

Effect and Relationship of Seasons on the High Risk of Ovarian Hyperstimulation Syndrome After Oocyte Retrieval in Patients With Polycystic Ovary Syndrome. *Front. Endocrinol.* 11:610828.

5. Sun B, Ma Y, Li L, et al (2021). Factors Associated with Ovarian Hyperstimulation Syndrome (OHSS) Severity in Women With Polycystic Ovary Syndrome Undergoing IVF/ICSI.

Front. Endocrinol. 11:615957.

6. Klaus Fiedler, Diego Ezcurra (2016). Prevention and treatment of moderate and severe ovarian hyperstimulation syndrome: a guideline. *Fertil Steril*, 2016;106:1634–1647.
7. Golan A, et al (2010), A modern classification of OHSS, *Reproductive BioMedicine*, Vol 19, No 1, pp: 28-32.

ỨNG DỤNG KỸ THUẬT MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION XÁC ĐỊNH ĐỘT BIẾN GEN α THALASSEMIA Ở BỆNH NHÂN HBH

Lê Thanh Hằng*, Lê Thị Phương*,
Trần Huy Thịnh*, Trần Văn Khánh*

TÓM TẮT

Bệnh α -thalassemia thường là gây nên là do đột biến xóa đoạn gen HBA1 và HBA2 làm thiếu hụt chuỗi α -globin cấu thành nên phân tử Hemoglobin. Tùy theo số lượng chuỗi α bị thiếu hụt mà mức độ biểu hiện lâm sàng của bệnh ở các cấp độ khác nhau. Xác định đột biến gen trên bệnh nhân sẽ giúp chẩn đoán xác định và tư vấn di truyền cho các thành viên gia đình bệnh nhân. Trong nghiên cứu này, kỹ thuật Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) đã được áp dụng để xác định đột biến trên 21 bệnh nhân mắc bệnh α -thalassemia dựa vào các chỉ số huyết học, điện di huyết sắc tố và các dấu hiệu lâm sàng. Nghiên cứu đã xác định được 14/21 bệnh nhân mang kiểu gen --SEA/- $\alpha^{3,7}$, 7/21 bệnh nhân mang kiểu gen --SEA/- $\alpha^{4,2}$. MLPA là kỹ thuật khá hiệu quả để phát hiện các đột biến mất đoạn trên bệnh α thalassemia ở Việt Nam.

Từ khóa: bệnh α -thalassemia, HbH, MLPA, --SEA/- $\alpha^{3,7}$, --SEA/- $\alpha^{4,2}$.

SUMMARY

APPLYING MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION TECHNIQUE TO DETECT MUTATION IN ALPHA THALASSEMIA PATIENTS

Alpha-thalassemia disease is mostly caused by mutations in the HBA1 and HBA2 genes that lead to the deficiency in the α -globin chain, which builds up the hemoglobin molecule. Depending on the number of missing α chains, the clinical manifestations of the disease are at different levels. Detecting mutations in patients will help diagnose and genetic counseling for the patient's family. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) technique was applied to

detect mutation of HBA1, HBA2 gene in DNA samples of 21 people suspected of having α -thalassemia, based on test results of red blood cells and hemoglobin, the study identified 14/21 people carry the genotype --SEA/- $\alpha^{3,7}$, 7/21 people carry the genotype --SEA/- $\alpha^{4,2}$. MLPA is effective method to detect the deletion and duplication mutation in Vietnam α -thalassemia patients.

Keywords: α -thalassemia disease, HbH, MLPA, --SEA/- $\alpha^{3,7}$, --SEA/- $\alpha^{4,2}$.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh α -thalassemia là bệnh di truyền lặn trên nhiễm sắc thể thường, đặc trưng bởi sự suy giảm hoặc thiếu hụt tổng hợp chuỗi α globin trong phân tử Hemoglobin. Bệnh thuộc nhóm bệnh di truyền phổ biến nhất, là nguyên nhân gây thiếu máu tan máu hàng đầu ở trẻ em. 1 Bệnh α -thalassemia xuất hiện ở tất cả các chủng tộc trên thế giới, rất phổ biến ở các nước Đông Nam Á. Hiện có khoảng 5% dân số thế giới là người mang gen bệnh α -thalassemia, bao gồm dạng α^+ -thalassemia, α^0 -thalassemia, phân bố khác nhau ở từng khu vực, quốc gia, chủng tộc khác nhau. Tại Trung Quốc, người mang gen α -thalassemia chiếm 5-15% dân số, Thailand 15-30%, Lào 43%, và Việt Nam có 45% dân số mang gen bệnh. 2

