

Xác định đột biến gene β -globin ở bệnh nhân β -thalassemia bằng kỹ thuật MARMS-PCR

Lê Phan Tường Quỳnh¹, Hà Thị Minh Thi¹,

Lê Phan Minh Triết², Lê Tuấn Linh¹, Andrea Angius³

(1) Bộ môn Di truyền Y học, Trường Đại học Y - Dược, Đại học Huế

(2) Bộ môn Huyết học, Trường Đại học Y - Dược, Đại học Huế

(3) Institute of Genetic and Biomedical Research (IRGB), CNR, Italy

Tóm tắt

Đặt vấn đề: β -thalassemia là một trong những bệnh lý di truyền lặn trên nhiễm sắc thể thường phổ biến nhất trên thế giới. **Đề tài nhằm hai mục tiêu:** (1) Xác định các đột biến gene β -globin thường gặp và tần suất các loại đột biến; (2) Đánh giá hiệu quả của kỹ thuật MARMS-PCR trong việc xác định đột biến gene β -globin. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** 21 bệnh nhân β -thalassemia thể trung gian. Tách DNA từ máu ngoại vi, xác định đột biến gene β -globin bằng kỹ thuật MARMS-PCR và kiểm chứng bằng kỹ thuật giải trình tự theo phương pháp Sanger. **Kết quả:** Năm đột biến thường gặp trên gene β -globin được xác định: HbE (47,5%), cd 17 (A>T) (35%), cd 41/42 (-TTCT) (12,5%), -28 (A>G) (2,5%) và cd 71/72 (+A) (2,5%); Kết quả xác định đột biến gene β -globin bằng kỹ thuật MARMS-PCR và giải trình tự hoàn toàn tương đồng. **Kết luận:** MARMS-PCR là kỹ thuật có độ chính xác cao, đơn giản và có hiệu quả kinh tế giúp xác định các đột biến gene β -globin thường gặp.

Từ khóa: β -thalassemia, MARMS-PCR, đột biến gene β -globin

Abstract

Identifying β -globin gene mutations in β -thalassemia patients by MARMS-PCR

Le Phan Tuong Quynh¹, Ha Thi Minh Thi¹,

Le Phan Minh Triet², Le Tuan Linh¹, Andrea Angius³

(1) Department of Medical Genetics, Hue University of Medicine and Pharmacy, Hue University

(2) Department of Hematology, Hue University of Medicine and Pharmacy, Hue University

(3) Institute of Genetic and Biomedical Research (IRGB), CNR, Italy

Background: β -thalassemia is one of the most common autosomal recessive disorders in the world. The aims of the current study were (1) to identify the common β -globin gene mutations and the prevalence of each mutation; and (2) to assess the efficiency of MARMS-PCR technique in determination β -globin gene mutations.

Materials and method: DNA were extracted from peripheral blood of twenty-one β -thalassemia intermedia patients. The common β -globin mutations were screened by MARMS-PCR technique and confirmed by Sanger sequencing.

Results: This study revealed five common β -globin gene mutations, including HbE (47.5%), cd 17 (A>T) (35%), cd 41/42 (-TTCT) (12.5%), -28 (A>G) (2.5%) và cd 71/72 (+A) (2.5%); The results of the MARMS-PCR were completely in concordance with that of the Sanger sequencing.

Conclusion: MARMS-PCR is the accurate, simple, and cost-effective technique for identifying the common β -globin gene mutations.

Keywords: β -thalassemia, MARMS-PCR, β -globin gene mutation

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

β -thalassemia là một trong những bệnh lý di truyền phổ biến nhất trên thế giới. Bệnh xuất hiện với tần suất cao ở đảo Síp (14%), vùng Sardinia thuộc nước Ý (12%) và các nước Đông Nam Á [6]. Tần suất gene β -thalassemia được ghi nhận tại Đông Nam Á thay đổi từ 1 – 9% [13]. Trong khi đó, ở Việt Nam tần suất người mang gene β -thalassemia thay

đổi từ 1,5 – 25% tùy thuộc vào các nhóm dân tộc khác nhau [11].

β -thalassemia là bệnh lý di truyền lặn nhiễm sắc thể thường, do đột biến gene β -globin (HBB) nằm trên nhánh ngắn nhiễm sắc thể 11 (11p15.4). Gene HBB có kích thước 1608 bp, gồm ba exon và hai intron. Đột biến gene HBB làm giảm tổng hợp chuỗi β -globin (β +) hoặc không tổng hợp được chuỗi β -globin (β 0) dẫn

Địa chỉ liên hệ: Lê Phan Tường Quỳnh, email: lptquynh@huemed-univ.edu.vn

Ngày nhận bài: 5/12/2020; Ngày đồng ý đăng: 13/1/2021; Ngày xuất bản: 9/3/2021

DOI: 10.34071/jmp.2021.1.7

đến bệnh lý β -thalassemia [6]. Hiện nay, hơn 300 đột biến đã được tìm thấy liên quan đến β -thalassemia, và phần lớn các đột biến này là đột biến thay thế nucleotide, đột biến mất đoạn, hoặc chèn đoạn nhỏ dẫn đến đột biến dịch khung [20]. Các đột biến này mang tính đặc trưng và phân bố với tỷ lệ khác nhau ở từng dân tộc. Các nghiên cứu tại miền Bắc [11], miền Trung [9] và miền Nam [3] cho thấy các đột biến gene HBB phổ biến ở Việt Nam bao gồm HbE hay codon (cd) 26 (G>A), cd 17 (A>T), cd 41/42 (-TTCT), cd 71/72 (+A), IVS2-654 (C>T), -28 (A>G), cd 95 (+A) và IVS1-1 (G>T), tuy nhiên tỷ lệ của mỗi loại đột biến là khác nhau giữa các vùng.

