

Mối liên quan của kiểu gen Virut Viêm gan B với một số xét nghiệm sinh hoá, miễn dịch trên bệnh nhân Viêm gan B mạn hoạt động

*Nguyễn Hồng Thắng**; *Nguyễn Trọng Chính***; *Vương Phúc Đường***,
*Trần Thị Huyền Trang***; *Lê Hữu Song***

TÓM TẮT

Trong số 57 bệnh nhân (BN) viêm gan B mạn (VGBM) 4 BN nhiễm virut kiểu gen đơn A (10,5%), B (15,8%), C (38,6%) và D (7%); ngoài ra còn có 7 trường hợp nhiễm virut kiểu gen đồng/bội nhiễm khác là AB (1,75%), AC (12,3%), AD (1,75%), AF (3,5%), BC (1,75%), CD (3,5%) và CF (3,5%). BN nhiễm virut kiểu gen C liên quan chặt chẽ với tình trạng mang kháng nguyên HBeAg. BN nhiễm virut kiểu gen C có tải lượng virut cao hơn có ý nghĩa so với kiểu gen B và kiểu gen đồng/bội nhiễm. Trong khi đó, BN nhiễm virut kiểu gen B lại có nồng độ HBV ADN thấp hơn BN nhiễm virut kiểu gen A và kiểu gen đồng/bội nhiễm; nồng độ enzym ALT ở BN nhiễm virut kiểu gen B cao hơn có ý nghĩa so với BN nhiễm virut kiểu gen D và kiểu gen phối hợp. ALT ở nhóm BN nhiễm virut kiểu gen C cũng cao hơn có ý nghĩa so với nhóm nhiễm virut kiểu gen D; nồng độ enzym AST ở nhóm BN nhiễm virut kiểu gen A thấp hơn có ý nghĩa so với nhóm nhiễm virut kiểu gen B và kiểu gen hỗn hợp.

* Từ khoá: Viêm gan B mạn hoạt động; Kiểu gen; Xét nghiệm sinh hoá, miễn dịch.

Hepatitis B Virus genotype is associated with biochemical, immunological parameters in active chronic B hepatitis

SUMMARY

57 chronic hepatitis B (CHB) patients were enrolled in this study. Hepatitis B virus (HBV) genotypes were detected by restriction fragment length polymorphism (RFLP) PCR and sequencing. Results: there were 4 single genotypes and 7 genotype mixtures have been found A: 10.5%, B: 15.8%, C: 38.6%, D: 7%, AB: 1.75%, AC: 12.3%, AD: 1.75%, AF: 3.5%, BC: 1.75%, CD: 3.5% and CF: 3.5%. Genotype C is associated with HBeAg status (OR = 3.6; 95% confident (1.03 - 13.25), Chisquare = 5.21; $p < 0.05$). HBV DNA in genotype C is significant higher than those in genotype B and mixture. HBV DNA in genotype B is significant lower than those in genotype A and mixture; enzyme transferase ALT in genotype B is higher than those in genotype D and mixture. In addition, enzyme ALT in genotype C is higher than those in genotype D; enzyme AST in genotype A lower than those in genotype B and mixture.

* Key words: Active chronic B hepatitis; Genotype; Biochemical, immunological parameters.

* Bệnh viện 103

** Bệnh viện TWQĐ 108

Phản biện khoa học: TS. Trần Văn Khoa

ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, trên thế giới khoảng 2 tỷ người đã nhiễm HBV, trong đó > 400 triệu người

đang mang HBV mạn tính [1]. Tỷ lệ người mang HBV mạn tính thay đổi theo khu vực địa lý [2]. Khoảng 15 - 40% trường hợp VGBM phát triển thành xơ gan, hoặc ung

thư tế bào gan nguyên phát, trong đó khoảng 1/2 triệu người chết mỗi năm vì ung thư tế bào gan nguyên phát [2].

