

XÂY DỰNG GIÁ TRỊ THAM CHIẾU SỐ LƯỢNG TẾ BÀO LYMPHO T, LYMPHO B VÀ TẾ BÀO NK Ở TRẺ EM DƯỚI 5 TUỔI

Nguyễn Thanh Bình^{1,2,✉}, Trần Thu Phương³, Lê Thị Minh Hương²,
Đặng Thị Hà², Nguyễn Thị Duyên², Lương Thị Nghiê²

¹Trường Đại học Y Hà Nội

²Bệnh viện Nhi Trung ương

³Viện Sốt Rét Ký Sinh Trùng Côn Trùng Trung ương

Nghiên cứu mô tả cắt ngang trên 308 trẻ em từ 0 đến 60 tháng tuổi được chia làm 5 nhóm với tỷ lệ nam nữ tương đương trong mỗi nhóm. Mẫu máu ngoại vi của các đối tượng nghiên cứu được đếm số lượng tế bào Lympho T (CD3+) và dưới nhóm Lympho TCD4 (CD3+CD4+CD8-); Lympho TCD8 (CD3+CD4-CD8+), số lượng tế bào Lympho B (CD3-CD19+) và tế bào NK (CD3-CD16&56+) bằng phương pháp đếm tế bào dòng chảy trên máy BD FACS Canto-II sử dụng bộ KIT BD Multitest 6 color TBNK. Giá trị tham chiếu của các chỉ số xét nghiệm này được xác định theo hướng dẫn của CLSI. Kết quả đã xây dựng được khoảng tham chiếu chỉ số số lượng Lympho T; Lympho TCD4; Lympho TCD8; Lympho B và tế bào NK máu ngoại vi trẻ em Việt Nam dưới 5 tuổi và ứng dụng khoảng tham chiếu này tại Bệnh viện Nhi Trung ương.

Từ khóa: Giá trị tham chiếu, Lympho T, Lympho B, tế bào NK, Bệnh viện Nhi Trung ương

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Xét nghiệm là một trong những yếu tố rất cần thiết giúp các bác sĩ trong việc chẩn đoán, điều trị và tiên lượng bệnh. Việc đánh giá kết quả xét nghiệm cần phải so sánh với giá trị tham chiếu tương ứng. Tuy nhiên ngoài đặc điểm quần thể đối tượng, có nhiều yếu tố khác ảnh hưởng đến giá trị tham chiếu như phương pháp xét nghiệm, máy móc trang thiết bị, vật tư hóa chất, kỹ thuật viên xét nghiệm. Vì vậy, việc xây dựng giá trị tham chiếu cho các chỉ số xét nghiệm phù hợp với điều kiện riêng tại các phòng xét nghiệm là hết sức cần thiết.

Hiện nay, trên thế giới đã có nhiều quốc gia xây dựng giá trị tham chiếu các chỉ số miễn dịch ở người, đặc biệt ở trẻ em trong đó có các chỉ số về số lượng các tế bào lympho T, tế bào

Lympho B và tế bào NK máu ngoại vi đặc trưng riêng cho từng tộc người và quốc gia đó.¹⁻⁶ Tại Việt Nam, công trình điều tra cơ bản các giá trị sinh học người Việt Nam bình thường thập kỷ 90 thế kỷ XX được xuất bản vào năm 2003 đã công bố một số chỉ số về số lượng các tế bào Lympho T, Lympho B máu ngoại vi.⁷ Sau đó đã có một số tác giả bước đầu nghiên cứu số lượng các tế bào lympho T và dưới nhóm, Lympho B ở quần thể thanh niên khỏe mạnh người Việt Nam nhưng đa số các nghiên cứu này đều chưa khảo sát số lượng tế bào NK.⁸ Chưa có một nghiên cứu nào ở Việt Nam về các chỉ số số lượng các loại tế bào này ở trẻ em đặc biệt trẻ em dưới 5 tuổi là đối tượng mà các chỉ số huyết học, miễn dịch có nhiều biến đổi theo tuổi.

