

XÁC ĐỊNH TỶ LỆ NHIỄM LAO TRONG NHÂN VIÊN Y TẾ BẰNG KỸ THUẬT ELISPOT DỰA TRÊN KHÁNG NGUYÊN TÁI TỔ HỢP CFP10/ESAT6

**ĐỖ THỊ QUỲNH ANH, VŨ THỊ KIM LIÊN,
TRẦN THỊ HẢI ÂU, LÊ HUY HOÀNG, ĐẶNG ĐỨC ANH**
Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương
NGUYỄN VĂN HUNG, HOÀNG THỊ PHƯỢNG
Bệnh viện Phổi Trung ương

TÓM TẮT

Quá trình hoàn thiện kỹ thuật miễn dịch gắn enzyme (ELISPOT) dựa trên kháng nguyên đặc hiệu vi khuẩn lao đã được tiến hành để xác định tỷ lệ nhiễm *M.tuberculosis* trên nhân viên y tế. Kết quả cho thấy quy trình ELISPOT sử dụng kháng nguyên tái tổ hợp CFP10/ESAT6 đạt độ tương đồng 92% so với kit thương mại. Cán bộ y tế làm việc trong môi trường bệnh viện lao có nguy cơ nhiễm lao cao gấp 3 lần so với nhóm tình nguyện không tiếp xúc bệnh nhân lao ($p < 0.05$).

Từ khóa: Quy trình ELISPOT; kháng nguyên tái tổ hợp; phản ứng mantoux.

SUMMARY

The aims of this paper were to identify proportion of tuberculous infection and its risk factors among HCWs by in-house ELISPOT assay comparing to QuantiFERON-TB Gold In-Tube™. We found that The proportion of TB infection among HCWs as estimated by in-house ELISPOT assay and QuantiFERON-TB Gold In-Tube™ was 43.2% and 44.6% respectively. Agreement between ELISPOT assay and QuantiFERON-TB Gold In-Tube were evaluated by Kappa statistic (Kappa: 0.841; 95% CI 0.719-0.963). Working in tuberculosis hospital were 3 times more likely to have tuberculous infection (OR: 3.048; 95% CI: 1.115-8.333; $p = 0.03$) compared to those who was not working as HCWs.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Lao đã được OSHA (Occupational Safety and Health Administration) công nhận là một trong những bệnh liên quan đến nghề nghiệp. Ở Việt Nam, bệnh lao được xếp vào nhóm các bệnh nhiễm khuẩn nghề nghiệp nằm trong danh mục 25 bệnh nghề nghiệp được bảo hiểm (1). Kết quả theo dõi Mantoux tại một bệnh viện lao tuyến tỉnh cho thấy sự thay đổi đường kính liên quan đến thời gian làm việc của những nhân viên y tế này (1). Một nghiên cứu được tiến hành trên toàn thể nhân viên y tế tại Bệnh viện Phổi Hà Nội năm 2009 cho thấy tỷ lệ nhiễm lao là 47 % (6). Tỷ lệ này cũng được báo cáo tại một số nước trên thế giới khi điều tra tình hình lây nhiễm lao trong nhân viên y tế (2,3,4).

Kỹ thuật xác định INF gamma phóng thích (INF gamma released ELISA) dựa trên kháng nguyên đặc hiệu vi khuẩn lao CFP10/ESAT6 đã đang được thay thế phản ứng mantoux trong chẩn đoán nhiễm lao tại các nước phát triển do có độ đặc hiệu cao đặc biệt trên các đối tượng có chủng ngừa BCG. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành xác định tỷ lệ nhiễm lao trong nhân viên y tế bằng bộ sinh phẩm in-house ELISPOT dựa trên kháng nguyên tái tổ hợp CFP10/ESAT6. Kết quả được so sánh với kit thương mại (Quantiferon TB gold test, Celletis).

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Lựa chọn đối tượng nghiên cứu.

Nhân viên y tế (n = 74) đang công tác tại Bệnh viện Phổi Trung ương và đối tượng khỏe mạnh, không có tiền sử tiếp xúc với bệnh nhân lao (n = 30) được tiến hành sàng lọc nhiễm lao bằng kit Quantiferon TB gold test (Cellestis - úc) và bộ sinh phẩm ELISPOT

2. Thu thập mẫu và tách chiết tế bào đơn nhân.

5 ml máu ngoại vi được chuyển vào ống lấy máu chứa 10 đơn vị chất chống đông heparin/1 ml máu. Tế bào bạch cầu đơn nhân (PBMC) được thu nhận bằng phương pháp ly tâm đẳng tỷ trọng Ficoll paque. Xác định số lượng PBMCs bằng phương pháp nhuộm trypan blue.

