

ĐẶC ĐIỂM LÂM SÀNG, SINH HỌC NHIỄM VIRUS VIÊM GAN B Ở TRẺ EM VÀ NGƯỜI LỚN CÁC DÂN TỘC TẠI XÃ BẢN CẨM, BẢO THẮNG, LÀO CAI

Nguyễn Văn Bằng*, Nguyễn Thị Vân Anh*, Lê Thị Kim Dung**, Lương Công Sỹ***

TÓM TẮT

Biểu hiện lâm sàng và cận lâm sàng liên quan đến virus viêm gan B tại cộng đồng người dân tộc còn chưa được nghiên cứu nhiều. **Mục tiêu:** (1). Đánh giá tình trạng lâm sàng và thay đổi hình thái gan trên siêu âm ở các đối tượng nhiễm HBV tại một cộng đồng đa dân tộc miền núi phía Bắc. (2). Thăm dò sự biến đổi một số chỉ số sinh học liên quan đến nhiễm HBV ở các đối tượng này. **Đối tượng, phương pháp:** khám lâm sàng, siêu âm và xét nghiệm một số chỉ số sinh học liên quan đến virus viêm gan B ở 126 người mang HBsAg trong số 1146 đối tượng sống tại xã Bản Cẩm, huyện Bảo Thắng, tỉnh Lào Cai. **Kết quả và kết luận** có rất ít biểu hiện bất thường ở những đối tượng này về lâm sàng (3,4% nói chung và 0,6% ở trẻ em) và hình ảnh siêu âm (11,2% nói chung và 8,9 ở trẻ em). Tăng enzyme gan gấp trong 47,6% (60/126 đối tượng), trong đó có 29/45 trẻ em có enzyme tăng (64,4%, $p < 0,05$), nhưng chỉ có 20/126 người có tăng cả 2 enzyme (15,9%). Có 46,3% (57/123) đối tượng bị HBeAg(+), nhưng trẻ em có tỷ lệ HBeAg(+) là 71,1% (32/45) cao hơn hẳn trong quần thể ($p < 0,01$). Có 36 đối tượng (28,6%) kết quả định lượng HBV-DNA(+) và có đến 72,2% (26/36) có nồng độ virus cao ở mức cần điều trị. Người Phù Lá có tỷ lệ HBsAg(+) và HBeAg(+) cao hơn cả người Kinh và người Dáy, nhưng tỷ lệ tăng enzyme và nồng độ HBV-DNA thấp và không khác biệt so với người Kinh và người Dáy. Đây là số liệu nghiên cứu lâm sàng và cận lâm sàng đầu tiên tại Việt Nam được tiến hành trên người mang HBsAg ở cộng đồng nhiều dân tộc.

Từ khóa: biểu hiện lâm sàng, siêu âm, chỉ số sinh học, người mang HBsAg, cộng đồng nhiều dân tộc.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Viêm gan do virus viêm gan B (gọi tắt là viêm gan B: HBV) là một bệnh nhiễm trùng nặng và phổ biến trên Thế giới, gây hậu quả nặng nề (suy gan cấp, xơ gan, suy gan mạn và ung thư ga). Hàng năm có trên 4 triệu người bị nhiễm HBV cấp tính, khoảng 1 triệu người mang virus mạn chết vì viêm gan B hoạt tính, xơ gan hoặc ung thư gan [6,7]. Ở Việt Nam đã có rất nhiều nghiên cứu về tỷ lệ và biểu hiện lâm sàng của tình trạng nhiễm HBV ở nhiều nhóm đối tượng khác nhau, cho thấy tỷ lệ nhiễm HBsAg giao động từ 6-25%, trung bình là 15-20% quần thể nghiên cứu với triệu chứng lâm sàng rất nghèo nàn [2-4]. Tuy nhiên, hầu hết các nghiên cứu chỉ mới được tiến hành tại đồng bằng và trên các đối tượng là bệnh nhân trong bệnh viện [1-4]. Có rất ít nghiên cứu về tình trạng lâm

sàng và các thay đổi sinh học liên quan đến viêm gan ở đối tượng bình thường đang sống và làm việc tại cộng đồng [5]. Vì vậy, chúng tôi nghiên cứu đề tài này trên tất cả các đối tượng trong từng hộ gia đình tại xã Bản Cẩm, huyện Bảo Thắng, tỉnh Lào Cai, nhằm: (1). Đánh giá tình trạng lâm sàng và thay đổi hình thái gan trên siêu âm ở các đối tượng nhiễm HBV tại một cộng đồng đa dân tộc miền núi phía Bắc; (2). Thăm dò sự biến đổi một số chỉ số sinh học liên quan đến nhiễm HBV ở các đối tượng này.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