Trên lâm sàng, β -thalassemia gồm có ba thể là thể nhẹ, thể trung gian và thể nặng tùy theo mức độ thiếu máu. Trong khi β -thalassemia thể nhẹ thường không có triệu chứng, có kiểu gene dị hợp tử với một đột biến trên gene HBB thì đồng hợp tử hoặc dị hợp tử kép đột biến gene HBB dẫn đến β -thalassemia thể nặng và thể trung gian. Bệnh nhân β -thalassemia thể nặng bị thiếu máu nặng và phụ thuộc truyền máu suốt đời. Bệnh nhân β -thalassemia thể trung gian thường bị thiếu máu vừa, và không phụ thuộc truyền máu [6]. Bệnh β -thalassemia thường được chẩn đoán dựa vào các đặc điểm lâm sàng và các xét nghiệm huyết học. Tuy nhiên, các xét nghiệm sinh học phân tử giúp xác định đột biến gene HBB đóng vai trò quan trọng trong việc chẩn đoán xác định thể bệnh cũng như chẩn đoán trước sinh bệnh β -thalassemia.

Hiện nay, có rất nhiều kỹ thuật sinh học phân tử đã được phát triển và ứng dụng để xác định đột biến gene HBB. Mỗi phương pháp có từng ưu nhược điểm riêng và tùy theo điều kiện của từng phòng thí nghiệm để triển khai các kỹ thuật khác nhau. Trong đó, kỹ thuật ARMS (Amplification refractory mutation system), còn được gọi là kỹ thuật PCR đặc hiệu allele (AS-PCR: Allele specific polymerase chain reaction) là một kỹ thuật đơn giản, hiệu quả để phát hiện phần lớn các đột biến HBB phổ biến [19]. Tuy nhiên, ARMS chỉ phát hiện được một đột biến cho mỗi phản ứng, do đó kỹ thuật Multiplex ARMS-PCR

(MARMS-PCR) đã được phát triển để phát hiện nhiều đột biến HBB cùng lúc [12]. Để xác định tính hiệu quả của kỹ thuật MARMS-PCR, chúng tôi tiến hành đề tài này nhằm 2 mục tiêu sau:

(1) Xác định các đột biến gene HBB ở bệnh nhân β -thalassemia.

(2) Khảo sát độ tương đồng của kỹ thuật MARMS-PCR so với kỹ thuật giải trình tự trong xác định đột biến gene HBB.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

21 bệnh nhân β -thalassemia thể trung gian được điều trị tại Bệnh viện Trung ương Huế và Bệnh viện Trường Đại học Y Dược Huế trong thời gian từ 09/2014 đến 01/2015.

Tiêu chuẩn chẩn đoán [1]:

- Lâm sàng có hội chứng thiếu máu.
- Tổng phân tích tế bào máu ngoại vi: Hồng cầu nhỏ (MCV < 85 fL), nhược sắc (MCH < 28 pg).
- Thành phần huyết sắc tố có HbA₂ tăng và hoặc HbF tăng.
- Các triệu chứng xuất hiện khi trẻ trên 2 tuổi.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Bước 1: Thu thập mẫu, tách chiết DNA

- Lấy 2 ml máu tĩnh mạch có chống đông bằng EDTA.
- DNA được tách chiết bằng kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega).
- DNA sau khi tách chiết được kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch bằng máy Nanodrop 2000, lưu ở -20°C cho đến khi phân tích.

Bước 2: Xác định đột biến phổ biến gene HBB bằng kỹ thuật MARMS-PCR

- Hóa chất thực hiện PCR: Kapa Taq buffer (Sigma-Aldrich), Kapa Taq DNA polymerase (Sigma-Aldrich), dNTPs (2,5 mM) và MgCl₂ (25 mM).
- 8 đột biến phổ biến được khảo sát bao gồm: HbE hay cd 26 (G>A), cd 17 (A>T), cd 41/42 (-TTCT), cd 71/72 (+A), -28 (A>G), IVS 1-1 (G>T), IVS 2-654 (C>T), cd 95 (+A) [3], [9], [11]. Trình tự mỗi được liệt kê ở bảng 1 [16], [21].