3. Kỹ thuật ELISpot.

- Làm ướt phiến ELISpot (MAIPS 4510, Milipore) bằng ethanol 35% (25µl/giếng) trong 2 phút. Rửa 5 lần bằng PBS 7,4.

- Sau đó phủ bản bằng kháng thể kháng INF gamma (Mabtech) (15µg/ml; 50 µl/giếng) qua đêm ở 4°C. Rửa 5 lần bằng PBS 7,4, sau đó block bằng môi trường RPMI 10% FCS ở 37°C trong 30 phút, tiếp tục rửa 5 lần bằng PBS 7,4

- PBMCs được hòa trong 03 ống chứa môi trường RPMI (10% FCS; 0,1% kháng sinh kháng nấm). Bổ xung kháng nguyên vào các ống theo sơ đồ sau: ống 1: Kháng nguyên tái tổ hợp ESAT6/CFP10 (10µg/ml); ống 2, PHA (10 µg/ml) - Chứng dương; ống 3: Chứng âm.

Ủ qua đêm ở 37°C, 5% CO₂.

- Trộn đều các ống có chứa tế bào và kháng nguyên, sau đó chuyển 150µl (250.000 tế bào) mỗi ống vào phiến ELISpot. Ủ 20 - 24 giờ ở 37 °C; 5% CO₂, sau đó rửa 5 lần bằng PBS 7,4.

- Bổ xung anti INF gamma - biotin detection antibody (Mabtech) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Phiến được ủ nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Tiếp tục rửa phiến 5 lần bằng PBS 7,4. Bổ xung 50 µl streptavidin APL (1:1000), ủ 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Rửa 5 lần bằng PBS 7,4. Hiện màu bằng BCIP/NBT (Promega) trong vòng 30 phút. Dừng phản ứng, sau đó đọc kết quả bằng máy đọc ELISpot.

KẾT QUẢ

1. Đặc điểm đối tượng nghiên cứu.

Tổng số 74 cán bộ, nhân viên đang làm việc tại Khoa lao, Khoa vi sinh và nhân viên phục vụ (nhà ăn, tổ vệ sinh) của Bệnh viện Phổi Trung ương đã được tiến hành làm xét nghiệm kit quantiferon và ELISPOT, trong đó nữ là 60 người (81.1%), 58 người trong độ tuổi từ 25 - 54 (78%), 4 người có trình độ bác sỹ (5,4%) 47 người có chuyên môn y tá, điều dưỡng viên và kỹ thuật viên, chiếm 63%.

Trong nghiên cứu này, đối tượng khỏe mạnh (n = 30) là những người không có tiền sử tiếp xúc với bệnh nhân lao, hiện đang công tác, học tập tại Trường cao đẳng Y tế Hà Nội và Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương, có độ tuổi dao động từ 22 - 47 tuổi. Trong số 30 tình nguyện viên, tỷ lệ nữ là 24/30, chiếm 80%.

2. Kết quả so sánh bộ sinh phẩm ELISPOT và kit thương mại (Quantiferon, celletis).

Để xác định độ tương đồng giữa bộ sinh phẩm ELISPOT và kit thương mại, nhóm nghiên cứu đã tiến hành thực hiện kỹ thuật ELISPOT và kit thương mại trên 84 đối tượng tham gia nghiên cứu bao gồm nhân viên y tế và tình nguyện viên.

Bảng 1. Độ tương đồng giữa bộ sinh phẩm ELISPOT và kit thương mại

In-house ELISPOT assay	QuantIFERON-TB Gold In-Tube™.		Total	Kappa (95% confidence interval)
	Negative	Positive		
Negative	43	3	47	Kappa: 0.807 95% CI (0.679 - 0.934)
Positive	5	33	37	
Total	48	36	84	

Kết quả ở bảng 1 cho thấy trong tổng số các đối tượng tham gia nghiên cứu đồng thời thực hiện 2 xét nghiệm, tỷ lệ dương tính với bộ sinh phẩm ELISPOT là 37/84, chiếm 44,04%; tỷ lệ dương tính với kit thương mại là 36/84, chiếm 42,85%. Nhìn chung độ tương đồng giữa 2 kỹ thuật đạt 92% (Kappa: 0.807).