Ở Việt Nam, tỷ lệ HbsAg (+) ở người khoẻ mạnh từ 10 - 20%, có nơi lên tới 26% [3]. Nhiễm HBV có thể gây nhiều thể bệnh khác nhau, từ người mang virus không triệu chứng đến viêm gan cấp tính tự hồi phục, viêm gan tối cấp tính, viêm gan mạn tính, xơ gan và có thể dẫn đến ung thư gan [4]. Nguyên nhân nào dẫn đến sự khác nhau đó cho đến nay vẫn chưa thật sự được hiểu rõ. Bên cạnh vai trò quan trọng của đáp ứng miễn dịch, vai trò của bản thân virus (đột biến gen và kiểu gen) đang ngày càng được quan tâm.

Cho đến nay, 8 kiểu gen HBV đã được phát hiện dựa trên sự khác biệt 8% nucleotid giữa các kiểu gen và được ký hiệu từ A đến H [5]. Như vậy, khi các BN được phát hiện có HBsAg (+), không có nghĩa là họ đều nhiễm cùng một chủng HBV, mà thực chất là họ có thể nhiễm nhiều chủng HBV và có thể là nhiều kiểu gen, dưới kiểu gen khác nhau.

Để góp phần làm phong phú thêm bản đồ phân bố kiểu gen của HBV trên BN VGBM hoạt động, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài này với các mục tiêu:

- *Đánh giá tỷ lệ phân bố các kiểu gen HBV trên BN VGBM hoạt động.*

- *Tìm hiểu mối liên quan giữa kiểu gen HBV với một số xét nghiệm sinh hoá và miễn dịch.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

57 BN VGBM hoạt động, điều trị tại Bệnh viện TWQĐ 108 được nghiên cứu phân tích kiểu gen HBV. Lựa chọn BN theo các tiêu chuẩn sau: có tiền sử nhiễm HBV kéo dài > 6 tháng liên tục hoặc nhiều đợt tái phát; hiện tại mệt mỏi, chán ăn, gan to chắc, HBsAg (+), anti-HBc IgG (+), men SGOT, SGPT tăng trên 2 lần giới hạn bình thường; sinh thiết gan và giải phẫu bệnh học chứng tỏ tình trạng viêm gan mạn hoạt động. Loại trừ những BN đồng nhiễm HCV, HIV; viêm gan nhiễm độc, xơ gan mất bù, ung thư gan, đang mắc các bệnh khác kết hợp như bệnh máu, đái đường, tim mạch...

2. Phương pháp nghiên cứu.

* *Thiết kế nghiên cứu:* nghiên cứu tiến cứu, mô tả, cắt ngang. BN nghiên cứu được đăng ký vào một phiếu theo dõi riêng có đầy đủ các chỉ tiêu về dịch tễ, lâm sàng và xét nghiệm.

* *Các phương pháp xét nghiệm:*

- Xét nghiệm sinh hoá: AST, ALT, GGT, bilirubin, protein, albumin, globulin, ure, glucose, creatinin..., tiến hành trên hệ thống tự động Olympus AU 640 (Olympus, Nhật), tại Khoa Sinh hoá, Bệnh viện TWQĐ 108.

- Xét nghiệm miễn dịch: HBsAg, HBeAg, anti-HBe, AFP, anti-HIV, anti-HCV... tiến hành tại Khoa Miễn dịch, Bệnh viện TWQĐ 108.

- Sinh thiết gan tại Khoa Truyền nhiễm, Khoa Tiêu hoá kết hợp Khoa Chẩn đoán Chức năng, Bệnh viện TWQĐ 108.

- Mô bệnh học được tiến hành tại Khoa Giải phẫu bệnh, Bệnh viện TWQĐ 108.

- Các xét nghiệm sinh học phân tử: định lượng nồng độ HBV ADN, xác định kiểu gen HBV của HBV được tiến hành tại Khoa Sinh học Phân tử, Bệnh viện TWQĐ 108.

- Phương pháp xét nghiệm định lượng nồng độ HBV ADN: định lượng HBV ADN bằng kỹ thuật RT-PCR trên hệ thống máy RT-PCR ABI 7500 (Applied BioSystem, Mỹ).

- Phương pháp xác định kiểu gen HBV: xác định nhân gen HBV của HBV kết hợp tính đa hình của một đoạn giới hạn [6].

