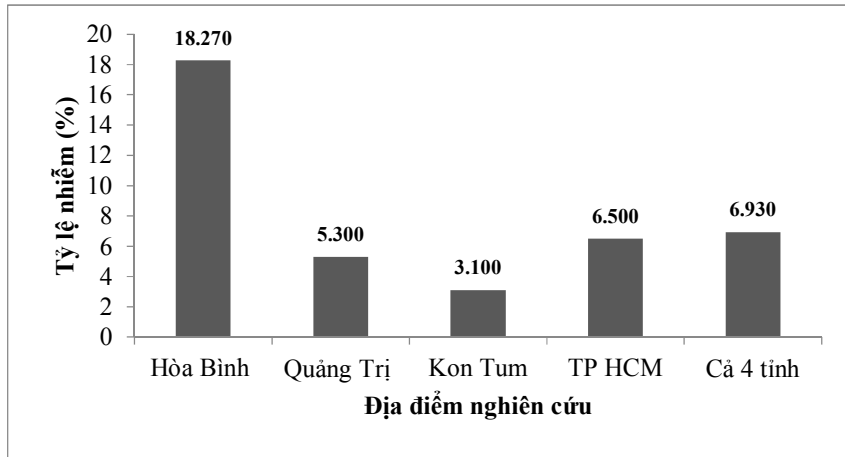
Bảng 1. Cơ cấu mẫu theo vùng địa lý, giới tính và nhóm tuổi

	Hòa Bình (n = 93)	Quảng Trị (n = 188)	Kon Tum (n = 183)	Tp. Hồ Chí Minh (n = 200)
Nam	41 (44,1%)	94 (50%)	86 (47%)	99 (49,5%)
Nữ	52 (55,9%)	94 (50%)	97 (53%)	101 (51,5%)
Độ tuổi sinh 1990 - 1996	93 (100%)	93 (49,5%)	96 (52,5%)	103 (51,5%)
Độ tuổi sinh 1970 - 1976	0 (0%)	95 (51,5%)	87 (47,5%)	97 (49,5%)

3.2. Tỷ lệ HBsAg dương tính theo vùng địa lý

Từ hình 1 nhận thấy tỉnh Hòa Bình có tỷ lệ HBsAg dương tính cao nhất (18,27%), tỉnh Kon Tum có tỉ lệ thấp nhất (3,1%). Tỷ lệ đối tượng tham gia nghiên cứu dương tính với HBsAg ở Hòa Bình cao hơn so với Kon Tum, Quảng Trị, Tp Hồ Chí Minh và có sự khác biệt về thống kê (p lần lượt là $p < 0,001$; $0,005$ và $< 0,001$). Tỷ lệ giữa HBsAg dương tính giữa các tỉnh còn lại tuy có sự khác biệt nhưng không có ý nghĩa thống kê. Theo Le Viet tỷ lệ HBsAg dương tính trên 1.200 mẫu huyết thanh thu thập ở Quảng Trị là 11,4% [16]. Tương tự, theo số liệu của Hội Ung thư Việt - Mỹ tỷ lệ HBsAg trung bình ở Việt Nam khoảng 17% [1]. Tỷ lệ HBsAg dương tính tại Quảng Trị (5,3%) trong nghiên cứu thấp hơn so với các nghiên cứu khác. Tỷ lệ mang HBsAg tại tỉnh Quảng Trị và Kon Tum (miền Trung) thấp hơn tỷ lệ HBsAg dương tính ở xã Quỳnh Đôi, tỉnh Nghệ An, lần lượt là 5,3% và 3,1%, so với 26,26% [4]. Tỷ lệ HBsAg dương tính ở Tp HCM cũng thấp hơn so với một số nghiên cứu trước đó ở Tp HCM (6,5%, so với 9%) [5]. Tỷ lệ HBsAg dương tính của tỉnh Hòa