3. Kết quả xác định yếu tố nguy cơ nhiễm lao trong nhân viên y tế.

Kết quả xét nghiệm bộ sinh phẩm ELISPOT trên nhân viên y tế tại bệnh viện phổi TW và nhóm tình nguyện, không tiếp xúc với nguồn lây.

Kết quả xét nghiệm ELISPOT dương tính trên nhân viên y tế đang công tác tại bệnh viện phổi TW là 32/74 người, chiếm tỷ 43.2%. Kết quả dương tính trên nhóm tình nguyện là 6/30 người, chiếm 20%. Kết quả ở bảng 2 cho thấy nhóm cán bộ y tế làm việc trong môi trường bệnh viện lao có nguy cơ nhiễm lao cao gấp 3 lần so với nhóm tình nguyện, không tiếp xúc bệnh nhân lao.

Bảng 2. Kết quả xét nghiệm bộ sinh phẩm ELISPOT trên nhân viên bệnh viện phổi TW và nhóm không tiếp xúc

Biến số	Bệnh viện phổi TW (%)	Nhóm không tiếp xúc (%)	OR (95% CI)
Kết quả xét nghiệm bộ sinh phẩm ELISPOT dương tính	43.2	20	3.048 (1.115-8.333) P < 0.05

Mối liên quan giữa số năm công tác và kết quả dương tính với bộ sinh phẩm ELISPOT.

Chúng tôi đã tiến hành phân tích để xem xét số năm công tác của nhân viên y tế tại bệnh viện phổi TW với kết quả xét nghiệm nhiễm *M.tuberculosis* bằng bộ sinh phẩm ELISPOT.

Bảng 3. Năm công tác và kết quả dương tính với bộ sinh phẩm ELISPOT

Năm công tác	Kết quả ELISPOT				OR	95% CI
	Dương tính		Âm tính			
	Tần số	%	Tần số	%		
≤ 5 năm	15	35	28	65	Ref	
5-10 năm	6	50	6	50	1.867	0.512-6.807 (p>0.05)
≥ 10 năm	11	58	8	42	2.567	0.849-7.775 (p>0.05)

Kết quả ở bảng 4 cho thấy nhóm cán bộ y tế làm việc trong môi trường bệnh viện lao trên 10 năm có tỷ lệ nhiễm lao cao nhất (57.89%) trong khi tỷ lệ này là 34.88% đối với nhóm cán bộ có thời gian công tác ≤ 5 năm. Tuy nhiên không tìm thấy sự khác biệt có ý

ngĩa thống kê giữa các nhóm có thời gian công tác khác nhau.

Liên quan giữa tính chất công việc và kết quả ELISPOT dương tính

Trong nghiên cứu này, chúng tôi chia đối tượng nghiên cứu thành 3 nhóm đối tượng theo tính chất công việc. Nhóm điều trị là nhóm có tiếp xúc trực tiếp với bệnh nhân, nhóm này bao gồm toàn bộ nhân viên y tế đang công tác tại Khoa lao của bệnh viện. Nhóm thứ 2 là nhóm có tiếp xúc với bệnh phẩm, nhóm này bao gồm cán bộ thuộc Khoa Vi sinh của bệnh viện. Nhóm thứ 3 là nhóm hành chính, phục vụ, là nhóm được coi ít tiếp xúc trực tiếp với nguồn lây. Nhóm này bao gồm cán bộ làm công tác vệ sinh và khu vực nhà ăn của bệnh viện. Kết quả được trình bày ở bảng 4

Bảng 4: Liên quan giữa tính chất công việc và kết quả ELISPOT

Kết quả ELISPOT	Khoa vi sinh	Khoa lao	Vệ sinh và nhà ăn	P
Dương tính	12 (41.3%)	15 (53.6%)	5 (29.4%)	>0.05
Âm tính	17 (58.7%)	13 (46.4%)	12 (70.6%)	
Tổng	29 (100%)	28 (100%)	17 (100%)	

Kết quả ở bảng 4 cho thấy tỷ lệ dương tính tại khoa lao và khoa vi sinh là 53 % và 41 %, trong khi tỷ lệ này là 29.4 % đối với nhóm cán bộ làm công tác vệ sinh và phục vụ nhà ăn của bệnh viện. Tuy nhiên không thấy sự sai khác có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm đối tượng.

Liên quan giữa nghề nghiệp và kết quả ELISPOT dương tính

Để phân tích xác định mối liên hệ giữa nghề nghiệp và nguy cơ nhiễm *M.tuberculosis*, chúng tôi tiến hành chia đối tượng nghiên cứu thành 4 nhóm đối tượng: Nhóm bác sỹ; Nhóm y tá và điều dưỡng; Nhóm kỹ thuật viên; Nhóm phục vụ vệ sinh và nhà ăn bệnh viện.