Bệnh viện Nhi Trung ương là cơ sở khám chữa bệnh hàng đầu ở Việt Nam cho đối tượng trẻ em. Tuy nhiên, khoảng tham chiếu các chỉ số số lượng tế bào miễn dịch cho xét nghiệm tế

Tác giả liên hệ: Nguyễn Thanh Bình,

Trường Đại học Y Hà Nội

Email: nguyenthanhbinh@hmu.edu.vn

Ngày nhận: 22/10/2020

Ngày được chấp nhận: 30/10/2020

bào T, B và NK bằng kỹ thuật đếm tế bào dòng chảy vẫn đang được tham khảo từ các hãng máy và từ một số nghiên cứu khác.⁹ Chính vì vậy việc xây dựng giá trị tham chiếu cho các chỉ số xét nghiệm này để ứng dụng tại Bệnh viện Nhi Trung ương và cho các cơ sở y tế khác tham khảo là rất cần thiết. Vì vậy, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này với 2 mục tiêu: (1) Xây dựng giá trị tham chiếu số lượng tế bào lympho T và dưới nhóm máu ngoại vi ở trẻ em dưới 5 tuổi. (2) Xây dựng giá trị tham chiếu số lượng tế bào Lympho B và tế bào NK máu ngoại vi ở trẻ em dưới 5 tuổi.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

Tiêu chuẩn chọn

- Trẻ em đến khám sức khỏe tại Bệnh viện Nhi Trung ương tuổi từ 0 tháng đến 60 tháng tuổi thỏa mãn các điều kiện sau:

- + Không có các bệnh lý nhiễm khuẩn
- + Không có các bệnh lý huyết học, miễn dịch, dị ứng, tự miễn

Tiêu chuẩn loại trừ

- Suy dinh dưỡng hoặc các bệnh mãn tính khác (suy gan, suy thận...).

2. Phương pháp

- Mô tả cắt ngang

Cỡ mẫu nghiên cứu

- Chọn mẫu thuận tiện gồm 308 trẻ chia làm 5 nhóm, mỗi nhóm 60 trẻ, nam và nữ tương đương.

Nhóm 1: 0 - 6 tháng tuổi; Nhóm 2: 7 - 12 tháng tuổi; Nhóm 3: 13 - 24 tháng tuổi; Nhóm 4: 25 - 36 tháng tuổi; Nhóm 5: 37 - 60 tháng tuổi

Quy trình, kỹ thuật nghiên cứu

- Trẻ em được lấy 2 ml máu tĩnh mạch chống đông bằng EDTA, vận chuyển về Khoa Huyết học, Bệnh viện Nhi Trung ương làm xét nghiệm đếm tế bào Lympho T, Lympho B và tế

bào NK.

-50 µl máu được trộn với 20 µl kháng thể của bộ KIT BD Multitest 6 Color TBNK trong ống nghiệm, ủ trong tối 15 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó thêm 450µl BD FACS lysing 1X, vortex nhẹ rồi tiếp tục ủ trong tối 15 phút ở nhiệt độ phòng. Ống mẫu được phân tích trên máy BS FACS Canto-II sử dụng phần mềm BD FACS Canto Clinical. Dựa trên các marker đặc hiệu để xác định quần thể và số lượng các tế bào Lympho T (CD3+); Lympho TCD4 (CD3+CD4+CD8-); Lympho TCD8 (CD3+CD4-CD8+); Lympho B (CD3-CD19+) và tế bào NK (CD3-CD16&56+).

Các biến số, chỉ số nghiên cứu

- Tuổi (theo tháng tuổi), giới
- Số lượng tế bào Lympho T (CD3+); Lympho TCD4 (CD3+CD4+CD8-); Lympho TCD8 (CD3+CD4-CD8+); Lympho B (CD3-CD19+) và tế bào NK (CD3-CD16&56+).

3. Xử lý số liệu

- Dùng phần mềm thống kê SPSS 16.0 để phân tích số liệu.

- Phát hiện và loại bỏ số liệu lạc: Biểu đồ Stem and Leaf Plot

- Các chỉ số định lượng trình bày theo giá trị trung bình và độ lệch chuẩn (\pm SD).