- Đối tượng nghiên cứu là: 1146 đối tượng của 312 hộ

*ĐH Y Hà Nội, **ĐH Y Thái Nguyên, ***Sở Y tế tỉnh Lào Cai

gia đình của 06 thôn thuộc xã Bàn Cầm.

- Số đối tượng được tính toán theo công thức chọn mẫu nghiên cứu, áp dụng công thức tính cỡ mẫu cho nghiên cứu cộng đồng cắt ngang: $\{N = Z^2 \cdot P(1-P) / d^2\}$.

- Đơn vị nghiên cứu là xã Bàn Cầm, huyện Bảo Thắng, được chọn ngẫu nhiên trong số 39 xã-thị trấn vùng II của tỉnh Lào Cai.

2. Phương pháp nghiên cứu

- Tất cả các thành viên của tất cả các hộ gia đình trong các bản được chọn vào nghiên cứu đều được lấy mẫu máu xét nghiệm phát hiện HBsAg. Các mẫu máu được ly tâm tách lấy huyết thanh tại chỗ và bảo quản lạnh chuyển về Labo của khoa Vi sinh, Bệnh viện Bạch Mai, tiến hành xác định kháng nguyên HBsAg bằng kỹ thuật ELISA. Toàn bộ những trường hợp có HBsAg (+) được khám lâm sàng, siêu âm gan-mật.

- Kỹ thuật siêu âm bằng máy siêu âm 2D đen trắng để đánh giá hình ảnh tổn thương gan, đồng thời đánh giá chuẩn độ men ALT, AST và xác định HBeAg, kháng thể kháng HBeAg (HBeAb). Những trường hợp có men gan tăng tiếp tục được xét nghiệm định tính HBV-AND trong huyết thanh; những trường hợp định tính dương tính sẽ được định lượng HBV-DNA bằng các kỹ thuật sinh học phân tử khuếch đại chuỗi (PCR). Hệ thống xét nghiệm xác định virus viêm gan

B và các bệnh lý gan liên quan tại Labo của Khoa Vi sinh. Bệnh viện Bạch Mai, Hà Nội là một trong những đơn vị đạt tiêu chuẩn quốc gia.

3. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng các thuật toán thống kê Y-Sinh học. Xác định các yếu tố nguy cơ bằng kỹ thuật phân tích hồi quy logistic đơn và đa biến.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Có 1146 đối tượng nghiên cứu (482 trẻ đến 18 tuổi và 664 thành viên khác) trong 312 hộ gia đình được chọn vào nghiên cứu tại xã Bàn Cầm. Tỷ lệ mang HBsAg trong quần thể nghiên cứu này là 126/1146 (11,0%). Tỷ lệ mang HBsAg ở trẻ <18 tuổi là 9,3%, không khác nhau giữa trai và gái. Ở người lớn, tỷ lệ mang HBsAg là 12,2%, cao hơn rõ rệt so với ở trẻ ($p < 0,04$); nam có tỷ lệ mang cao hơn nữ một cách có ý nghĩa.

Những biểu hiện lâm sàng có liên quan đến bệnh lý viêm gan phát hiện ở 126 đối tượng HbsAg (+) trong đó có 45 trẻ đến 18 tuổi được trình bày trong bảng 1. Kết quả khám siêu âm gan mật ở 125 đối tượng HbsAg (+) được tóm tắt trong bảng 2. Tình trạng enzyme gan ở 126 đối tượng HbsAg (+) được trình bày trong bảng 3.