Bảng 5: Liên quan giữa nghề nghiệp và kết quả ELISPOT

Kết quả ELISPOT	Bác sỹ	Y tá, điều dưỡng	Kỹ thuật viên	Nhân viên phục vụ	P
Dương tính	3 (75%)	14 (56%)	8 (36 %)	7 (30%)	>0.05
Âm tính	1 (25%)	11 (44%)	12 (64%)	16 (70%)	
Tổng	4 (100%)	25 (100%)	22 (100%)	23 (100%)	

Kết quả ở bảng 5 cho thấy các bác sỹ làm việc tại Khoa lao và Khoa vi sinh có tỷ lệ dương tính cao nhất (75%), tiếp theo là nhóm y tá và điều dưỡng viên, là những người hàng ngày phải tiếp xúc trực tiếp với nguồn lây (56%). Nhóm nhân viên phục vụ vệ sinh và khu vực nhà ăn bệnh viện có tỷ lệ thấp nhất (30%).

BÀN LUẬN

1. Đánh giá khả năng ứng dụng bộ sinh phẩm ELISPOT trong xác định tỷ lệ nhiễm *M.tuberculosis* trên nhân viên y tế.

Kháng nguyên đặc hiệu ESAT-6, CFP-10 được mã hóa bởi gene vùng biệt hóa RD 1 có mặt ở *Mycobacterium tuberculosis* mà không có ở chủng vaccin BCG và đa số các *Mycobacterium* không gây lao. Nồng độ IFN-gamma sản xuất bởi các tế bào lympho T sau khi được tiếp xúc với kháng nguyên đặc hiệu ở những người đã nhiễm lao có giá trị chẩn đoán và tiên lượng về tình trạng nhiễm lao tiềm ẩn. Kit

quantiferon của hãng Celletis đã được chứng minh là có giá trị ứng dụng cao trong chẩn đoán nhiễm lao do kháng nguyên được sử dụng trong bộ kit là các kháng nguyên đặc hiệu vi khuẩn lao (ESAT6; CFP10), không có phản ứng chéo với chủng BCG và đa số các chủng mycobacteria trong môi trường. Chính vì vậy kit Quantiferon (Celletis) đã được tổ chức phòng chống bệnh tật Hoa Kỳ (CDC) khuyến cáo sử dụng thay phần ứng mantoux trong xác định nhiễm lao. Tuy nhiên cho đến nay, tại Việt Nam, phản ứng mantoux vẫn được sử dụng trong điều tra xác định tỷ lệ nhiễm lao thể tiềm ẩn do giá thành bộ kit quantiferon tương đối cao. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành xây dựng bộ sinh phẩm ELISPOT, sử dụng kháng nguyên tái tổ hợp CFP10/ESAT6 trong chẩn đoán nhiễm lao so sánh với kit thương mại. Kết quả cho thấy độ tương đồng của bộ sinh phẩm ELISPOT và kit thương mại đạt 92%. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Hill và cs khi chứng minh rằng kháng nguyên tái tổ hợp CFP10/ESAT6 có giá trị tương đương “overlapping peptide” trong chẩn đoán nhiễm lao dựa trên đáp ứng miễn dịch tế bào (5)

Phản ứng mantoux đã được chứng minh ở nhiều nghiên cứu là có độ đặc hiệu thấp đặc biệt trên các đối tượng có chủng ngừa BCG. Dương tính giả sẽ dẫn đến những lo lắng và biện pháp can thiệp không cần thiết ảnh hưởng đến kinh tế xã hội. Đặc biệt đối với những nghiên cứu điều tra dịch tễ học lao, tỷ lệ dương tính giả, âm tính giả sẽ ảnh hưởng đến xác định chỉ số nguy cơ nhiễm lao của chương trình chống lao Quốc gia. Trong nghiên cứu này, tỷ lệ nhiễm lao trong nhân viên y tế tại bệnh viện phổi TW xác định bằng kỹ thuật ELISPOT là 43.2%, phù hợp với nghiên cứu của Lưu Thị Liên và cs (2009) cho tỷ lệ dương tính với kit quantiferon ở nhân viên y tế tại bệnh viện phổi Hà Nội là 47%, thấp hơn đáng kể khi so sánh với tỷ lệ mantoux dương tính tại cùng thời điểm (63%). Trong một nghiên cứu khác tại bệnh viện lao và bệnh phổi Thái Bình của Nguyễn Thị Thu Dung và cs (1), tỷ lệ mantoux dương tính lên tới 94%.