Bảng 1. Trình tự mồi

Tên mồi	Trình tự	Kích thước (bp)	Nồng độ mồi (nM)
cd26-M	5'-TAA CCT TGA TAC CAA CCT GCC CAG GGC GTT-3'	330	50
cd26-N	5'-TAA CCT TGA TAC CAA CCT GCC CAG GGC GTC-3'		50
cd41/42-M	5'-GAG TGG ACA GAT CCC CAA AGG ACT CAA CCT-3'	506	50
cd41/42-N	5'-GAG TGG ACA GAT CCC CAA AGG ACT CAA AGA-3'		50
-28-M	5'-TAA GCA ATA GAT GGC TCT GCC CTG AGT TC-3'	173	180

-28-N	5'-TAA GCA ATA GAT GGC TCT GCC CTG AGT TT-3'		500
cd17-M	5'-CTC ACC ACC AAC TTC ATC CAC GTT CAG CTA-3'	303	50
cd17-N	5'-CTC ACC ACC AAC TTC ATC CAC GTT CAG CTT-3'		150
cd71/72-M	5'-GGT TGT CCA GGT GAG CCA GGC CAT CAG TT-3'	596	140
cd71/72-N	5'-GGT TGT CCA GGT GAG CCA GGC CAT CAG TA-3'		250
IVS1-1-M	5'-TTA AAC CTG TCT TGT AAC CTT GAT ACG AAA-3'	344	600
IVS1-1-N	5'-TTA AAC CTG TCT TGT AAC CTT GAT ACG AAC-3'		150
IVS2-654-M	5'-GAA TAA CAG TGA TAA TTT CTG GGT TAA CGT-3'	826	500
IVS2-654-N	5'-GAA TAA CAG TGA TAA TTT CTG GGT TAA CGC-3'		300
cd95-M-F	5'-GTG AGC TGC ACT GTG ACA AAG-3'	849	80
cd95-M-R	5'-GCT TGG ACT CAG AAT AAT CC-3'		80
cd95-N-F	5'-AAT CTA CTC CCA GGA GCA GG-3'	542	80
cd95-N-R	5'-AGG ATC CAC GTG CAG CTT G-3'		80
Primer A	5'-CAA TGT ATC ATG CCT CTT TGC ACC-3'	861	120
Primer B	5'-GAG TCA AGG CTG AGA GAT GCA GGA-3'		150
Primer C	5'-CAA CTT GCT CAA GCA TAC ACT C-3'	493	150
Primer D	5'-AAT AAT AGG CAT AGT GAC AAG TGC-3'		150
Primer E	5'-TGA AGT CCA ACT CCT AAG CCA GTG-3'		160

M (Mutation): Đột biến, N (Normal): Bình thường

- 4 phản ứng MARMS-PCR và 4 phản ứng ARMS-PCR được thực hiện để khảo sát các đột biến thường gặp: phản ứng 1 và 2 gồm một mồi chung (primer E) với hoặc các mồi bình thường hoặc các mồi đột biến để khảo sát đột biến cd 26 (G>A) và cd 41/42 (-TTCT); phản ứng 3 và 4 gồm một mồi chung (primer E) với hoặc các mồi bình thường hoặc các mồi đột biến để khảo sát đột biến -28 (A>G), cd 17 (A>T), cd 71/72 (+A) và IVS 1-1 (G>T); phản ứng 5 và 6 gồm Primer B với mồi bình thường hoặc mồi đột biến để khảo sát đột biến IVS 2-654 (C>T); và phản ứng 7 và 8 lần lượt xác định allele bình thường và allele đột biến cd 95 (+A). Các phản ứng có chạy kèm chứng nội, trong đó phản ứng 1, 2, 3, 4 chạy kèm cặp mồi Primer A và Primer B; phản ứng 5, 6, 7, 8 chạy kèm cặp mồi Primer C và Primer D.

- Thành phần phản ứng: 2 µl Kapa Taq buffer (10X), 1,6 µl dNTPs (2,5 mM), 1,6 µl MgCl₂ (25 mM), 0,2 µl Kapa Taq DNA polymerase (5 U/µl), mồi (10 pmol/µl) thể tích thay đổi tùy mồi, 20 ng DNA

và nước cất cho đủ tổng thể tích 20 µl.

- Điều kiện nhiệt độ: Biến tính ban đầu 95°C, 5 phút; 30 chu kỳ 95°C 30 giây, 65°C đối với phản ứng 1 --> 6 và 68 °C đối với phản ứng 7, 8 trong vòng 30 giây, 72°C 40 giây; kéo dài cuối cùng 72°C 8 phút (Máy Applied Biosystems 2720).

- Đọc kết quả: Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 2,5%, hiệu điện thế 80V, trong vòng 2 giờ, chạy kèm thang chuẩn Directload Wide Range DNA Marker, và được nhuộm ethidium bromide. Xem hình ảnh điện di dưới đèn cực tím.

- Kiểm chứng đột biến bằng kỹ thuật giải trình tự theo phương pháp Sanger, sử dụng cặp mồi như sau: Mồi xuôi 5'-TGA AGT CCA ACT CCT AAG CCA GTG-3' và mồi ngược 5'-AGG ATC CAC GTG CAG CTT G-3'.

- Kỹ thuật MARMS-PCR được thực hiện tại Bộ môn Di truyền Y học, Trường Đại học Y Dược Huế.

- Kỹ thuật giải trình tự được thực hiện tại Building 3, Center for Advanced Studies, Research and Development in Sardinia (CRS4), Pula, Italy.

3. KẾT QUẢ

3.1. Đặc điểm chung

Bảng 2. Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu

	Đặc điểm	Số lượng (tỷ lệ %)	Trị trung bình
Tuổi	< 40	18 (85,7%)	27,7 ± 13,4
	≥ 40	3 (14,3%)	

Hb (g/dL)		8,0 ± 1,19
MCV (fL)		69,9 ± 10,1
MCH (pg)		22,1 ± 3,0

Nhận xét: Nhóm bệnh nhân có độ tuổi trung bình là 27,7 ± 13,4, tuổi nhỏ nhất là 4 tuổi và lớn nhất là 60 tuổi.