Bảng 1. Kết quả khám lâm sàng 126 đối tượng mang HbsAg

Triệu chứng lâm sàng	Chung trong quần thể		Trẻ em	
	n	%	n	%
Nhức đầu	6	0,5	1	0,2
Chán ăn	3	0,3	0	0,0
Nôn/buồn nôn	3	0,3	0	0,0
Mệt mỏi	7	0,6	0	0,0
Rối loạn tiêu hoá	3	0,3	0	0,0
Nước tiểu sẫm màu	2	0,2	0	0,0
Phân nhạt màu	0	0,0	0	0,0
Rối loạn giấc ngủ/ngủ kém	4	0,4	0	0,0
Vàng mắt	2	0,2	0	0,0
Vàng da	2	0,2	0	0,0
Gan to	1	0,1	1	0,2
Lách to	1	0,1	1	0,2
Tổng số	39	3,4	3	0,6

Nhận xét: bảng 1 cho thấy chỉ có 3,4% người mang HBsAg có triệu chứng lâm sàng, nhưng các triệu chứng này đều rất hiếm gặp và không đặc hiệu. Ở trẻ em, chỉ có 0,6% có biểu hiện lâm sàng và cũng là những triệu chứng rất không đặc hiệu.

Bảng 2. Kết quả siêu âm gan mật ở những đối tượng mang HBsAg

Siêu âm gan mật	Chung trong quần thể	Ở trẻ em	p
	n (%)	n (%)	
Bình thường	101 (80,8%)	41 (91,1)	<0,05
Gan thô	14(11,2%)	3 (0,67%)	
Sỏi túi mật	2(1,6%)	0 (0%)	
Gan thô + sỏi túi mật	7(5,6%)	0 (0%)	
Gan + lách to	1(0,8%)	1(0,22%)	
Tổng số	125	45	

Nhận xét: đa số những người nhiễm HBV có hình ảnh siêu âm gan bình thường. Chỉ có 24/125 (19,2%) người mang HBsAg và được thăm khám siêu âm có triệu chứng, trong đó chủ yếu là hình ảnh nhu mô gan không đồng nhất trên siêu âm (gan thô), chiếm 21/24 trường hợp.

Bảng 3. Tình trạng enzyme gan ALT, AST ở người mang HBsAg

Tình trạng enzyme gan	Chung trong quần thể		Trẻ em	
	n	%	n	%
HBsAg (+), enzyme gan bình thường	66	52,4	16	35,6
HBsAg (+) enzyme gan tăng (>40UI)	60	47,6	29	64,4
- Chỉ tăng AST	40	31,7	23	51,1
- Tăng cả AST và ALT	20	15,9	6	13,3
Tổng số	126	100,0	45	100,0

Nhận xét: có 66/126 người (52,4%) mang HBsAg nhưng nồng độ các enzyme gan hoàn toàn bình thường. Chỉ có 60 người (47,6%) có tăng enzyme gan, trong đó tăng AST đơn độc là 40 (31,7%) và tăng cả AST và ALT là 20 (15,9%). Tỷ lệ tăng enzyme gan ở 45 trẻ <18 tuổi là 64,4% (29/45) nhưng chủ yếu là tăng AST đơn thuần (23/29).

Bảng 4. Tình trạng HBV-DNA, HBeAg và anti-HBeAg ở các trường hợp có enzym gan tăng

Các chỉ số nghiên cứu	Trong cả quần thể (+)/n (%)	Riêng ở trẻ em (+)/n (%)	p
HBeAg	57/123 (46,3)	32/45 (71,1)	<0,01
Định tính HBV-DNA	32 (26,0)	8 (22,9)	>0,05
Định lượng HBV-DNA	36	15	
- Không phát hiện (<500 copies/ml)	3/36 (8,3)	1/15 (6,7)	>0,05
- 500 - <10 ⁵ copies/ml	7/36 (19,4)	1/15 (6,7)	<0,05
- >10 ⁵ copies/ml	26/36 (72,2)	13/15 (86,7)	>0,05
Anti-HBeAg (HBeAb)	10/36 (27,8)	1/15 (6,7)	<0,01

Nhận xét: trong số 60 người ALT và/hoặc AST bất thường (>40UI) tiếp tục được đánh giá tình trạng HBV-DNA bằng xét nghiệm định tính có 40 trường hợp kết quả HBV-DNA định tính (+) và đều được định lượng HBV-DNA bằng kỹ thuật Real-time PCR. Có 36 đối tượng có kết quả định tính HBV-DNA (+) và đều

được xét nghiệm anti-HBeAg (HBeAb). Kết quả có 10 trường hợp HBeAb (+) và 26 trường hợp HBeAb (-) (bảng 4).