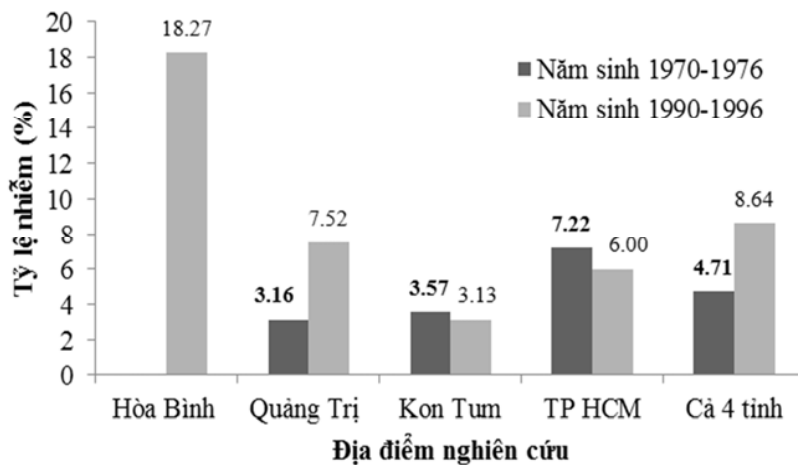
Bình trong nghiên cứu cao hơn không đáng kể so với nghiên cứu của Trang N.T.Q. tại xã Phú Cường, Sóc Sơn (18,27%, so với 17,6%, $p = 0,88$) [3]. Có thể thấy, đối tượng nghiên cứu tại tỉnh Hòa Bình chỉ thuộc nhóm tuổi 1990÷1996 (100%) nên tỷ lệ HBsAg dương tính có sự khác biệt (cao hơn) so với các tỉnh khác trong nghiên cứu.



Hình 1. Tỷ lệ HBsAg dương tính theo khu vực địa lí

3.3. Tỷ lệ HBsAg dương tính theo tuổi

Tỷ lệ HBsAg dương tính giữa nhóm tuổi 1970÷1976 (cột thứ nhất) và nhóm tuổi 1990÷1996 (cột thứ 2) tại từng tỉnh có sự khác nhau (hình 2).



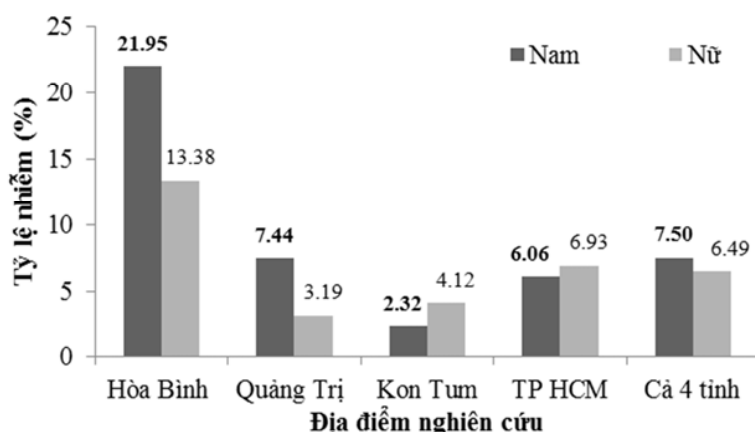
Hình 2. Tỷ lệ HBsAg dương tính theo tuổi

Mẫu nghiên cứu tại Hòa Bình chỉ thu thập ở nhóm tuổi 1990÷1996 (18,27%), đây là một tỷ lệ khá cao. Tỉnh Quảng Trị có tỷ lệ HBsAg dương tính ở nhóm tuổi 1990÷1996 cao hơn nhóm tuổi 1970÷1976, tuy nhiên không có sự khác biệt về thống kê (7,52%, so với 3,16%, $p = 0,182$). Tỷ lệ nhiễm ở nhóm tuổi 1970÷1976 và nhóm tuổi 1990÷1996 tương đương nhau ở tỉnh Kon Tum, TP HCM. Tỷ lệ dương tính với HBsAg ở 2 nhóm tuổi giữa các tỉnh với nhau cũng có sự chênh lệch. Tuy

nhiên chỉ có tỷ lệ nhóm tuổi 1990÷1996 của tỉnh Hòa Bình so với các tỉnh khác có sự khác biệt về thống kê. Giá trị p thống kê giữa Hòa Bình và các tỉnh Quảng Trị, Kon Tum, TP HCM lần lượt là: 0,028; 0,0007; 0,009 ($p < 0,05$). Tỷ lệ dương tính với HBsAg ở nhóm tuổi 1990÷1996 tại tỉnh Hòa Bình cũng cao hơn so với tỉ lệ cả 4 tỉnh và có giá trị về ý nghĩa thống kê (18,27%, so với 8,64%, $p = 0,048$).