3.2. Kết quả xác định đột biến gene HBB bằng kỹ thuật MARMS-PCR

Bảng 3. Tỷ lệ các đột biến gene HBB

Đột biến		Số lượng*	Tỷ lệ (%)
β^E	cd 26 (G>A)	19	47,5
β^+	-28 (A>G)	1	2,5
β^o	cd 17 (A>T)	14	35
	cd 41/42 (-TTCT)	5	12,5
	cd 71/72 (+A)	1	2,5
Tổng		40	100

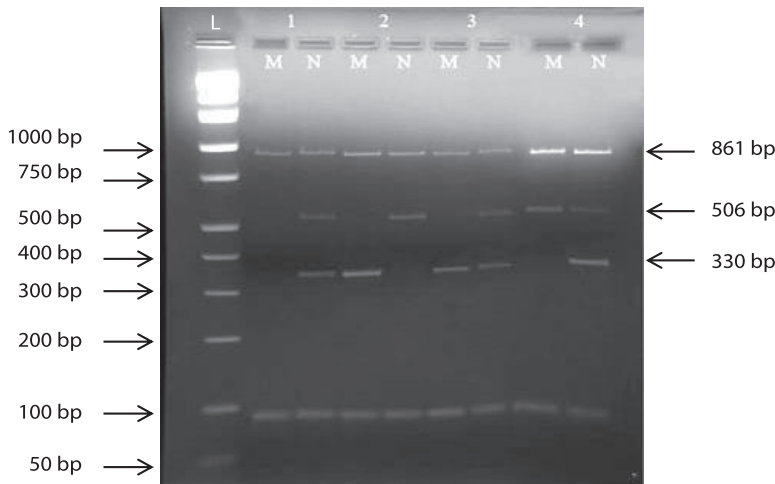
*: Tổng số nhiễm sắc thể được khảo sát là 42 (tổng số 21 bệnh nhân).

Nhận xét: Trong 8 đột biến phổ biến, 5 đột biến đã được xác định gồm HbE, -28 (A>G), cd 17 (A>T), cd 41/42 (-TTCT) và cd 71/72 (+A).

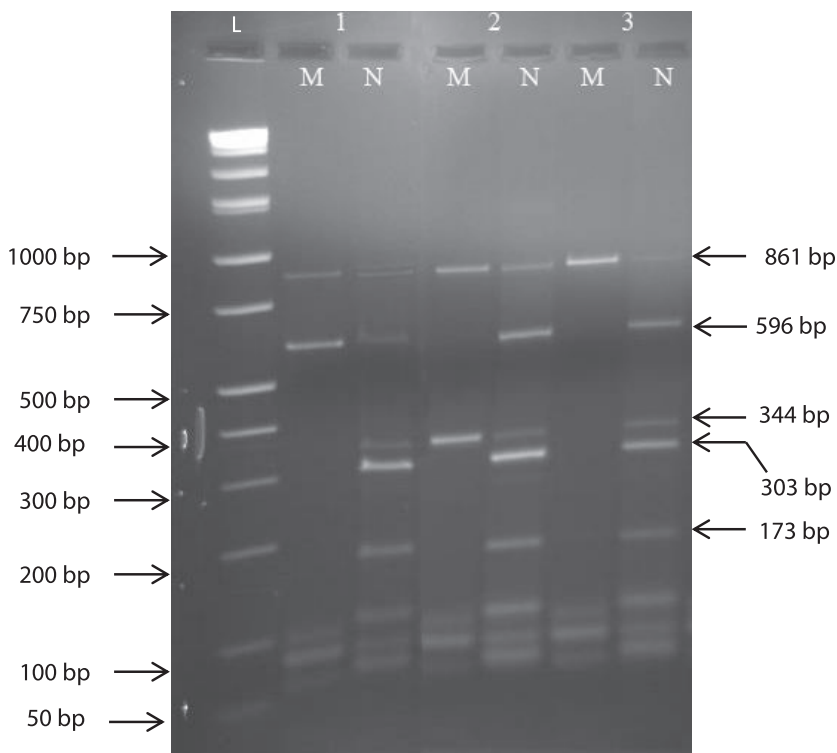
Bảng 4. Kiểu gene β của các bệnh nhân β -thalassemia thể trung gian

Kiểu gene β		Số lượng	Tỷ lệ (%)
β^E/β^E	β^E/β^E	1	4,8
β^E/β^+	β^E/β^{-28}	1	4,8
β^E/β^o	$\beta^E/\beta^{cd41/42}$	4	19,0
	β^E/β^{cd17}	12	57,1
β^o/β^o	$\beta^{cd41/42}/\beta^{cd71/72}$	1	4,8
β/β^o	β/β^{cd17}	2	9,5
Tổng		21	100

Nhận xét: Trong số 21 bệnh nhân β -thalassemia thể trung gian, 76,1% có kiểu gene dị hợp tử kép β^E/β^o , 9,5% có kiểu gene β/β^o , các kiểu gene β^E/β^E , β^E/β^+ , β^o/β^o được quan sát thấy với tỷ lệ như nhau là 4,8%.



