

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO**

**BỘ Y TẾ**

**TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI**



**NGUYỄN THỊ MAI**

**NGHIÊN CỨU PHÁT HIỆN BỆNH NHÂN  
VÀ NGƯỜI MANG GEN BỆNH HEMOPHILIA A  
DỰA TRÊN PHÂN TÍCH PHẢ HỆ**

**Chuyên ngành: Huyết học và Truyền máu**

**Mã số: 62720151**

**TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC**

**Hà Nội - 2018**

**CÔNG TRÌNH HOÀN THÀNH TẠI:  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI**

**Người hướng dẫn khoa học:**

**1. GS. TS Nguyễn Anh Trí**

**2. PGS.TS Nguyễn Thị Nữ**

**Phản biện 1:** .....

.....

**Phản biện 2:** .....

.....

**Phản biện 3:** .....

.....

**Luận án được bảo vệ tại Hội đồng chấm luận án cấp trường**

**Vào hồi ..... giờ ..... ngày ..... tháng ..... năm 2018**

**Có thể tìm hiểu luận án tại các thư viện:**

- Thư viện Quốc gia Việt Nam
- Thư viện Trường Đại học Y Hà Nội



## **ĐẶT VẤN ĐỀ**

### **1. Tính cấp thiết của đề tài:**

Hemophilia là bệnh ưa chảy máu di truyền do thiếu yếu tố VIII/IX. Gen tổng hợp yếu tố VIII /IX nằm trên nhiễm sắc thể X và không có alen tương ứng trên nhiễm sắc thể Y. Bệnh di truyền lặn do đó gặp chủ yếu ở nam giới, còn phụ nữ là người mang gen.

Nếu được chẩn đoán sớm và điều trị đầy đủ, người bệnh hemophilia hoàn toàn có thể có được cuộc sống bình thường, ngược lại nếu được chẩn đoán muộn họ sẽ bị các biến chứng do chảy máu nhiều lần, trở thành người tàn tật, thậm chí chết sớm. Người phụ nữ mang gen ngoài việc có thể truyền gen bệnh cho thế hệ sau còn có nguy cơ bị chảy máu khó cầm do giảm yếu tố đông máu. Ước tính tại Việt Nam có khoảng 6000 người bị hemophilia và 30.000 người mang gen bệnh, tuy nhiên mới chỉ có khoảng 40% bệnh nhân được chẩn đoán, còn đa số người mang gen chưa được chẩn đoán và quản lý. Do là bệnh lí di truyền nên trong một gia đình bệnh nhân có thể có nhiều người bị bệnh và nhiều người mang gen bệnh, vì vậy, căn cứ vào phả hệ của người bệnh đã được chẩn đoán có thể phát hiện ra các trường hợp bệnh nhân mới và người mang gen, giúp cho người bệnh và người mang gen hemophilia được chẩn đoán sớm và quản lý kịp thời, có ý nghĩa quan trọng trong điều trị và phòng bệnh.

### **2. Mục tiêu của đề tài:**

1. *Phát hiện các trường hợp hemophilia A và người mang gen bệnh trong gia đình các bệnh nhân hemophilia A dựa vào phân tích phả hệ.*
2. *Phân tích một số đặc điểm xuất huyết và xét nghiệm đông máu ở bệnh nhân hemophilia A và người mang gen bệnh mới được phát hiện.*

### **3. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài:**

*Đóng góp mới về khoa học:*

- Triển khai và ứng dụng thành công phương pháp phân tích phả hệ trong phát hiện bệnh nhân và người mang gen bệnh hemophilia; Phát hiện được một số trường hợp hiếm gặp: hemophilia A kết hợp thiếu yếu tố VII bẩm sinh, thiếu yếu tố VII bẩm sinh, người mang gen hemophilia A kết hợp hemophilia B.

- Xây dựng được giá trị ngưỡng của tỉ số VIII/vWF:Ag trong chẩn đoán trình trạng mang gen;

- Thay đổi quan niệm về việc người mang gen hemophilia có thể có biểu hiện xuất huyết và cần được coi như bệnh nhân nếu có nồng độ yếu tố VIII < 40%.