3.4. Tỷ lệ HBsAg dương tính theo giới tính

Kết quả xác định tỷ lệ nhiễm HBsAg dương tính theo giới tính ở hình 3 có sự khác biệt giữa nam giới và nữ giới ở mỗi tỉnh, tuy nhiên sự khác biệt về tỷ lệ này không có ý nghĩa thống kê.



Hình 3. Tỷ lệ HBsAg dương tính theo giới tính

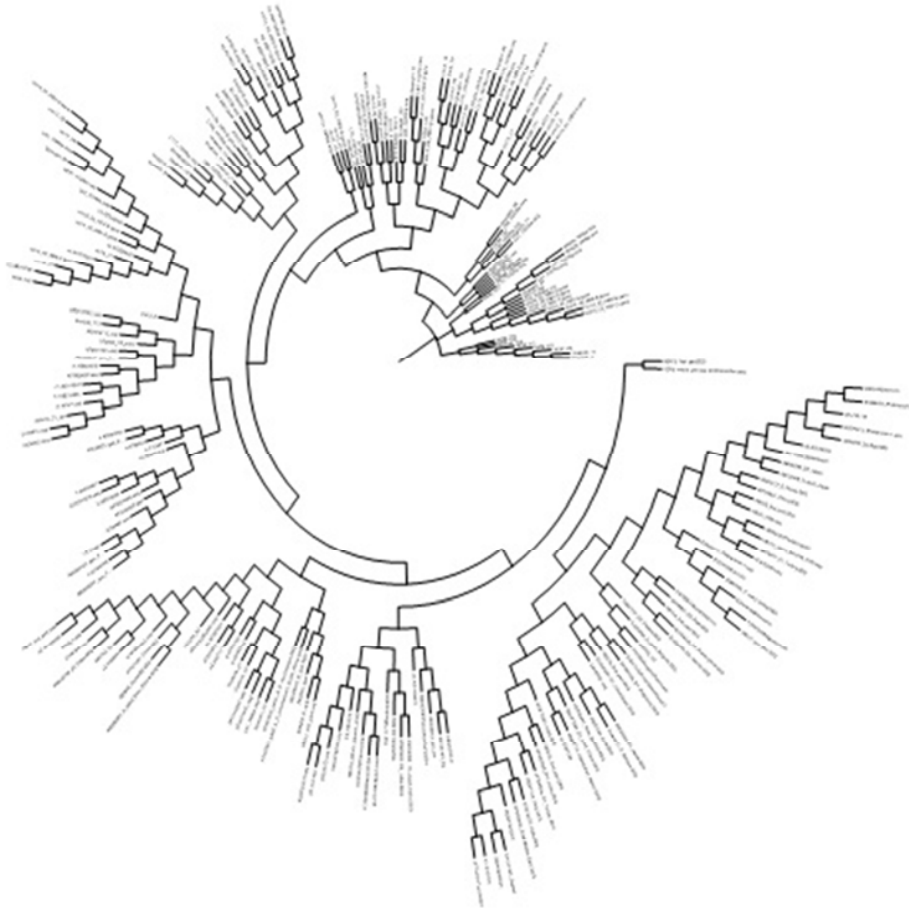
Tỷ lệ HBsAg dương tính của nam giới giữa các tỉnh có sự khác biệt về ý nghĩa thống kê: Hòa Bình - Quảng Trị (21,95% so với 7,44%, $p = 0,016$), Hòa Bình - Kon Tum (21,95% so với 2,23%, $p = 0,0002$), Hòa Bình - TP HCM (21,95% so với 6,06%, $p = 0,006$), Hòa Bình - cả 4 tỉnh (21,95% so với 7,5%, $p = 0,03$). Tương tự, khi so sánh tỷ lệ HBsAg dương tính nữ giới giữa các tỉnh cũng chỉ có sự khác biệt thống kê giữa tỉnh Hòa Bình so với các tỉnh khác với giá trị p lần lượt là: 0,007; 0,016; 0,096 (Quảng Trị, Kon Tum, TP HCM).