- Kiểm định tính chuẩn bằng: Test Kolmogorov – Smirnov

- Xác định khoảng tham chiếu theo hướng dẫn của CLS.¹⁰

* Thời gian và địa điểm nghiên cứu

- Từ tháng 8/2019 đến tháng 10/2020 tại khoa Huyết học, Bệnh viện Nhi Trung ương.

4. Đạo đức nghiên cứu

- Các đối tượng tham gia nghiên cứu là trẻ em dưới 5 tuổi phải có sự đồng ý của bố mẹ hoặc người giám hộ.

- Các thông tin liên quan đến đối tượng nghiên cứu được mã hóa và giữ bí mật.

III. KẾT QUẢ

1. Đặc điểm của nhóm nghiên cứu

Bảng 1. Đặc điểm nhóm đối tượng nghiên cứu

Nhóm tuổi	n	Tuổi (tháng)		Giới		p
		SD	Nam (n; %)	Nữ (n; %)		
0 – 6 th	60	2,92	1,37	30 (50,0%)	30 (50,0%)	> 0,05
7 – 12 th	62	9,97	1,64	30 (48,4%)	32 (51,6%)	> 0,05
13 – 24 th	61	17,03	3,07	30 (49,1%)	31 (50,9%)	> 0,05
25 – 36 th	65	29,71	3,22	36 (55,4%)	29 (44,6%)	> 0,05
37 – 60 th	60	47,37	7,69	33 (55,0%)	27 (45,0%)	> 0,05

Tuổi trung bình của 4 nhóm lần lượt là 2,92 tháng; 9,97 tháng; 17,03 tháng; 29,71 tháng và 47,37 tháng tuổi. Tỷ lệ nam và nữ trong mỗi nhóm không khác biệt có ý nghĩa thống kê.

2. Giá trị tham chiếu số lượng tế bào Lympho T và dưới nhóm

Bảng 2. Giá trị tham chiếu tế bào Lympho T và dưới nhóm

Nhóm tuổi	Lympho T (tế bào/ μ L)		Lympho TCD4 (tế bào/ μ L)		Lympho TCD8 (tế bào/ μ L)	
	$\bar{X} \pm SD$	Khoảng tham chiếu	$\bar{X} \pm SD$	Khoảng tham chiếu	$\bar{X} \pm SD$	Khoảng tham chiếu
0 – 6 th	3381,02 \pm 997,24	1386,54 – –5375,50	2205,79 \pm 695,31	815,17 – 3596,41	1086,17 \pm 444,29	197,59 – 1974,75
7 – 12 th	3682,80 \pm 1279,38	1124,04 – 6241,56	2221,13 \pm 822,34	576,45 – 3865,81	1289,88 \pm 490,82	380,24 – 2271,52
13 – 24 th	3212,87 \pm 859,57	1493,73 – 4932,01	1803,61 \pm 526,31	750,99 – 2856,23	1190,01 \pm 404,37	381,27 – 1998,75
25 – 36 th	2782,45 \pm 816,51	1149,43 – 4415,47	1484,27 \pm 432,82	618,61 – 2349,93	1104,09 \pm 342,61	418,87 – 1789,31
37 – 60 th	2493,07 \pm 824,42	844,23 – 4141,91	1394,93 \pm 465,90	481,11 – 2308,75	940,64 \pm 345,52	249,60 – 1631,68

- Số lượng trung bình các tế bào Lympho T, Lympho TCD4, Lympho TCD8 đều tăng lên ở giai đoạn 7 – 12 tháng tuổi so với lứa tuổi 0 – 6 tháng tuổi, sau đó giảm dần ở các nhóm tuổi sau.

- Giá trị các chỉ số này ở các nhóm tuổi đều phân bố tuân theo quy luật chuẩn, do đó khoảng tham chiếu sẽ được xác định là $\bar{X} \pm 2SD$.