Sau khi cắt sản phẩm PCR bằng enzym Tsp509I, chạy điện di trên thạch (argaro 3%) có nhuộm ethidium bromide 1% và soi dưới đèn soi cực tím.

- Phương pháp giải trình tự gen của HBV: một số trường hợp không xác định được kiểu gen HBV bằng phương pháp nhân gen kết hợp RFLP-PCR, sẽ xác định kiểu gen bằng phương pháp giải trình tự gen. Sử dụng đoạn mã để giải trình tự bao gồm, mỗi xuôi: P1865: 5'-CAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGGGTG GCCTT-3') và mỗi ngược là một trong hai mỗi P2384: '-TTCTTCTTCTAGGGGACCTGCCT CAGTCC-3' và P2384: 5'-TTCTTCTTCTAG-

GGGA-CCTGCCTCATCGT-3'. Quá trình giải trình tự gen HBV tiến hành trên hệ thống CEQ 8800, Beckman Coulter (Mỹ), tại Khoa Sinh học Phân tử, Bệnh viện TWQĐ 108.

* Phương pháp thống kê: phân tích số liệu thu thập trên phần mềm Stview 4.5 và Stata 7.0, khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

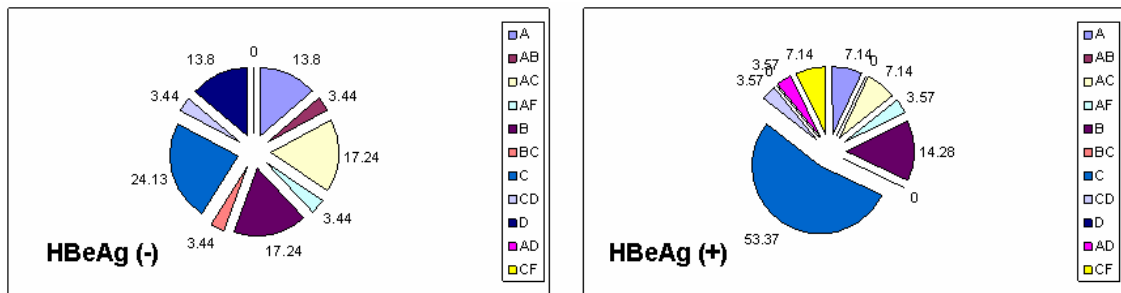
1. Phân bố kiểu gen HBV trên nhóm nghiên cứu.

Trong 57 BN HBV mạn tính, phát hiện 4 kiểu gen có tần suất xuất hiện cao là kiểu gen A, B, C và D. Đồng thời cũng phát hiện thấy có 7 kiểu gen phối hợp khác là AB, AC, AD, AF, BC, CD và CF, trong đó kiểu phối hợp AC gặp nhiều hơn (7 BN = 12,3%). Do số lượng các kiểu gen kết hợp ít nên khi phân tích mối liên quan của kiểu gen HBV với biểu hiện lâm sàng, cận lâm sàng chúng tôi nhóm tất cả các kiểu gen đó thành một nhóm gọi chung là kiểu gen đồng/bội nhiễm.

Bảng 1: Phân bố kiểu gen HBV trên BN VGBM.

Kiểu gen	A	B	C	D	AB	AC	AD	AF	BC	CD	CF
n	6	9	22	4	1	7	1	2	1	2	2
%	10,5	15,8	38,6	7	1,75	12,3	1,75	3,5	1,75	3,5	3,5

2. Mối liên quan giữa kiểu gen HBV với dấu ấn huyết thanh HBeAg.



Hình 1: Phân bố kiểu gen HBV ở 2 nhóm BN HBeAg (-) và HBeAg (+).

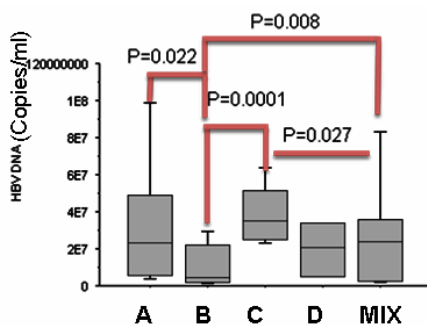
Phân bố kiểu gen không tập trung trên một nhóm BN nào. Tuy nhiên, khi phân thành 2 nhóm kiểu gen C và không C, chúng tôi thấy khác biệt có ý nghĩa thống kê (bảng 2).