Trong nghiên cứu này tỷ lệ trung bình HBsAg dương tính ở nam giới cao hơn nữ giới, tương tự với một số kết quả đã nghiên cứu của Le Viet [16], tỷ lệ trung bình ở nam (16,8%) cao hơn tỷ lệ nữ (7,9%) và tỷ lệ nam (19,35%) cao hơn tỷ lệ nữ (15,85%) [3].

3.5. Phát hiện HBV - DNA và xác định kiểu gen của HBV

Khuếch đại vùng gen S của HBV từ các mẫu huyết thanh dương tính với HBsAg bằng cặp mồi FA3. Kết quả 100% mẫu HBsAg dương tính đều phát hiện được DNA-HBV. Số lượng mẫu DNA-HBV tại 4 tỉnh lần lượt là: Hòa Bình 17 mẫu, Quảng Trị 10 mẫu, Kon Tum 6 mẫu và TP HCM 13 mẫu. Các sản phẩm PCR sau tinh sạch được gửi đi giải trình tự, phân tích kết quả và dựng cây phát sinh chủng loại bằng các phần mềm tin sinh học.

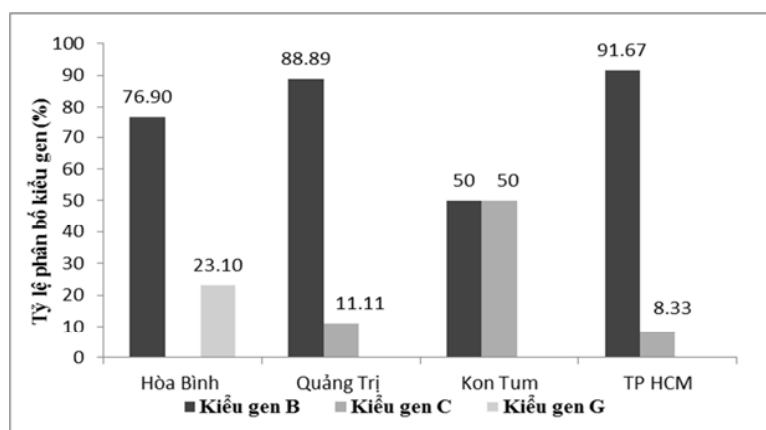
Nghiên cứu ghi nhận hiện diện của 3 kiểu gene B, C, và G (hình 4, 5). Trong đó kiểu gen B chiếm tỷ lệ cao nhất 83,3% (30/36 mẫu), kiểu gen C 8,3% (3/36 mẫu) và G 8,3% (3/36 mẫu) có tỷ lệ thấp hơn. Tỷ lệ khác biệt kiểu gen B so với kiểu gen C và G có ý nghĩa về giá trị thống kê ($p < 0,001$). Trong kiểu gen B, phát hiện các kiểu gen gần gũi với kiểu gen B2, B3, B4.



Hình 4. Cây phát sinh chủng loại HBV dựa trên gen S, sử dụng 221 trình tự tham chiếu gen S HBV, 36 số trình tự thu thập trong nghiên cứu

Ở Hòa Bình, tỷ lệ kiểu gen B chiếm 76,9% (10/13 mẫu), tỷ lệ kiểu gen G là 23,1% (3/13 mẫu), và không xuất hiện kiểu gen C. Ở tỉnh Quảng Trị, Kon Tum và Tp HCM, tỷ lệ kiểu gen B lần lượt là: 88,89% (8/9 mẫu), 50% (1/2 mẫu) và 91,67% (11/12 mẫu); kiểu gen C bao gồm C1 và C2. Trong khi đó không tìm thấy kiểu gen G tại 3 tỉnh này. Tỷ lệ kiểu gen B (83,3%) trong nghiên cứu cao hơn tỷ lệ một số nghiên cứu trước đó: 72,9% [2]; 67,8% [14]. Trong khi đó, tỷ lệ kiểu gen C (8,3%) thấp hơn tỷ lệ một số nghiên cứu: 27,1% [2] và 27,9% [14].