Bảng 5. Tổng hợp các biểu hiện xét nghiệm bất thường theo các dân tộc (*)

Dân tộc	Kinh n=371	Dáy n=369	Dao n=221	Phù Lá n=51	Khác n=119	Tổng 1146	p
HBsAg dương tính (%)	48/371 (12,9)	45/369 (12,2)	9/221 (4,1)	10/51 (19,6)	14/119 (11,8)	126 (11,0)	<0,001
HBeAg dương tính (%)	25/46 (54,3)	18/45 (40,0)	2/9 (22,2)	9/10 (90,0)	3/13 (23,1)	123 (100)	<0,001
Viêm gan* (%)	9/46 (19,6)	7/45 (15,6)	1/9 (11,1)	1/10 (10,0)	2/13 (15,4)	20/123 (16,3)	>0,05
HBV-DNA(+) (%)	15/46 (32,6)	13/45 (28,9)	3/9 (33,3)	1/10 (10,0)	4/14 (28,6)	36/123 (29,3)	>0,05
HBV-DNA >105/ml (%)	11/46 (23,9)	10/45 (22,2)	3/9 (33,3)	1/10 (10,0)	1/14 (7,1)	26/123 (21,1)	>0,05
Viêm gan cấp**	1	0	0	0	0	0	

(*) Không trình bày trong bảng này số liệu của 30 đối tượng H'mông từ 7 hộ gia đình, vì không có ai HbsAg (+).

* Có triệu chứng sau: (1) HBsAg(+), (2) men gan tăng cao >1,5 lần bình thường.

** Khi có các biểu hiện sau: (1) HBsAg(+), (2) men gan tăng cao gấp hàng chục lần bình thường, (3) có các dấu hiệu lâm sàng nổi bật: mệt, hoàng đàn, tiểu vàng, gan to...

Nhận xét: tuy tỷ lệ mang HBsAg và HBeAg ở các đối tượng người Kinh, Dáy và Phù Lá cao hơn hẳn ở dân tộc Dao và các dân tộc khác, nhưng tỷ lệ người có biểu hiện viêm gan, tỷ lệ người có nồng độ virus cao >105/ml máu không khác nhau có ý nghĩa thống kê giữa các dân tộc.

IV. BÀN LUẬN

Đây là nghiên cứu đầu tiên về cả lâm sàng và sinh học của các đối tượng là trẻ em và người lớn ngay tại công đồng đa dân tộc vùng cao. Khám lâm sàng và siêu âm gan, đường mật cho 126 trường hợp có HBsAg (+), chúng tôi nhận thấy: biểu hiện các triệu chứng rất nghèo nàn, chỉ 3,4% trường hợp có biểu hiện triệu chứng lâm sàng, ở trẻ em thì hầu như không có biểu hiện lâm sàng nào. Cũng cần nhấn mạnh là các triệu chứng lâm sàng này rất không đặc hiệu và có thể gặp trong các bệnh lý khác. Qua siêu âm gan-mật, có tới 81% bình thường, 11,1% có hình ảnh gan cấu trúc thô (cũng rất không đặc hiệu); ở trẻ em chỉ có 0,67% có hình ảnh gan cấu trúc thô. Theo một số nghiên cứu trong bệnh viện, có khoảng 90% trường hợp nhiễm HBV không triệu chứng và 10% có triệu chứng viêm gan cấp; 0,1-1% là viêm

gan bùng phát [2,3]. Khả năng xuất hiện viêm gan B mạn sau khi nhiễm HBV thay đổi theo lứa tuổi. Trẻ nhiễm HBV sau đẻ thường không có biểu hiện triệu chứng nhưng 90% sẽ trở thành người mang virus mạn tính. Trẻ lớn và những người lớn khi nhiễm HBV thường có biểu hiện lâm sàng rõ rệt hơn nhưng nguy cơ thành mạn chỉ có khoảng 10% [6,6].