Dựa vào phương pháp tính mối liên quan giữa kiểu gen C với tình trạng mang HBeAg trên các nhóm BN, cụ thể BN mang kiểu gen C có tỷ lệ HBeAg (+) cao hơn nhóm có kiểu gen không C (OR = 3,6; độ tin cậy 95% (1,03 - 13,25), Chisquare = 5,21; p < 0,05).

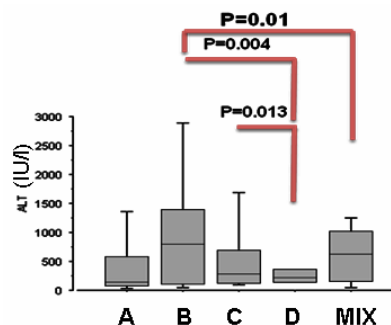
Bảng 2: Phân bố kiểu gen C và không C ở 2 nhóm BN HBeAg (-) và HBeAg (+).

	HBeAg (+) (n = 28)	HBeAg (-) (n = 29)
C	15	7
Không C	13	22

2. Liên quan của kiểu gen với tải lượng virut (HBV ADN).



Hình 2: Mối liên quan kiểu gen với mức độ nhân lên của virut.



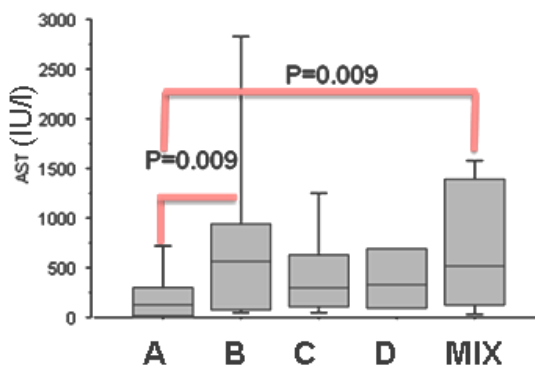
Hình 3: Mối liên quan giữa kiểu gen với enzym ALT.

Khi so sánh mức độ nhân lên của virus giữa các kiểu gen khác nhau, chúng tôi thấy so với nhóm có kiểu gen B và kiểu gen hỗn hợp, BN mang kiểu gen C có nồng độ HBV ADN cao hơn có ý nghĩa (lần lượt là $3,8 \times 10^7 \pm 1,7 \times 10^7$ copies/ml so với $1,06 \times 10^7 \pm 1,7 \times 10^7$ copies/ml, $p = 0,0001$ và $3,8 \times 10^7 \pm 1,7 \times 10^7$ copies/ml so với $2,6 \times 10^7 \pm 3 \times 10^7$ copies/ml, $p = 0,027$). Trong khi đó, kiểu gen B lại có nồng độ HBV ADN thấp nhất và thấp hơn kiểu gen A và kiểu gen hỗn hợp theo thứ tự: $1,06 \times 10^7 \pm 1,7 \times 10^7$ copies/ml so với $3,2 \times 10^7 \pm 3,8 \times 10^7$ copies/ml, $p = 0,02$ và $1,06 \times 10^7 \pm 1,7 \times 10^7$ copies/ml so với $2,6 \times 10^7 \pm 3 \times 10^7$ copies/ml, $p = 0,008$.

4. Mối liên quan giữa kiểu gen HBV với nồng độ men gan ALT.

Nồng độ enzym ALT ở nhóm BN nhiễm virus có kiểu gen B cao hơn có ý nghĩa so với kiểu gen D và kiểu gen phối hợp (1.000 ± 403 so với 254 ± 84 IU/l; $p = 0,004$ và 1.000 ± 403 so với 631 ± 127 IU/l; $p = 0,01$). Đồng thời, ALT ở nhóm BN có kiểu gen C cũng cao hơn có ý nghĩa so với nhóm có kiểu gen D (617 ± 167 so với 254 ± 84 IU/l; $p = 0,013$).