3. Giá trị tham chiếu số lượng tế bào Lympho B và tế bào NK

Bảng 3. Khoảng tham chiếu tế bào Lympho B và tế bào NK

Nhóm tuổi	Lympho B (tế bào/ μ L)	Khoảng tham chiếu		Tế bào NK (tế bào/ μ L)
	($\bar{X} \pm SD$)			($\bar{X} \pm SD$)
0 – 6 th	1179,67 \pm 456,82	266,03 – 2093,31	425,60 \pm 195,37	34,86 – 816,34
7 – 12 th	1417,90 \pm 681,08	55,70 – 2780,10	389,59 \pm 170,19	49,21 – 729,97
13 – 24 th	1278,53 \pm 396,21	486,10 – 2070,94	440,33 \pm 214,75	156,91 – 895,00*
25 – 36 th	1108,12 \pm 404,09	445,15 – 1965,69*	365,09 \pm 163,67	37,75 – 629,43
37 – 60 th	805,48 \pm 270,85	263,76 – 1347,20	410,93 \pm 158,36	94,21 – 727,65

- Số lượng trung bình các tế bào Lympho B tăng lên ở giai đoạn 7 – 12 tháng tuổi so với lứa tuổi 0 – 6 tháng tuổi, sau đó giảm dần ở các nhóm tuổi sau. Số lượng trung bình các tế bào NK không thay đổi có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm tuổi.

- (*) Giá trị các chỉ số Lympho B ở nhóm tuổi 25 – 36 tháng tuổi và chỉ số tế bào NK ở nhóm tuổi 13 – 24 tháng phân bố không tuân theo quy luật chuẩn. Khoảng tham chiếu được xác định bằng 0,025 (n + 1) và 0,975 (n + 1). Các chỉ số các tế bào ở các nhóm tuổi khác đều phân bố tuân theo quy luật chuẩn và khoảng tham chiếu sẽ được xác định bằng $\bar{X} \pm 2SD$.

IV. BÀN LUẬN

Chúng tôi tiến hành trên 308 đối tượng được chia làm 5 nhóm tuổi dựa theo đặc điểm phát triển sinh lý của trẻ và tham khảo một số nghiên cứu tương tự khác trên thế giới.^{2,3} Số lượng mỗi nhóm trên dưới 60 đối tượng nam nữ tương đương nhau. Theo hướng dẫn của CLSI, việc phân chia các giá trị tham chiếu ra nhiều nhóm nhỏ theo giới tính đòi hỏi mỗi nhóm phải đảm bảo cỡ mẫu đủ lớn.¹⁰ Thực tế lâm sàng khoảng tham chiếu các chỉ số huyết học, miễn dịch chủ yếu xây dựng và áp dụng theo lứa tuổi. Hơn nữa, chúng tôi cũng đã lấy số lượng nam và nữ với tỷ lệ tương đương nhau trong mỗi nhóm nên số liệu có thể đại diện chung cho cả 2 giới.

Giá trị trung bình và khoảng tham chiếu số lượng tế bào Lympho T và dưới nhóm Lympho TCD4, Lympho TCD8 và tế bào Lympho B trong nghiên cứu của chúng tôi đều có xu hướng thay đổi giống nhau. Các giá trị này cao nhất ở nhóm 7 - 12 tháng tuổi, sau đó giảm dần ở các nhóm

tuổi sau và thấp nhất ở nhóm 37 - 60 tháng tuổi. Khi phân tích mối tương quan về sự thay đổi số lượng các chỉ số này với tuổi thấy đều có sự tương quan nghịch giữa số lượng Lympho T, Lympho TCD4, Lympho TCD8 và Lympho B với tuổi ở mức độ trung bình với $p < 0,05$ và hệ số tương quan tương ứng là $r = -0,361$; $r = -0,453$; $r = -0,187$ và $r = -0,334$. Như vậy với tuổi càng tăng thì số lượng các tế bào này càng giảm. Tuy nhiên giá trị trung bình các chỉ số này ở nhóm tuổi cao nhất trong nghiên cứu của chúng tôi từ 37 – 60 tháng tuổi đều cao hơn so với số liệu ở người lớn Việt Nam khỏe mạnh được công bố trong nghiên cứu của tác giả Phạm Đăng Khoa năm 1997.⁸ Có thể do trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng phương pháp đếm tế bào dòng chảy nên độ nhạy cao hơn so với phương pháp miễn dịch huỳnh quang trực tiếp trong nghiên cứu của tác giả Phạm Đăng Khoa.⁸ Một lý do nữa có thể