2. Thực trạng lây nhiễm lao trong nhân viên y tế tại bệnh viện phổi TW.

Kết quả so sánh tỷ lệ nhiễm lao giữa nhóm cán bộ y tế tại bệnh viện lao và nhóm đối chứng, không tiếp xúc với nguồn lây đã khẳng định có nguy cơ lây nhiễm lao thực sự ở nhóm nhân viên y tế (nguy cơ nhiễm lao cao gấp 3 lần so với nhóm không tiếp xúc; p<0.05). Kết quả này phù hợp với một nghiên cứu mới đây của Nguyễn Thị Thu Dung và cs (2012); Lưu Thị Liên và cs (2009) khi tiến hành thử phản ứng mantoux cho nhân viên y tế đang công tác tại bệnh viện lao cho thấy tỷ lệ mantoux dương tính cao hơn rõ rệt (1,6) khi so sánh với nhóm chứng.

Bệnh lao chủ yếu lây qua đường hô hấp, những người sống chung hoặc sống gần người mắc lao phổi có vi khuẩn trong đờm thì khả năng hít phải vi khuẩn lao của người bị bệnh thải ra ngoài không khí sẽ nhiều hơn những người khác, việc các nhân viên y tế của Bệnh viện chuyên điều trị bệnh lao hàng ngày khám bệnh, điều trị và chăm sóc bệnh nhân lao đã làm họ có

nguy cơ nhiễm lao một cách rõ rệt. Càng làm việc lâu trong môi trường có nguồn lây trực tiếp là bệnh nhân lao ho khạc ra vi khuẩn thì khả năng nhiễm lao càng cao. Trong nghiên cứu này, tỷ lệ nhiễm lao ở nhóm cán bộ công tác trên 10 năm là 57.8% trong khi ở nhóm cán bộ công tác dưới 5 năm, tỷ lệ này là 34.8%. Tương tự như vậy, tuy cùng làm trong môi trường bệnh viện lao, nhưng nhóm cán bộ công tác tại khoa lao và khoa vi sinh, tiếp xúc trực tiếp với nguồn lây có tỷ lệ dương tính (53.6 và 41.3%) cao hơn so với nhóm cán bộ làm công tác vệ sinh và phục vụ tại nhà ăn của bệnh viện (29.4%).

KẾT LUẬN

Kỹ thuật ELISPOT sử dụng kháng nguyên tái tổ hợp CFP10/ESAT6 đạt độ tương đồng cao so với kit thương mại và hoàn toàn có thể được sử dụng trong xác định tỷ lệ nhiễm lao.

Nhân viên y tế tại bệnh viện phổi TW có biểu hiện nhiễm lao rõ rệt hơn nhóm chúng ($p < 0.05$).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Thu Dung (2012); Thực trạng lây nhiễm lao ở bệnh viện lao và bệnh phổi Thái Bình, một số giải pháp can thiệp, Luận án tiến sỹ y học.
2. Pai M, Gokhale K, Joshi R, Dogra S, Kalantri S, Mendiratta DK, Narang P, Daley CL, Granich RM, Mazurek GH, Reingold AL, Riley LW, Colford JM Jr (2005) Mycobacterium tuberculosis infection in health care workers in rural India: Comparison of a whole blood interferon gamma assay with tuberculin skin testing. 8; 293 (22): 2746-55.
3. Kayanja, H.K; Debanne, S.; King, (2005). Tuberculosis infection among health care workers in Kampala, Uganda. The International Journal of Tuberculosis and Lung disease, 9 (6): 686-688.
4. Hashemi, H, Mamanian.M, Jamal-Omidia, Alizadeha and Nazaria (2008). M. Prevalence of Tuberculosis infection among health care workers in Hamedan, West of Iran. International of Journal of Infectious Disease, December; 12(1): 338.
5. Hill. C. Philip, Dolly Jackson-Sillah, et al (2005). ESAT-6/CFP-10 Fusion Protein and Peptides for Optimal Diagnosis of Mycobacterium tuberculosis Infection by Ex Vivo Enzyme-Linked Immunospot Assay in The Gambia.
6. Lưu Thị Liên; Naoto Keichovà cs (2009) Prevalence and risk factors for tuberculosis infection among Hospital workers in Hanoi, Viet nam. PloS ONE 4(8): e 6798.