Ở người bình thường, trên mỗi NST số 16 có hai gen α globin, và có tổng cộng bốn gen α globin trên hai NST 16 tương đồng ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$). 3,4 Tùy theo số lượng gen α bị đột biến, và tùy theo sự kết hợp đa dạng giữa các dạng alen đột biến khác nhau của bệnh α -thalassemia, gây ra các biểu hiện lâm sàng ở nhiều mức độ khác nhau. α thalassemia cũng được phân loại dựa trên số lượng alen bị đột biến; đột biến xuất hiện ở 1 alen được gọi là α^+ thalassemia (hay còn gọi là thalassemia thể ẩn); đột biến xuất hiện ở 2 alen ta có thể α^0 thalassemia. Bệnh α thalassemia

*Trường Đại học Y Hà Nội

Chịu trách nhiệm chính: Trần Văn Khánh

Email: tranvankhanh@hmu.edu.vn

Ngày nhận bài: 10.9.2021

Ngày phản biện khoa học: 2.11.2021

Ngày duyệt bài: 12.11.2021

hay bệnh HbH sẽ xuất hiện khi có 3 alen bị đột biến. Vì số lượng alen bị đột biến quá lớn nên có sự thiếu hụt nghiêm trọng chuỗi α -globin tạo nên những huyết sắc tố bất thường như Hb Bart's (γ_4), hay HbH (β_4)_{2,5}. Những huyết sắc tố này không bền và không đảm bảo được chức năng vận chuyển oxy trong máu. Chính vì vậy, trên lâm sàng bệnh nhân xuất hiện triệu chứng thiếu máu từ mức độ trung bình đến rất nặng, gan to, lách to, biến dạng xương. Nhằm hạn chế những hậu quả nặng nề mà căn bệnh gây ra, y học hiện đại đặt mục tiêu phát hiện sớm và điều trị sớm cho bệnh nhân ngay từ giai đoạn ít triệu chứng.

Từ năm 2008 đến 2010, kỹ thuật phân tích kiểu đột biến gen bệnh α -thalassemia mới bắt đầu được tiến hành tại Việt Nam. Tuy nhiên, hiện nay các kỹ thuật PCR, ARMS-PCR, lai điểm ngược, giải trình tự gen để xác định đột biến đều có những nhược điểm 5

Trong những năm gần đây, các nhà khoa học trên thế giới đã phát triển kỹ thuật MLPA để xác định đột biến gen gây bệnh α -thalassemia với nhiều ưu điểm. Xuất phát từ những thực tiễn nêu trên, nghiên cứu được tiến hành với mục tiêu: "Xác định các đột biến gen α globin ở bệnh nhân α -thalassemia bằng kỹ thuật MLPA".

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu. 21 bệnh nhân được chọn dựa trên xét nghiệm công thức máu bất thường: MCH<27,0pg; MCV<80fL; HGB<130g/L và kết quả điện di huyết sắc tố có HbA2 giảm nhẹ hoặc bình thường, xuất hiện HbH 0,8 – 40% đôi khi có kèm HbBart's.

Tiêu chuẩn loại trừ: những người thiếu máu do thiếu sắt.