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm MARMS-PCR xác định đột biến HbE hay cd 26 (G>A) và cd 41/42 (-TTCT)
 L: DirectLoad Wide Range DNA Marker; Tất cả các phản ứng đều khuếch đại thành công chứng nội (861 bp);
 Mẫu 1: kiểu gene bình thường do chỉ có allele bình thường (N); Mẫu 2: Đồng hợp tử HbE do chỉ có allele đột biến (M); Mẫu 3: Dị hợp tử HbE; Mẫu 4: Dị hợp tử cd 41/42 (-TTCT)



Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm MARMS-PCR xác định đột biến -28 (A>G), cd 17 (A>T), cd 71/72 (+A) và IVS 1-1 (G>T)

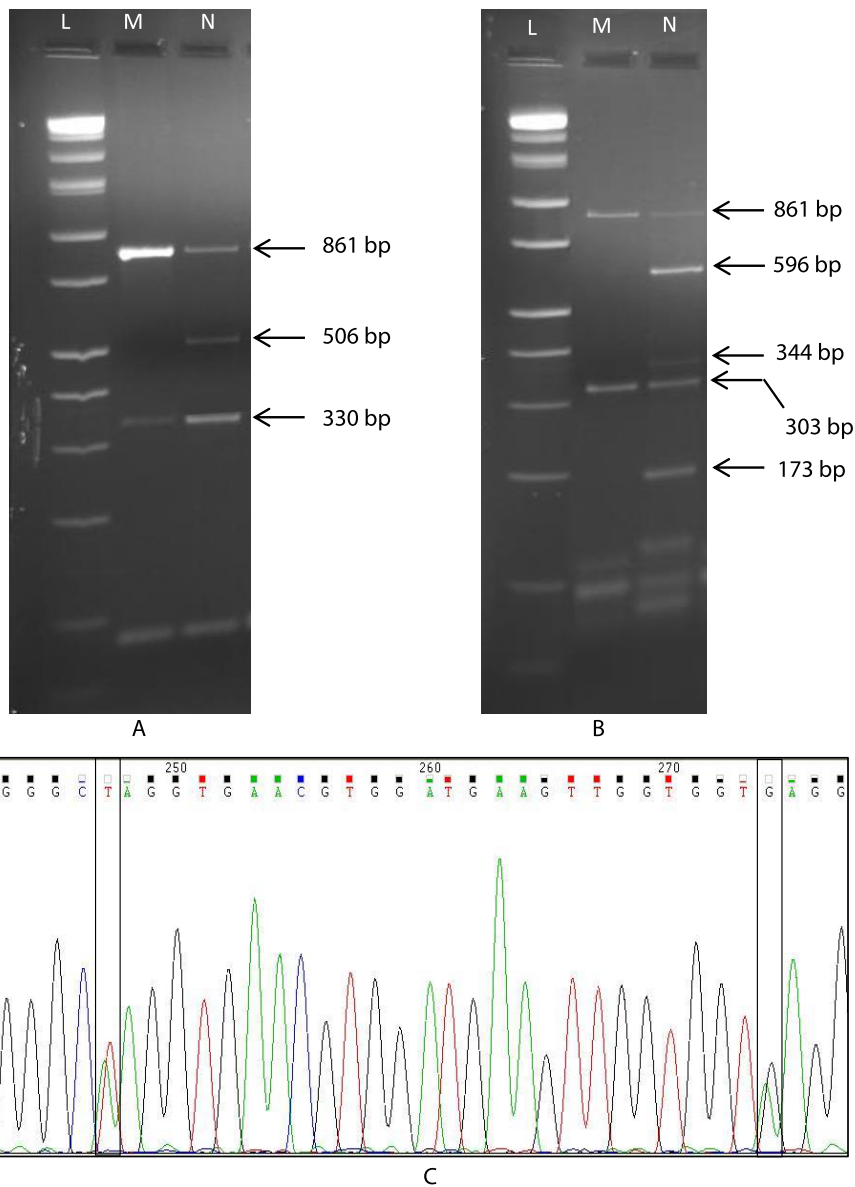
L: DirectLoad Wide Range DNA Marker; Tất cả các phản ứng đều khuếch đại thành công chứng nội (861 bp); Mẫu 1: Dị hợp tử cd 71/72 (+A); Mẫu 2: Dị hợp tử IVS 1-1 (G>T); Mẫu 3: kiểu gene bình thường

3.3. Độ tương đồng của kỹ thuật MARMS-PCR so với kỹ thuật giải trình tự trong xác định đột biến gene HBB

Bảng 5. Kiểu gene được xác định bằng kỹ thuật MARMS-PCR và kỹ thuật giải trình tự

Kiểu gene β		MARMS-PCR	Giải trình tự	Hệ số kappa
β^E/β^E	β^E/β^E	1	1	$\kappa = 1$ 95% CI: 0,8076 - 1
β^E/β^+	β^E/β^{-28}	1	1	
β^E/β^o	$\beta^E/\beta^{cd41/42}$	4	4	
	β^E/β^{cd17}	12	12	
β^o/β^o	$\beta^{cd41/42}/\beta^{cd71/72}$	1	1	
β/β^o	β/β^{cd17}	2	2	
Tổng		21	21	

Nhận xét: Kết quả xác định đột biến gene HBB bằng kỹ thuật MARMS-PCR và giải trình tự hoàn toàn tương đồng, hệ số $\kappa = 1$, 95% CI: 0,8076 – 1.



Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm MARMS-PCR và hình ảnh giải trình tự của một bệnh nhân có kiểu gene dị hợp tử đột biến cd 17 (A>T) và HbE hay cd 26 (G>A)

L: DirectLoad Wide Range DNA Marker; A: Dị hợp tử HbE; B: Dị hợp tử cd 17 (A>T)

C: Hình ảnh giải trình tự cho thấy kiểu gene dị hợp tử tại cd 17, gồm 2 đỉnh A và T; kiểu gene dị hợp tử tại cd 26, gồm 2 đỉnh G và A.

4. BÀN LUẬN

4.1. Đặc điểm chung

Trong nghiên cứu của chúng tôi, độ tuổi trung bình của bệnh nhân là $27,7 \pm 13,4$, nhỏ nhất là 4 tuổi và lớn nhất là 60 tuổi. Độ tuổi này cao hơn so với các nghiên cứu khác. Nghiên cứu của Al-Allawi (2014) trên 74 bệnh nhân β -thalassemia thể trung gian cho thấy độ tuổi trung bình là 15,5, tuổi nhỏ nhất là 2,5 tuổi và lớn nhất là 49 tuổi [4], bệnh nhân β -thalassemia thể

trung gian trong nghiên cứu của Faraon (2019) có độ tuổi trung bình là 18, tuổi nhỏ nhất là 4 tuổi và lớn nhất là 71 tuổi [10].

Chỉ số hemoglobin trung bình là $8,0 \pm 1,19$ g/dL, MCV $69,9 \pm 10,1$ fL và MCH $22,1 \pm 3,0$ pg, tương tự nghiên cứu của Al-Allawi (2014) với chỉ số hemoglobin trung bình $8,25 \pm 1,2$ g/dL, MCV $63 \pm 7,3$ fL [4]. Các thông số này phù hợp với các chỉ số hemoglobin từ 7 – 10 g/dL và MCV 50 – 80 fL của

bệnh nhân β -thalassemia thể trung gian [8], [14].

4.2. Kết quả xác định đột biến gene *HBB* bằng kỹ thuật MARMS-PCR

Nghiên cứu của chúng tôi sử dụng kỹ thuật MARMS-PCR để xác định 8 đột biến phổ biến ở Việt Nam, bao gồm HbE hay cd 26 (G>A), cd 17 (A>T), cd 41/42 (-TTCT), cd 71/72 (+A), IVS2-654 (C>T), -28 (A>G), cd 95 (+A) và IVS1-1 (G>T).

Nghiên cứu của chúng tôi xác định được năm đột biến gene *HBB*, trong đó đột biến HbE chiếm tỷ lệ cao nhất với 47,5%, đột biến cd 17 (A>T) và cd 41/42 (-TTCT) chiếm tỷ lệ lần lượt là 35% và 12,5%, hai đột biến còn lại là -28 (A>G) và cd 71/72 (+A) cùng chiếm tỷ lệ là 2,5%.

Ba đột biến phổ biến nhất là HbE, cd 17 (A>T) và cd 41/42 (-TTCT), chiếm tổng tỷ lệ lên tới 95%. Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Filon (2000) trên 23 bệnh nhân điều trị thalassemia tại miền Bắc với tỷ lệ ba đột biến này lần lượt là 37%, 30% và 22%, chiếm tổng tỷ lệ là 89% [11]. Một nghiên cứu khác của Võ Thị Thường Lan (2018) tại miền Bắc cũng cho thấy đây là ba đột biến phổ biến nhất tuy nhiên với tỷ lệ thấp hơn, lần lượt là 26,4%, 16,4% và 19,4% [17]. Các nghiên cứu ở miền Nam và miền Trung cũng cho kết quả tương tự nghiên cứu của chúng tôi. Nghiên cứu của Nguyễn Khắc Hân Hoan (2011) trên 290 trường hợp thai cần chẩn đoán trước sinh bệnh thalassemia cho thấy ba đột biến gene *HBB* phổ biến nhất là HbE, cd 17 (A>T) và cd 41/42 (-TTCT) chiếm tỷ lệ lần lượt là 50%, 17% và 20,2% [3]. Nghiên cứu của Doro (2017) đối với 22 bệnh nhân phụ thuộc truyền máu và 4 trường hợp dị hợp tử cũng xác định HbE là đột biến phổ biến nhất, chiếm 29,2%, tiếp đó là đột biến cd 17 (A>T) và cd 41/42 (-TTCT) với tỷ lệ 25,0% và 18,8% [9].

Bên cạnh đó, hai đột biến cd 71/72 (+A) và -28 (A>G) cũng được tìm thấy trong nghiên cứu của chúng tôi với tỷ lệ giống nhau là 2,5%. Nghiên cứu của Filon (2000) công bố đột biến cd 71/72 (+A) chiếm tỷ lệ 2%, tương tự nghiên cứu của chúng tôi, nhưng không tìm thấy đột biến -28 (A>G) [11]. Hai nghiên cứu ở miền Nam và miền Trung cho thấy tỷ lệ hai loại đột biến cd 71/72 (+A) và -28 (A>G) gần tương tự như nhau, với tỷ lệ lần lượt là 6,4% và 2,1% trong nghiên cứu của Nguyễn Khắc Hân Hoan (2011), 6,3% và 2,1% trong nghiên cứu của Doro (2017) [2], [9].