Theo nghiên cứu trước đây trên các bệnh nhân xuất hiện các kiểu gen từ A-G [13, 14]. Trong đó, kiểu gene A thường xuất hiện ở người không mang triệu chứng. Kiểu gen C (25%, chiếm tỷ lệ cao nhất), D (20%) và A (18%) xuất hiện ở bệnh nhân viêm gan B mạn tính, xơ gan và ung thư gan. Kiểu gene B có yếu tố nguy cơ gây bệnh gan tiến triển so với bệnh nhân nhiễm kiểu gene A. Kiểu gene C và D được xác nhận như yếu tố độc lập cho việc tiến triển thành xơ gan và ung thư gan so với kiểu gene B [13].



Hình 5. Phân bố kiểu gene HBV

4. KẾT LUẬN

Tỷ lệ HBsAg dương tính của hai nhóm tuổi 1990÷1996 và 1970÷1976 ở các tỉnh Hòa Bình, Quảng Trị, Kon Tum và Tp Hồ Chí Minh biến động từ 3,1% đến 18,27%. Trong đó tỉnh Hòa Bình có tỷ lệ HBsAg dương tính cao nhất chiếm 18,27%. Tỷ lệ HBsAg dương tính ở nam có xu hướng cao hơn so với nữ, ở Hòa Bình tỷ lệ nam giới chiếm 21,95%, cao hơn so với nữ giới là 13,38%; ở Quảng Trị tỷ lệ ở nam giới chiếm 7,44% so với nữ giới là 3,19%. Ở hai nhóm tuổi 1990÷1996 và 1970÷1976 tỷ lệ dương tính HBsAg có sự khác nhau, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

Kiểu gene HBV phân bố chủ yếu ở 4 tỉnh trong nghiên cứu chủ yếu là kiểu gene B chiếm tỷ lệ 83,3%, kiểu gene C và G xuất hiện với tỷ lệ thấp hơn là 8,3%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hội ung thư Việt Mỹ, *Bệnh viêm gan B*. 2016, Website: http://www.ungthu.org/cacbenhungthu/ut_gan/viemganB.asp.
2. Nguyễn Thị Hải Yến, Cao Minh Nga, *Sự phân bố kiểu gen của HBV ở người nhiễm HBV mạn tính tại Tp Cần Thơ*, Tạp chí Y học Tp. Hồ Chí Minh, 2015, Tập 19, Phụ bản số 1, tr.374-377.
3. Trang N.T.Q., *Xác định tỉ lệ nhiễm vi rút viêm gan B (HBsAg) và viêm gan C (Anti HCV) trong huyết thanh người tại một xã vùng đồng bằng Bắc Bộ Việt Nam*, Gan 2011, 64(95):102.