Các mẫu trong nghiên cứu được thu thập và tiến hành các kỹ thuật sinh học phân tử tại Trung tâm nghiên cứu Gen - Protein, Trường Đại học Y Hà Nội.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

a. Kỹ thuật tách chiết DNA

- Kỹ thuật tách chiết DNA: DNA được tách từ mẫu máu toàn phần bằng bộ kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit của hãng Promega, Hoa Kỳ. Quy trình tách chiết tuân theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Nồng độ và độ tinh sạch của DNA sau tách chiết được kiểm tra bằng phương pháp đo quang trên máy NanoDrop: nồng độ DNA 80-200 ng/ μ l, đánh giá độ tinh sạch bằng tỷ lệ A260/A280=1,8-2,0.

b. Kỹ thuật MLPA:

- Nghiên cứu sử dụng bộ kit SALSA MLPA của hãng MRC Holland (Hà Lan) với bộ đầu dò P140 dành cho chẩn đoán α -thalassemia.

- Tiến hành: 5ul DNA có nồng độ tối ưu trong khoảng 50-250ng, đã khử RNA, được sử dụng làm khuôn cho phản ứng. MLPA gồm 4 bước chính là biến tính, lai hóa đầu dò, PCR và bước cuối cùng là điện di mao quản. Các bước thí nghiệm và chu trình nhiệt của phản ứng được thực hiện tuân theo quy trình chung của nhà sản xuất.

- Kết quả MLPA được phân tích trên phần mềm COFFALYSER.Net để tính giá trị DQ (Dosage Quotient-thương số của tín hiệu đỉnh mẫu nghiên cứu so với mẫu đối chứng). Những đỉnh có giá trị DQ trong khoảng 0,8-1,2 là bình thường; DQ=0 tương đương với đột biến mất đoạn đồng hợp tử; DQ trong khoảng 0,4-0,65 được xác định là xóa đoạn dị hợp tử; DQ từ 1,3-1,65 là có đột biến lặp đoạn.6

2.3. Vấn đề y đức. Nghiên cứu tuân thủ nghiêm ngặt đạo đức nghiên cứu trong y sinh. Bệnh nhân tham gia vào nghiên cứu này một cách tự nguyện. Họ được thông báo kết quả xét nghiệm gen và bảo mật thông tin cá nhân. Bệnh nhân có thể rút khỏi nghiên cứu bất cứ lúc nào nếu họ yêu cầu.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

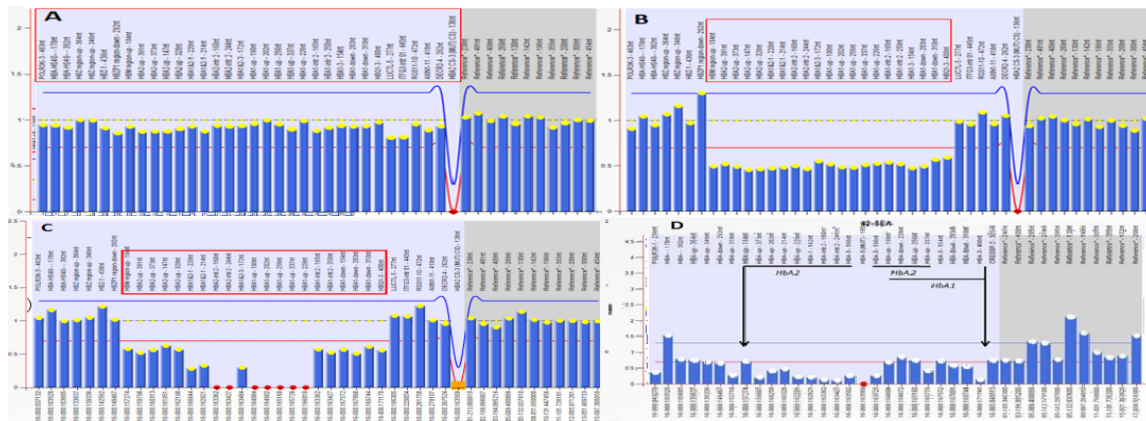
3.1. Công thức máu của người nghi ngờ mắc bệnh

Bảng 1. Công thức máu và chỉ số điện di huyết sắc tố

Chỉ số máu (n=15)	Trung bình \pm SD
RBC (T/L)	5,15 \pm 0,78
HBG (g/L)	76,50 \pm 15,21
MCV (fL)	58,86 \pm 12,38
MCH (pg)	18,42 \pm 1,85
HbA1 (%)	85,93 \pm 5,57
HbA2 (%)	1,64 \pm 0,69
HbH	10,59 \pm 6,26
Hb Bart's	3,1