Những biểu hiện về hình ảnh siêu âm gan mật ở 125 đối tượng HbsAg (+), chỉ có 24 (4,9%), trong đó trẻ em chỉ có 4/45 (1,1%) có biểu hiện bất thường nhưng nhẹ và hoàn toàn không đặc hiệu. Nghiên cứu của Nguyễn Thiện Hùng tại thành phố Hồ Chí Minh cũng có nhận xét tương tự là nhìn chung thay đổi cấu trúc gan trong viêm gan tuy đa dạng nhưng tỷ lệ thay đổi không nhiều và không đặc hiệu.

Chúng tôi xét nghiệm enzyme gan ở 126

trường hợp có HBsAg (+) có 60 người (47.6%) có ALT và/hoặc AST tăng hơn bình thường (>40UI), có 57/126 trường hợp HBeAg (+) (45.2%). Đánh giá tình trạng HBV-DNA bằng xét nghiệm định tính cho 40 trường hợp có enzyme gan bất thường với kết quả HBV-DNA (+) là 36 người (26%). Tỷ lệ mang HBeAg trong nghiên cứu này là 46.3% (57/123), nhưng tỷ lệ này ở trẻ em là 71,1% (32/45) cao hơn hẳn so với tỷ lệ chung ($p < 0,01$) và tương ứng là có sự đảo ngược về tỷ lệ mang kháng thể kháng HBeAg ở người lớn cao hơn hẳn ở trẻ em ($p < 0,01$). Chưa thấy nghiên cứu nào nêu hiện tượng này. Tất cả 36 đối tượng có kết quả HBV-DNA (+) đều được xét nghiệm HBeAb, kết quả có 10 trường hợp (17,8%) HBeAb (+) và 26 trường hợp HBeAb(-) (72,2 %). Tuy nhiên, cũng cần nói rõ là do nghiên cứu cắt ngang một lần, không thể định lại sau 6 tháng như quy định chặt chẽ theo định nghĩa, nên chưa thể kết luận chắc chắn rằng những đối tượng mang HBsAg và có chuẩn độ các enzyme gan tăng trong nghiên cứu này của chúng tôi là “viêm gan mạn tính”, nhưng trên thực tế, đa số các đối tượng này không có biểu hiện lâm sàng và tiền sử bệnh gan cấp tính, nên có thể giả định đó là những trường hợp viêm gan mạn tính.

Chúng tôi thấy tuy tỷ lệ người nhiễm HBV (11% hay 126/1146) có sự khác nhau giữa các dân tộc, nhưng tỷ lệ người viêm gan B mạn giữa các dân tộc (trong số 20/126 hay 15,9% số người có cả 2 enzyme gan tăng và enzyme ALT cao gấp 1,5 lần bình thường) không khác nhau về mặt thống kê, dù tỷ lệ này ở người Kinh là khá cao (9/48 hay 18,8%). Tỷ lệ

này cao hơn so với kết quả nghiên cứu ở người Kinh của Trần Duy Hưng và Cao Văn Viên tại nhà máy xi-măng Hoàng Thạch năm 2003 (10%) [5], nhưng thấp hơn so với ước tính của Vũ Bằng Đình [2]. Từ kết quả nghiên cứu của chúng tôi, có thể ước tính ở tỉnh Lào Cai với 589.327 dân, tỷ lệ mang HBsAg là 11% thì có khoảng 64.826 người mang HBsAg mạn tính và 15,9% trong số này (tức khoảng 10.307 người) bị viêm gan B mạn tính có nguy cơ tử vong cao trong tương lai bởi các biến chứng K gan và xơ gan. Đây là con số đáng báo động đối với các nhà lâm sàng, dịch tễ học và các nhà chức trách y tế tỉnh nhà.