4. Nguyễn Văn Bằng, Nguyễn Thị Vân Anh. *Tỉ lệ mang HBsAg và một số yếu tố nguy cơ mang HBsAg của các thành viên trong hộ gia đình: nghiên cứu cộng đồng tại một số xã miền Trung (xã Quỳnh Đôi, tỉnh Nghệ An)*. Tạp chí Y học Tp. Hồ Chí Minh, 2010, Tập số **14**, phụ bản số 4.
5. Vũ Quang Huy, *Tỉ lệ hiện nhiễm virus viêm gan B và chỉ số men gan trên 39865 người tại cộng đồng thuộc một số khu vực thành phố Hồ Chí Minh*. Tạp chí Y học Tp. Hồ Chí Minh, 2012, Tập **16**. Số 4, tr.46.
6. Tổ chức Y tế Thế giới khu vực Châu Á Thái Bình Dương 2017, Website http://www.wpro.who.int/vietnam/mediacentre/releases/2017/world_hepatitis_day_vietnam_2017/en.
7. Hipgrave, D.B., Van, N.T., Huong, V.M., Long, H.T., Trung, T.N., Jolley, D., Maynard, J.E. and Biggs, B.A, *Hepatitis B infection in rural Vietnam and the implications for a national program of infant immunization*, The American journal of tropical medicine and hygiene, 2003, **69**(3):288-294.
8. Huy T.T.T., Ushijima H., Quang V.X., Win K.M., Luengrojanakul P., Kikuchi K., Sata T., Abe K., *Genotype C of hepatitis B virus can be classified into at least two subgroups*. Journal of general virology 2004, **85**(2):283-292.
9. Huy T.T.T., Ngoc T.T., *New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam*. Journal of virology, 2008, **82**(11):5657-5663.
10. Le T.K.D., *Hepatitis B Infection Among Ethnic Children in Ban Cam Commune, Bao Thang District, Lao Cai Province*. Hanoi Medical University, 2007.
11. Nguyen V.T.T., McLaws M.L., Dore G.J., *Highly endemic hepatitis B infection in rural Vietnam*, Journal of gastroenterology and hepatology, 2007, **22**(12):2093-2100.
12. Nguyen V.T.T., Law M.G., Dore G.J., *An enormous hepatitis B virus related liver disease burden projected in Vietnam by 2025*, Liver International, 2008, **28**(4):525-531.
13. Toan N.L., Song L.H., Kremsner P.G., Duy D.N., Binh V.Q., Koeberlein B., Kaiser S., Kandolf R., Torresi J., Bock C, *Impact of the hepatitis B virus genotype and genotype mixtures on the course of liver disease in Vietnam*. Hepatology 2006, **43**(6):1375-1384.
14. Truong B.X., Seo Y., Yano Y., Ho P.T., Phuong T.M., *Genotype and variations in core promoter and pre-core regions are related to progression of disease in HBV-infected patients from Northern Vietnam*. International journal of molecular medicine 19, 2007, tr.293-299.
15. Vien C., Nguyen T., Dinh S., *Investigation of hepatitis B virus infection among employees in Nha Trang City*, Journal Hyg Pre Med, 1996, **6**(4):34-40.
16. Viet L., Lan N.T.N., Ty P.X., Björkqvoll B., Hoel H., Gutteberg T., Husebekk A., Larsen S., Skjerve E., Husum H., *Prevalence of hepatitis B & hepatitis C virus infections in potential blood donors in rural Vietnam*. The Indian journal of medical research, 2012, **136**(1):74.

SUMMARY

STUDY ON PREVALENCE AND GENOTYPE OF HEPATITIS B VIRUSES IN SOME PROVINCES IN THE PERIOD 2012-2013

The hepatitis B virus (HBV) is among the leading causes of chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Screening of 664 serum samples from Hoabinh, Quangtri, Kontum provinces and Ho Chi Minh city showed that the prevalence of HBsAg varied by geographic regions and gender. The highest one was in Hoabinh (18.27% in general, 21.95% in male, and 13.38% in female), and the lowest one was in Kontum (3.1% in general, 2.32% in male, and 4.32% in female). In Vietnam, the most common *genotype* is B, followed by genotypes C and G. HBV phylogenetic analysis of *S* sequences revealed that genotype B was highly prevalent (83.3%), and genotype C (8.3%) and G (8.3%) were also detected as a minor distribution. Further studies are recommended to determine the HBsAg prevalence and genotypes and main modes of hepatitis B virus transmission in Vietnam.

Từ khóa: Kiểu gen, vi rút viêm gan B, vùng gen S; *genotype*, Hepatitis B virus, *S gene region*.

Nhận bài ngày 20 tháng 6 năm 2017

Hoàn thiện ngày 24 tháng 10 năm 2017

⁽¹⁾ Viện Y học Dự phòng Quân đội

⁽²⁾ Viện Y sinh nhiệt đới, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga

⁽³⁾ Phòng Vệ sinh Phòng dịch, Cục Quân y

⁽⁴⁾ Viện Y học Thực nghiệm, Saint-Peterburg, Liên bang Nga

⁽⁵⁾ Viện Pasteur Saint-Peterburg, Liên bang Nga