Bệnh nhân nghiên cứu đều có biểu hiện thiếu máu nhược sắc hồng cầu nhỏ. Nồng độ huyết sắc tố thấp (HGB<90g/L). Thể tích trung bình hồng cầu MCV <27pg và lượng huyết sắc tố trung bình hồng cầu MCH <80fl. Kết quả điện di huyết sắc tố có HbA1 và HbA2 giảm, xuất hiện HbH và có 1 bệnh nhân có HbBart's.

3.2. Kết quả xác định đột biến gen. Bằng phương pháp MLPA, kết quả nghiên cứu xác định được 21/21 bệnh nhân HbH. Kết quả phân tích MLPA của từng nhóm đột biến được thể hiện ở **Hình 1**.



Hình 1. Kết quả MLPA của bệnh nhân có đột biến mất đoạn lớn.

Trục tung biểu thị giá trị DQ của các mẫu, trục hoành biểu thị các đỉnh của đầu dò trong bộ kit MLPA P140. **A:** Kết quả của người bình thường. **B:** Bệnh nhân mang đột biến --SEA.

C: Bệnh nhân có kiểu gen --SEA/ $\alpha^{3.7}$. **D:** Bệnh nhân có kiểu gen --SEA/ $\alpha^{4.2}$.

Nhận xét: Kết quả MLPA của nhóm chúng (Hình 1A) cho thấy các đỉnh của cụm gen quy định tổng hợp chuỗi alpha globin (trong khung màu đỏ) có chiều cao đều nhau và giá trị DQ đều nằm trong giá trị bình thường (khoảng từ 0,7 đến 1,3 theo như khuyến cáo của nhà sản xuất). Hình 1B các đỉnh từ HBM đến HBQ1 (trong khung màu đỏ) có giá trị DQ từ 0,4-0,65, thấp hơn khoảng 1/2 so với người bình thường tương ứng với khoảng mất đoạn --SEA. Hình 1C là kết quả của bệnh nhân mang kiểu gen --SEA/ $\alpha^{3.7}$, khi đột biến --SEA kết hợp với đột biến $\alpha^{3.7}$ thì đột biến $\alpha^{3.7}$ xuất hiện ở cả 2 alen do đó các đỉnh ở vùng này bằng 0. Tương tự như vậy, Hình 1D là kết quả của bệnh nhân mang kiểu gen --SEA/ $\alpha^{4.2}$.

Bảng 2. Các dạng đột biến và kiểu gen phát hiện trên gen α -globin

Kiểu gen	Số lượng (n=21)
--SEA/ $\alpha^{3.7}$	14(70%)
--SEA/ $\alpha^{4.2}$	7(30%)

Nhận xét: Tất cả 21 bệnh nhân tham gia nghiên cứu đều phát hiện ra đột biến gây bệnh α -thalassemia thuộc 2 kiểu gen --SEA/ $\alpha^{3.7}$ và --SEA/ $\alpha^{4.2}$. Trong đó, 14/21 bệnh nhân mang kiểu gen --SEA/ $\alpha^{3.7}$ chiếm 70%, còn lại 7/21 bệnh nhân mang kiểu gen --SEA/ $\alpha^{4.2}$ chiếm 30%.

IV. BÀN LUẬN

Các đột biến gây bệnh α -thalassemia hầu hết là các đột biến đã biết, được xác định bằng nhiều loại kỹ thuật khác nhau dựa trên nền tảng của kỹ thuật PCR. Quyết định lựa chọn kỹ thuật

nào ứng dụng vào chẩn đoán chủ yếu tùy thuộc vào việc xác định đặc điểm các đột biến gây bệnh phổ biến ở từng quần thể, và tùy theo năng lực của mỗi trung tâm chẩn đoán. Trong nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn kỹ thuật MLPA để phát hiện các đột biến gen α globin gây bệnh α -thalassemia.