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu lâm sàng, siêu âm và xét nghiệm một số chỉ số sinh học liên quan đến virus viêm gan B ở 126 người mang HBsAg trong số 1146 đối tượng sống tại xã Bản Cầm, huyện Bảo Thắng, tỉnh Lào Cai chúng tôi nhận thấy có rất ít biểu hiện bất thường về lâm sàng và hình ảnh siêu âm ở những đối tượng này. Có 20/126 người có tăng cả 2 enzyme gan (15,9%), 36 người có HBV-DNA định lượng (+) trong đó có đến 72,2% (26/36) có nồng độ virus cao ở mức cần điều trị. Nghiên cứu này cũng cho thấy dù người Phù Lá có tỷ lệ HBsAg rất cao nhưng tỷ lệ tăng enzyme gan và nồng độ virus trong máu người mang HBV không cao mà còn thấp hơn người các dân tộc khác. Số liệu thu được từ nghiên cứu đầu tiên này góp phần vào dữ liệu thông tin tham khảo cho các nghiên cứu tiếp theo ở cộng đồng nhiều dân tộc Việt Nam ♦

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Mai Anh, Hồ Văn Cư, Nguyễn Anh Tuấn (2002), “Tình hình nhiễm virus viêm gan B ở cộng đồng qua điều trị tại một số tỉnh miền Bắc năm 2000, 2002”, TTYD, số chuyên đề bệnh y dược, tr 1-4.
2. Vũ Bằng Đình, Nguyễn Trọng Chính, Hoàng Văn Điện (1999), “Tình hình nhiễm các virus viêm gan trên các bệnh nhân mắc viêm gan virus cấp, bệnh gan mạn tại khoa nội truyền nhiễm bệnh viện 108 qua 10 năm 1990-1999”, Đề tài nghiên cứu khoa học cấp BQP, tr 17.
3. Lê Thị Thanh Thủy, Nguyễn Gia Khánh (2006), “Nghiên cứu đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng bệnh viêm gan virus B mạn tính ở trẻ em”, Nhi khoa, tập 14, Hội Nhi khoa Việt Nam, tr 127-131.



4. Lê Thị Thanh Thủy, Nguyễn Gia Khánh (2006). "Nhận xét về tổn thương mô bệnh học- viêm gan virus mãn tính ở trẻ em". *Nhi khoa, tập 14, Hội Nhi khoa Việt Nam, tr 131-134.*
5. Cao Văn Viên, Trần Duy Hưng (2003). "Khảo sát tình hình nhiễm trùng viêm gan virus B tại công ty xi măng Hoàng Thạch (Hải Dương) năm 2002". *Tạp chí Y học Dự phòng, tập XIII, số 1(59) phụ bản, tr 147-150*
6. Hay William W, Levis Myron J (2006). "Hepatitis B", *Currenr Pediatric Diagnosis & Treatment, pp 675-676.*
7. Yeoh E.K (1990), *Hepatitis B virus infection in children. Vaccine, 8, pp. 29-30.*

SUMMARY

CLINICAL AND BIOLOGICAL FEATURES OF HEPATITIS B VIRUS INFECTION IN ADULTS AND CHILDREN OF A MULTI-ETHNIC COMMUNITY (BAN CAM, BAO THANG, LAO CAI)

*Clinical and biological features from HBsAg positive subjects from multi-ethnic community was hardly reported so far in Vietnam. **Objective:** (1). To examine clinical and ultrasound manifestation in those who were HBsAg positive among a multi-ethnic population, and (2). To explore abnormal biological changes related to liver and HBV in those HBsAg positive subjects. **Subjects and methods:** clinical and ultrasound examinations as well as a set of biological parameters (hepatic enzymes, HBeAg, as well as HBV-DNA load and HBeAb in those who were quantitatively HBV-DNA positive) were carried out on 126 HBsAg positive subjects from a multi-ethnic population of 1146 inhabitants of a mountainous community. **Results and conclusion** there were few clinical (3.4% in general and 0.6% in children) and ultrasound (11.2% in general and 8.9% in children signs and symptoms in 126 HBsAg positive subjects. Elevated titer of both ALT and AST was seen only in 20/126 (15.9%). HBeAg(+) was seen in 57/123 (46.3%) but 32/45 (71.1%) in children ($p < 0.01$). Among 36 HBV-DNA positive subjects, high viral load ($> 10^5$ copies/ml) was seen in 26 persons (72.2%). Subjects from Phula ethnic had been found to be of higher in term of the rate of HbsAg (+) but not in ALT and AST titers as well as HBV-DNA load than King, Day and other ethnics in the some community. The results from present study contribute to database for next studies of the fied in multi-ethnic communities in Vietnam.*

Key-words: clinical and ultrasound signs, biological changes, HbsAg (+), multi-ethnic population.