5. Mối liên quan giữa kiểu gen HBV với nồng độ men gan AST.



Hình 4: Mối liên quan giữa kiểu gen HBV với enzym AST.

Nồng độ enzym AST ở nhóm BN nhiễm virus có kiểu gen A thấp hơn có ý nghĩa so với nhóm có kiểu gen B và kiểu gen hỗn hợp (208 ± 129 IU/l so với 871 ± 385 IU/l và 902 ± 278 IU/l; $p = 0,009$).

BÀN LUẬN

Ở Việt Nam, cho đến hiện nay vẫn chưa có một nghiên cứu nào tiến hành khảo sát hệ thống về phân bố kiểu gen của HBV. Theo Lindh M và CS (1999), ở Việt Nam, kiểu gen B và C là chủ yếu [7]. Nghiên cứu của Huy và CS (2004) trên 115 BN người Việt Nam (39 BN viêm gan cấp và 76 BN viêm gan mạn tính) thấy: ở nhóm viêm gan cấp, kiểu gen B chiếm 74,3%, nhóm viêm gan mạn tính kiểu gen C là 81% [8].

Tổng số 57 BN VGBM, chúng tôi phát hiện có 4 kiểu gen đơn là kiểu gen A (10,5%), B (15,8%), C (38,6%), D (7%) và 7 kiểu gen hỗn hợp là: AB, AC, AD, AF, BC, CD và CF, trong đó kiểu phối hợp AC gặp nhiều hơn (7 BN = 12,3%). Như vậy, nếu so sánh kiểu gen HBV đơn thuần, tỷ lệ kiểu gen B và C ở nghiên cứu này thấp hơn so với các tác giả khác. Tuy

nhiên, nếu tính tất cả các kiểu gen đồng/bội nhiễm có B và C thì có 34/57 BN (59,6%) mang kiểu gen C và 11/57 BN (19,3%) mang kiểu gen B.

Tỷ lệ kiểu gen B và C trong nghiên cứu này thấp hơn so với những nghiên cứu trước đây, do đã phát hiện trong đối tượng nghiên cứu không chỉ có kiểu gen đơn thuần mà còn có các kiểu gen đồng/bội nhiễm mà những nghiên cứu khác chưa phát hiện được. Lợi thế của nghiên cứu này là áp dụng phương pháp xác định kiểu gen của Hannoun (2002) [6]. Bằng phương pháp này, Hannoun đã phát hiện > 67% BN có đồng/bội nhiễm hơn 1 kiểu gen. Trong nghiên cứu đó, chính Hannoun cũng so sánh phương pháp phát hiện kiểu gen và thấy: nếu sử dụng phương pháp giải trình tự gen, chỉ phát hiện được 10% BN mang kiểu gen đồng/bội nhiễm. Như vậy, nếu chỉ giải trình tự gen chúng ta bỏ sót 57% trường hợp đồng/bội nhiễm hơn 1 kiểu gen. Ở nghiên cứu này, gặp 16/57 BN (28%) mang kiểu gen đồng/bội nhiễm. So với Yin và CS (2008) gặp 10,6% BN mang kiểu gen đồng/bội nhiễm, số liệu của chúng tôi cao hơn, nhưng so với Hannoun và CS (2002) thì kết quả của chúng tôi thấp hơn. Tuy nhiên, do số liệu nghiên cứu còn hạn chế nên chưa thể đưa ra bất kỳ kết luận nào về sự phân bố các kiểu gen trên quần thể.

Mặc dù số liệu còn chưa đủ lớn, nhưng chúng tôi thấy sự phân bố kiểu gen giữa 2 nhóm HBeAg (+) và HBeAg (-) khác nhau. Trong đó, kiểu gen C có liên quan chặt chẽ với tình trạng mang kháng nguyên này. Cụ thể, nếu mang kiểu gen C, khả năng mang HBeAg cao hơn 3,6 lần so với kiểu gen không C.

Nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng, kiểu gen có ảnh hưởng tới đặc tính sinh học của virus, bệnh cảnh lâm sàng, tỷ lệ chuyển đảo huyết thanh HBeAg, kiểu đột biến trong các vùng precore và core promoter, cũng như đáp ứng với thuốc kháng virus [9]. Nghiên cứu của Suzuki Y và CS (2005) thấy: kiểu gen B thường gặp ở BN VGBM, kiểu gen A hay gặp ở BN viêm gan cấp tính [10]. Kiểu gen C thường gây bệnh nặng hơn kiểu gen B. Một nghiên cứu tại Đài Loan, nơi phân bố chủ yếu 2 kiểu gen B và C, nguy cơ tiến triển thành xơ gan và ung thư gan ở BN nhiễm HBV kiểu gen C thường cao hơn so với kiểu gen B và BN mang kiểu gen C có tỷ lệ dương tính HBeAg cũng như mức độ nhân lên của HBV cũng cao hơn nhóm mang kiểu gen B. Thời gian chuyển đảo huyết thanh ở nhóm có kiểu gen C lâu hơn so với kiểu gen B, tỷ lệ đột biến điểm tại vùng tiền nhân ở nhóm có kiểu gen C cao hơn nhóm có kiểu gen B. Những đột biến này thường thấy ở nhóm bệnh nặng như xơ gan và ung thư gan hơn là ở nhóm BN viêm gan cấp và viêm gan mạn tính. Trong khi đó, những BN < 50 tuổi mang kiểu gen B thường tiến triển thành ung thư gan nhanh hơn kiểu gen C ở cùng độ tuổi.

KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy kiểu gen HBV có liên quan chặt chẽ với mức độ nhân lên của virus, mức độ huỷ hoại tế bào gan. Như vậy, cùng với những kết quả nghiên cứu trước đây, chúng ta có thể thấy kiểu gen HBV có liên quan đến sinh bệnh học, một số biến đổi sinh hoá miễn dịch và sinh học phân tử trên BN VGBM. Tuy nhiên, để có kết luận xác đáng hơn, chúng ta cần nghiên cứu tiến cứu dọc trên số lượng BN lớn hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đào Đình Đức, Lê Đăng Hà, Nguyễn Đức Hiền. Dịch tễ học viêm gan virus ở Việt Nam. Y học Thực hành. 1997, 9, tr.339.
2. Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection-natural history and clinical consequences. N Engl J Med. 2004, 350 (11), pp.29-1118.
3. Lok AS. Prevention of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. Gastroenterology. 2004, 127, pp.9-303.
4. Acharya SK; Panda SK; Saxena A and Gupta SD. Acute hepatic failure in India: a perspective from the East. J Gastroenterol Hepatol. 2000, 15, pp.9-473.
5. Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigene subtypes. J Gene Virol. 1998, 69, pp.2575-2583.
6. Hannoun C, Krogsgaard K, Horal P, Lindh M. Interpreted trial group. Genotype mixtures of hepatitis B virus in patients treated with interferon. J Infect Dis. 2002, 186, pp.9-752.
7. Lindh M, Hannoun C, Dhillon AP, Norkrans G, Horal P. Core promoter mutations and genotypes in relation to viral replication and liver damage in East Asian hepatitis B virus carriers. J Infect Dis. 1999, Apr, 179 (4), pp.775-782.
8. Huy TT, Ushijima H, Quang VX, Ngoc TT, Hayashi S, Sata T, Abe K. Characteristics of core promoter and precore stop codon mutants of hepatitis B virus in Vietnam. J Med Virol. 2004, 74, pp.36-228.
9. Desmond CP, Bartholomeusz A, Gaudieri S, Revill PA, Lewin SR. A systematic review of T-cell epitopes in hepatitis B virus: identification, geneotypic variation and relevance to antiviral therapeutics. Antivir Ther. 2008, 13 (2), pp.75-161.
10. Suzuki Y, Kobayashi M, Ikeda K, Suzuki F, Arfase Y, Akuta N, Hosaka T, Saitoh S, Kobayashi M, Someya T, Matsuda M, Sato J, Watabiki S, Miyakawa Y, Kumada H. Persistence of acute infection with hepatitis B virus genotype A and treatment in Japan. J Med Virol. 2005, 76, pp.33-39.