số lượng các loại tế bào này tiếp tục giảm sau 5 tuổi cho đến tuổi trưởng thành. Khi so sánh với một số nghiên cứu trên đối tượng trẻ em ở một số quốc gia khác, chúng tôi thấy rằng xu hướng thay đổi này cũng thấy trên đối tượng trẻ em ở Trung Quốc, Cameroon, Malawi tức là số lượng cao nhất ở nhóm 7 - 12 tháng tuổi, sau đó giảm dần ở các lứa tuổi lớn hơn.¹⁻³ Tuy nhiên các nghiên cứu của Mỹ, Thổ Nhĩ Kỳ và Ý lại cho thấy đa số số lượng tế bào Lympho T và dưới nhóm, Lympho B giảm dần theo lứa tuổi, không có sự tăng lên ở nhóm 7 - 12 tháng tuổi sau đó mới giảm dần như trong nghiên cứu của chúng tôi và một số nước khác ở Châu Á và Châu Phi.⁴⁻⁶ Lứa tuổi 7 - 12 tháng tuổi là lứa mà miễn dịch từ mẹ truyền sang đã cạn, trẻ phải tăng cường và hoàn thiện hệ thống miễn dịch để chống lại các yếu tố gây bệnh. Sự giống và khác biệt này có thể liên quan đến các đặc điểm riêng về chủng tộc và/hoặc điều kiện sống.

Đối với tế bào NK, nghiên cứu của chúng tôi thấy rằng số lượng trung bình thay đổi dao động giữa các nhóm tuổi. Khi phân tích mối tương quan giữa số lượng trung bình và tuổi, chúng tôi thấy không có sự tương quan giữa 2 đại lượng này với $p > 0,05$ và $r = - 0,037$. Sự thay đổi không rõ rệt của số lượng tế bào NK này cũng được báo cáo trong các nghiên cứu trên trẻ em ở các nước Trung Quốc, Cameroon và Malawi.¹⁻³ Một số nghiên cứu ở các quốc gia khác thấy số lượng tế bào NK giảm dần như nghiên cứu trên trẻ em ở Mỹ, Thổ Nhĩ Kỳ, Ý.⁴⁻⁶ Như vậy xu hướng thay đổi số lượng các tế bào Lympho T và dưới nhóm, Lympho B và tế bào NK ở trẻ em dưới 5 tuổi Việt Nam tương tự như ở trẻ em Trung Quốc, Cameroon, Malawi và khác với trẻ em ở Mỹ, Thổ Nhĩ Kỳ và Ý ở nhóm 7 – 12 tháng tuổi.

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định được số lượng trung bình, độ lệch chuẩn và xây dựng được

khoảng tham chiếu về chỉ số số lượng các tế bào miễn dịch chủ yếu trong máu ngoại vi bao gồm Lympho T, Lympho TCD4, Lympho TCD8, Lympho B và tế bào NK trên đối tượng trẻ em Việt Nam từ 0 đến 60 tháng tuổi. Giá trị tham chiếu này được ứng dụng tại Khoa Huyết học Bệnh viện Nhi Trung ương và là số liệu tham khảo cho các nghiên cứu và cơ sở y tế khác.