MLPA được sử dụng để xác định các đột biến gây bệnh không nằm trong nhóm kỹ thuật PCR phát hiện được, hoặc trong một số trường hợp MLPA được sử dụng như một kỹ thuật thứ hai để đối chiếu. Kỹ thuật dựa trên các độ dài khác nhau được đánh dấu bằng các tín hiệu huỳnh quang, nên có thể phân tích được khoảng 50 cặp đầu dò khác nhau, trải trên một vùng gen rộng.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi quan sát thấy có 2 kiểu gen là sự kết hợp của 1 đột biến α^0 -thalassemia và 1 đột biến α^+ -thalassemia. Trong đó, đột biến α^0 -thalassemia tìm được trên 21 bệnh nhân đều là đột biến --SEA, không phát hiện sự xuất hiện của đột biến thể α^0 khác như --THAI hay --FIL. Kết quả này phù hợp với một số nghiên cứu trước đó như N.D.Ngọc (2018)4,5 đã phát hiện ra 8 kiểu gen của bệnh nhân HbH là sự kết hợp của đột biến --SEA và 8 đột biến điểm khác. Về tỷ lệ kiểu gen nghiên cứu của N.D.Ngọc cho α kết quả kiểu gen --SEA/ $\alpha^{3.7}$ chiếm 21,6%, kiểu gen --SEA/ $\alpha^{4.2}$ chiếm 9,2%. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi không tương quan với nghiên cứu trên do số lượng mẫu nhỏ. Do đó, kết quả của nghiên cứu chưa thể thể hiện được sự phân bố chính xác của các dạng đột biến gen α -globin trong cộng đồng người Việt Nam.

Đột biến mất đoạn --SEA chiếm tỷ lệ cao trong nghiên cứu này. Kết quả này phù hợp với thực tế rằng kiểu mất đoạn này là dạng đột biến phổ biến nhất ở Đông Nam Á, dẫn đến thiếu hai gen α -globin trên nhiễm sắc thể 16.

Về kết quả huyết học cho thấy, 100% số bệnh

nhân có thiếu máu nhược sắc hồng cầu nhỏ, tương xứng với kết quả xét nghiệm gen. Trong đó, huyết sắc tố trung bình của 21 bệnh nhân là $76,5 \pm 15,21$ g/L nằm trong giới hạn thiếu mức độ máu trung bình (60 - 90 g/L), MCV trung bình là $58,86 \pm 12,38$ fl thấp hơn rất nhiều so với người bình thường (70 - 100 fl). Ngoài ra, chỉ số điện di huyết sắc tố cho thấy HbA2 giảm ở tất cả các bệnh nhân (<3%); sự có mặt của HbH $10,59 \pm 6,26$ % ở hầu hết tất cả bệnh nhân. Các chỉ số này có thể dùng để định hướng chẩn đoán trước khi bệnh nhân có biểu hiện bệnh trên lâm sàng.

Nghiên cứu mới chỉ tiến hành trên cỡ mẫu nhỏ nên chưa đánh giá được chính xác về tỉ lệ kiểu gen α -thalassemia trên nhóm bệnh nhân. Mặc dù MLPA là một kỹ thuật có độ nhạy và độ đặc hiệu cao, tuy nhiên vẫn không thể phát hiện các đột biến điểm khác, chiếm 10% đột biến trên cụm gen α -globin. Vì vậy, cần tiến hành nghiên cứu trên cỡ mẫu lớn hơn, kết hợp thêm phương pháp như giải trình tự gen Sanger hoặc NGS (Next-generation sequencing) để giúp xác định được toàn bộ các đột biến gen gây bệnh α -thalassemia và đưa ra bản đồ đột biến gen α -globin trên bệnh nhân α -thalassemia Việt Nam.