Nghiên cứu của chúng tôi không tìm thấy các đột biến IVS 1-1 (G>T), IVS 2-654 (C>T) và cd 95 (+A). Đột biến dịch khung cd 95 (+A) được tìm thấy đầu tiên ở bệnh nhân HbE/ β -thalassemia người Thái Lan nhưng sau này chỉ được tìm thấy ở các gia đình người Việt [5], [22]. Đột biến này đã được công bố ở cả ba miền, cụ thể theo nghiên cứu của Filon (2000)

tại miền Bắc cho thấy đột biến chiếm tỷ lệ 9% [11], nghiên cứu của Svasti (2002) [21] và nghiên cứu của Nguyễn Khắc Hân Hoan (2011) [3] tại miền Nam cho thấy tỷ lệ lần lượt là 10,3% và 1,1%, và nghiên cứu của Doro (2017) [9] tại miền Trung công bố tỷ lệ 2,1%. Bên cạnh đó, đột biến IVS 1-1 (G>T) tuy không được ghi nhận ở miền Bắc, nhưng được tìm thấy ở miền Trung và miền Nam với tỷ lệ lần lượt là 8,3% và 6% [9], [21]. Hai đột biến cd 95 (+A) và đột biến IVS 1-1 (G>T) không được tìm thấy trong nghiên cứu của chúng tôi có thể do cỡ mẫu nghiên cứu nhỏ. Ngoài ra, đột biến IVS 2-654 (C>T) cũng không được tìm thấy. Đột biến này không được ghi nhận tại miền Bắc, miền Trung [9], [11], và chỉ được ghi nhận ở miền Nam Việt Nam [3], [15], [21]. Do đó, không tìm thấy đột biến IVS 2-654 (C>T) có thể do cỡ mẫu nghiên cứu nhỏ hoặc cũng có thể là do sự khác biệt trong phổ đột biến giữa các vùng miền.

Trong 21 bệnh nhân β -thalassemia thể trung gian, kiểu gene β phổ biến nhất là $\beta E/\beta o$ chiếm tỷ lệ 76,1%. Một bệnh nhân có kiểu gene $\beta E/\beta E$ và một bệnh nhân có kiểu gene $\beta E/\beta +$ cùng chiếm tỷ lệ 4,8%. Mặc dù kiểu gene $\beta E/\beta +$ được mong đợi dẫn đến bệnh nhẹ và kiểu gene $\beta E/\beta o$ có thể dẫn đến bệnh lý nặng nề nhưng kiểu gene $\beta E/\beta o$ lại phổ biến nhất trong những bệnh nhân này. Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Nuntakarn (2009) trên 103 bệnh nhân β -thalassemia thể nặng và 45 bệnh nhân β -thalassemia thể trung gian ở Đông Bắc Thái Lan. Trong số các bệnh nhân β -thalassemia thể trung gian, kiểu gene β phổ biến nhất là $\beta E/\beta o$ (36/45), và chỉ có 9/45 trường hợp có kiểu gene $\beta E/\beta +$ [18]. Bên cạnh đó, trong nghiên cứu của chúng tôi có một bệnh nhân mang kiểu gene $\beta o/\beta o$ (4,8%) và hai bệnh nhân dị hợp tử βo (9,5%). Hai bệnh nhân có kiểu gene dị hợp tử βo nhưng lại có đặc điểm lâm sàng của thalassemia thể trung gian có thể liên quan đến dư thừa các gene α có chức năng (trong trường hợp nhân ba hoặc nhân bốn gene α). Các đột biến này làm tăng mức độ không cân bằng giữa chuỗi α - và chuỗi β -globin do đó làm gia tăng mức độ bệnh [7].

4.3. Độ tương đồng của kỹ thuật MARMS-PCR so với kỹ thuật giải trình tự trong xác định đột biến gene *HBB*

Kết quả xác định đột biến gene *HBB* bằng kỹ thuật MARMS-PCR và giải trình tự hoàn toàn tương đồng, hệ số $\kappa = 1$, 95% CI: 0,8076 – 1.

Mặc dù có hơn 300 đột biến β -thalassemia đã được công bố thì cũng không cần thiết để xác định tất cả các đột biến đó đối với các bệnh nhân. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng các đột biến gene *HBB* mang tính đặc trưng theo chủng tộc. Với việc xác định 8 đột biến phổ biến như trong nghiên cứu của

chúng tôi đã có thể giúp phát hiện tới 98,2% các đột biến β -thalassemia tại Việt Nam [2]. Kỹ thuật MARMS-PCR đã được ứng dụng rộng rãi trên thế giới và cho thấy đây là một kỹ thuật đáng tin cậy, hiệu quả và phù hợp để phát hiện các đột biến điểm phổ biến trong quần thể.

5. KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu trên 21 bệnh nhân β -thalassemia

thể trung gian, chúng tôi rút ra một số kết luận như sau:

5.1. Năm đột biến gene *HBB* đã được xác định, trong đó đột biến phổ biến nhất là HbE, chiếm 47,5%, tiếp theo là đột biến cd 17 (A>T) và cd 41/42 (-TTCT) chiếm tỷ lệ lần lượt là 35% và 12,5%, hai đột biến -28 (A>G) và cd 71/72 (+A) cùng chiếm tỷ lệ là 2,5%.

5.2. Kỹ thuật MARMS-PCR là một kỹ thuật có độ chính xác cao, đơn giản và hiệu quả trong xác định đột biến β -thalassemia.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Y tế (2014). Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị bệnh Hemophilia và bệnh Thalassemia. *Quyết định 921/QĐ-BYT ngày 18/3/2014*.
- Nguyễn Khắc Hân Hoan (2012), *Nghiên cứu tầm soát và chẩn đoán trước sinh bệnh alpha và beta thalassemia*, Luận án Tiến sĩ, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh.
- Nguyễn Khắc Hân Hoan, Phạm Việt Thanh, Trương Đình Kiệt, Lâm Thị Mỹ (2011). Chẩn đoán trước sinh bệnh thalassemia trên 290 trường hợp thai. *Tạp chí nghiên cứu Y học*, 74(3), 1–7.
- Al-Allawi N.A.S., Jalal S.D., Mohammad A.M., et al. (2014). β -thalassemia intermedia in Northern Iraq: A single center experience. *Biomed Res Int*, 2014.
- Cai S. and Chehab F.F. (1996). New frameshift mutation, insertion of A, at codon 95 of the β -globin gene causes β -thalassemia in two Vietnamese families. *Hum Mutat*, 8(3), 293–294.
- Cao A. and Galanello R. (2010). Beta-thalassemia. *Genet Med*, 12(2), 61–76.
- Cappellini M., Cohen A., Porter J., et al. (2014), *Guidelines for the Management of Transfusion Dependent Thalassaemia (TDT)*, Thalassemia International Federation.
- Cappellini M.D., Musallam K.M., Cesaretti C., et al. (2009). Chapter 12: Thalassemia intermedia. *Disorders of erythropoiesis, erythrocytes and iron metabolism*. ESH, 287–309.
- Doro M.G., Casu G., Frogheri L., et al. (2017). Molecular Characterization of β -Thalassemia Mutations in Central Vietnam. *Hemoglobin*, 41(2), 96–99.
- Faraon R., Daraghmah M., Samarah F., et al. (2019). Molecular characterization of β -thalassemia intermedia in the West Bank, Palestine. *BMC Hematol*, 19(1), 1–9.
- Filon D., Oppenheim A., Rachmilewitz E.A., et al. (2000). Molecular analysis of β -thalassemia in Vietnam. *Hemoglobin*, 24(2), 99–104.
- Fortina P., Dotti G., Conant R., et al. (1992). Detection of the most common mutations causing β -thalassemia in mediterraneans using a multiplex amplification refractory mutation system (MARMS). *Genome Res*, 2(2), 163–166.
- Fucharoen S. and Winichagoon P. (2011). Haemoglobinopathies in Southeast Asia. *Indian J Med Res*, 134(10), 498–506.
- Grow K., Vashist M., Abrol P., et al. (2014). Beta thalassemia in india: Current status and the challenges ahead. *Int J Pharm Pharm Sci*, 6(4), 28–33.
- Le Thi Hao, Serge Pissard, Pham Hung Van, et al. (2001). Molecular analysis of β -thalassemia in South Vietnam. *Hemoglobin*, 25(3), 305–309.
- Hassan S., Ahmad R., Zakaria Z., et al. (2013). Detection of β -globin gene mutations among β -thalassaemia carriers and patients in malaysia: Application of multiplex amplification refractory mutation system-polymerase chain reaction. *Malaysian J Med Sci*, 20(1), 13–20.
- Lan Thi Thuong Vo, Trang Thu Nguyen, Hai Xuan Le, Ha Thi Thu Le (2018). Analysis of common β -thalassemia mutations in North Vietnam. *Hemoglobin*, 42(1), 16–22.
- Nuntakarn L., Fucharoen S., Fucharoen G., et al. (2009). Molecular, hematological and clinical aspects of thalassemia major and thalassemia intermedia associated with Hb E- β -thalassemia in Northeast Thailand. *Blood Cells, Mol Dis*, 42(1), 32–35.
- Old J.M. (2003). DNA diagnosis of hemoglobin mutations. *Hemoglobin disorders: molecular methods and protocols*. Humana Press, 101–116.
- Patrinis G.P., Giardine B., Riemer C., et al. (2004). Improvements in the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations for populations and sequence variation studies. *Nucleic Acids Res*, 32, 537–541.
- Saovaros Svasti M.L., Hieu T.M., Munkongdee T., et al. (2002). Molecular analysis of β -thalassemia in South Vietnam. *Am J Hematol*, 71(2), 85–88.
- Winichagoon P., Fucharoen S., Wilairat P., et al. (1992). Identification of five rare mutations including a novel frameshift mutation causing β^0 -thalassemia in Thai patients with β^0 -thalassemia/hemoglobin E disease. *BBA - Mol Basis Dis*, 1139(4), 280–286.