Lời cảm ơn

Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn Khoa Huyết Học - Bệnh viện Nhi Trung ương đã tạo điều kiện giúp đỡ chúng tôi thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Yuan Ding, Lina Zhou, Yu Xia, Wei Wang, Ying Wang, Li Li, Zhongxiang Qi, Linqing Zhong, Jinqiao Sun, Wenjing Tang, Fangfang Liang, Haijuan Xiao, Tao Qin, Ying Luo, Xuezhen Zhao, Zhou Shu, Ying Ru, Rongxin Dai, Hong Wang, Yanping Wang, Yongjie Zhang, Suqian Zhang, Cong Gao, Hongqiang Du, Xuan Zhang, Zhaolong Chen. Reference values for peripheral blood lymphocyte subsets of healthy children in China. *J Allergy clin immunol.*2018;973e8. DOI: 10.1016/j.jaci.2018.04.022.
2. Bertrand Sagnia, Francis Ateba Ndongo, Suzie Ndiang Moyo Tetang, Judith Ndongo Torimiro, Cristiana Cairo, Irenée Domkam, Geraldine Agbor, Emmanuel Mve, Olive Tocke, Emilien Fouda, Odile Ouwe Missi Oukem - Boyer, and Vittorio Colizzi. Reference Values of Lymphocyte Subsets in Healthy, HIV - Negative Children in Cameroon. *Clin Vaccine Immunol.* 2011; May; 18(5): 790–795. DOI: 10.1128/CVI.00483 - 10. PMID: PMC3122514. PMID: 21411603.
3. Wilson L. Mandala, Jenny M. MacLennan, Esther N. Gondwe, Steven A. Ward, Malcolm E. Molyneux, and Calman A. MacLennan. Lymphocyte subsets in healthy Malawians:

Implications for immunologic assessment of HIV infection in Africa. *J Allergy Clin Immunol.* 2010; Jan; 125(1): 203–208. Doi: 10.1016/j.jaci.

4. Shearer W, Rosenblatt H, Gelman R, Oyomopito R, Plaeger S, Stiehm ER. Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age - the Pediatric AIDS Clinical Trials Group P1009 study. *J Allergy Clin Immunol.* 2003; 112:973 - 80. DOI: 10.1016/j.jaci. 2003.07.003.

5. Aydan Ikinciogullari, Tanil Kendirli, Figen Doğu, Yonca Eğin, Ismail Reisli, Sükrü Cin, Emel Babacan. Peripheral blood lymphocyte subsets in healthy Turkish children. *Turk J Pediatr;* Apr - Jun 2004;46(2):125 - 30.

6. Tosato F, Buccioli G, Pantano G, Putti MC, Sanzari MC, Basso G, et al. Lymphocytes

subsets reference values in childhood. *Cytometry A.* 2015; 87:81 - 5. DOI: 10.1002/cyto.a.22520.

7. Lê Nam Trà và CS. Các giá trị sinh học người Việt Nam bình thường thập kỷ 90 - thế kỷ XX. *Dự án điều tra cơ bản.* 2000;155p.

8. Phạm Đăng Khoa và CS. Nghiên cứu số lượng lympho bào mang dấu ấn CD3+ CD4, CD8+ & CD19+ ở một số nhóm thanh niên Việt Nam. *Y học Việt Nam.* 1997; 3(214): p. 61 - 65.

9. Bệnh viện Nhi Trung ương. *Sổ tay khoảng tham chiếu.* 2019; trang 27.

10. CLSI. Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory: Approved Guideline, 3rd ed. CLSI Document C28 - A3. Wayne, PA: *Clinical and Laboratory Standards Institute.* 2008; p.1 - 19.

Summary

ESTABLISH THE REFERENCE VALUE OF T LYMPHOCYTE, B LYMPHOCYTE AND NK CELL COUNTS IN CHILDREN UNDER 5 YEARS OLD

A cross-sectional study on 308 Vietnamese children aged 0-60 month-old were divided into 5 groups with an equal male and female percentage in each group. Peripheral blood was collected from the subjects to analyze the T lymphocyte (CD3+), TCD4 lymphocyte (CD3+CD4+CD8-), TCD8 lymphocyte (CD3+CD4-CD8+), B lymphocyte (CD3-CD19+) and NK cell (CD3-CD16&56+) counts by flow cytometry method on BD FACS Canto-II machine using BD Multitest 6 color TBNK KIT. The reference values were determined following the Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) Guidelines. The peripheral blood T lymphocyte; TCD4 lymphocyte; TCD8 lymphocyte; B lymphocyte and NK cell counts reference in children under 5 years old was established and applied in Vietnam National Children's Hospital

Keywords: Reference value; T lymphocyte; B lymphocyte; NK cell, Vietnam National Children's Hospital