V. KẾT LUẬN

Bằng kỹ thuật MLPA, nghiên cứu xác định

được 21/21 bệnh nhân có đột biến trên gen α -globin với 2 kiểu gen gây bệnh α -thalassemia ở 21 bệnh nhân là --SEA/ $\alpha^{3.7}$ (chiếm 70%) và --SEA/ $\alpha^{4.2}$ chiếm 30%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Barnett R. Thalassaemia. *Lancet*. 2019;394(10204):1135. doi:10.1016/S0140-6736(19)32169-5
2. Birgens H, Ljung R. The thalassaemia syndromes. *Scand J Clin Lab Invest*. 2007;67(1):11-25. doi:10.1080/00365510601046417
3. Mettananda S, Higgs DR. Molecular Basis and Genetic Modifiers of Thalassemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2018;32(2):177-191. doi:10.1016/j.hoc.2017.11.003
4. Boonsa S, Sanchaisuriya K, Fucharoen G, Wiangnon S, Jetsrisuparb A, Fucharoen S. The Diverse Molecular Basis and Hematological Features of Hb H and AEBart's Diseases in Northeast Thailand. *AHA*. 2004;111(3):149-154. doi:10.1159/000076523
5. Farashi S, Hartevelde CL. Molecular basis of α -thalassemia. *Blood Cells Mol Dis*. 2018;70:43-53. doi:10.1016/j.bcmd.2017.09.004
6. Massalska D, Bijok J, Zimowski JG, Józwiak A, Jakiel G, Roszkowski T. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)--new possibilities of prenatal diagnosis. *Ginekol Pol*. 2013;84(6):461-464. doi:10.17772/gp/1605.

KẾT QUẢ CỦA GLOBULIN MIỄN DỊCH TRUYỀN TĨNH MẠCH TRONG ĐIỀU TRỊ HOẠI TỬ THƯƠNG BÌ NHIỄM ĐỘC DO THUỐC

Nguyễn Thị Linh¹, Nguyễn Văn Đoàn¹, Chu Chí Hiếu²

TÓM TẮT

Mục tiêu: Nghiên cứu nhằm đánh giá kết quả điều trị của globulin miễn dịch truyền tĩnh mạch (IVIg) trong điều trị hoại tử thượng bì nhiễm độc (Toxic epidermal necrolysis - TEN) do thuốc. **Phương pháp nghiên cứu:** Nghiên cứu hồi cứu trên 29 bệnh nhân chẩn đoán TEN nghi do thuốc tại Trung tâm Dị ứng - Miễn dịch lâm sàng, Bệnh viện Bạch Mai từ tháng 4 năm 2019 đến tháng 7 năm 2020. **Kết quả:** Trong tổng số 29 bệnh nhân, IVIg được sử dụng điều trị trong 9 trường hợp. Tỉ lệ tử vong trong nhóm sử dụng IVIg là 0% so với 10% ở nhóm không điều trị IVIg. Thời gian nằm viện trung bình của nhóm có sử dụng

IVIg là $15,33 \pm 7,632$ ngày không có sự khác biệt với nhóm không điều trị IVIg là $14,15 \pm 4,392$ ngày. **Kết luận:** IVIg là một trong số các phương pháp điều trị toàn thân được đưa vào sử dụng trong điều trị TEN, tuy nhiên hiệu quả điều trị còn nhiều tranh cãi, cần có những nghiên cứu lớn và toàn diện hơn để đánh giá hiệu quả của phương pháp này.

Từ khóa: Dị ứng thuốc, TEN, IVIg.

SUMMARY

EFFICACY OF INTRAVENOUS HUMAN IMMUNOGLOBULIN IN DRUG – INDUCED TOXIC EPIDERMAL NECROLYSIS

Objectives: In this study, we aimed to evaluate the efficacy of intravenous immunoglobulin in patients with drug-induced toxic epidermal necrolysis (TEN). **Methods:** This was a retrospective study on patients diagnosed as drug-induced TEN at Center of Allergology and clinical immunology, Bach Mai Hospital during the period of April 2019 to July 2020. **Results:** IVIg was used for treatment in 9 out of 29 cases, the mortality rate in the IVIg group was 0% compared to

¹Trường Đại học Y Hà Nội

²Bệnh viện Bạch Mai

Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Thị Linh

Email: Nguyenlinhmu1412@gmail.com

Ngày nhận bài: 10.9.2021

Ngày phản biện khoa học: 1.11.2021

Ngày duyệt bài: 11.11.2021