*Giá trị thực tiễn của đề tài:*

- Phát hiện được nhiều bệnh nhân mới và người mang gen có ý nghĩa trong việc chẩn đoán và phòng bệnh hemophilia; giúp bệnh nhân và người mang gen được chẩn đoán, điều trị và tư vấn, tránh các biến chứng do chẩn đoán muộn gây ra.

- Là tiền đề để tư vấn di truyền và chẩn đoán trước sinh cho các thành viên trong gia đình bệnh nhân.

### 3. Cấu trúc của đề tài:

- Luận án được trình bày trong 141 trang (không bao gồm tài liệu tham khảo và phụ lục), bao gồm 7 phần: đặt vấn đề (2 trang), tổng quan (30 trang), đối tượng và phương pháp nghiên cứu (25 trang), kết quả nghiên cứu (33 trang), bàn luận (49 trang), kết luận (2 trang), kiến nghị (1 trang).

- Luận án gồm 35 bảng, 12 biểu đồ, 10 sơ đồ, 5 hình. Sử dụng 132 tài liệu tham khảo bao gồm 112 tài liệu tiếng Anh, 20 tài liệu tiếng Việt. Phụ lục gồm một số sơ đồ phả hệ của bệnh nhân, mẫu thu thập thông tin xây dựng phả hệ, phiếu điều tra tình trạng chảy máu, danh sách đối tượng nghiên cứu.

## Chương 1: TỔNG QUAN

### 1.1. Bệnh hemophilia:

Hemophilia A là một bệnh rối loạn chảy máu di truyền hay gặp nhất do thiếu hụt hoặc bất thường chức năng của yếu tố VIII trong huyết tương. Bệnh di truyền lặn, liên quan đến nhiễm sắc thể giới tính X vì vậy đa số người bị bệnh là nam giới, còn phụ nữ là người mang gen bệnh. Mặc dù là bệnh di truyền nhưng có khoảng 30% các trường hợp không có tiền sử gia đình, trường hợp này được gọi là đơn phát.

Chẩn đoán xác định hemophilia A dựa vào 3 đặc điểm: (1). Triệu chứng lâm sàng có chảy máu lâu cầm, tái phát nhiều lần, hay gặp ở khớp, cơ; (2). Tiền sử gia đình bên mẹ có nam giới bị chảy máu lâu cầm; (3). Xét nghiệm đông máu có yếu tố VIII < 40%. Căn cứ vào nồng độ yếu tố VIII chia làm 3 mức độ: mức độ nặng (yếu tố VIII < 1%), mức độ trung bình (yếu tố VIII 1- 5%), mức độ nhẹ (yếu tố VIII từ 5 – 40%).

### 1.2 Cơ sở sinh học và di truyền yếu tố VIII

Yếu tố VIII là một heterodimer gồm hai chuỗi nặng và nhẹ nối với nhau bởi ion đồng. Cấu trúc của phức hợp này được giữ ổn định nhờ sự tương tác giữa các liên kết ưa nước và kỵ nước với yếu tố von Willebrand và  $Ca^{2+}$ . Gen quy định tổng hợp yếu tố VIII nằm ở vị trí Xq28 trên NST giới tính X, là một trong những gen lớn nhất của người, có kích thước 186 Kb gồm 26 exon. Đột biến gen *F8* gây thiếu hụt hoặc bất thường chức năng protein yếu tố VIII, làm giảm sản xuất thrombin dẫn đến tình trạng chảy máu lâu cầm ở bệnh nhân hemophilia A. Có nhiều dạng đột biến gen *F8* gây bệnh hemophilia A: Đột biến điểm chiếm tỷ lệ cao nhất (47,5%), đột biến đảo đoạn gồm đảo đoạn intron 1 và intron 22 (36,7%), đột biến mất đoạn gen chiếm khoảng 10 - 15%. Tùy thuộc vào kiểu gen và vị trí đột biến trên gen *F8* mà gây ra bệnh với mức độ nặng nhẹ khác nhau.

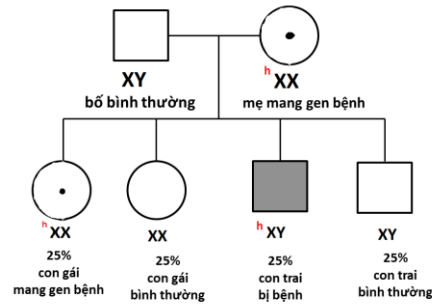
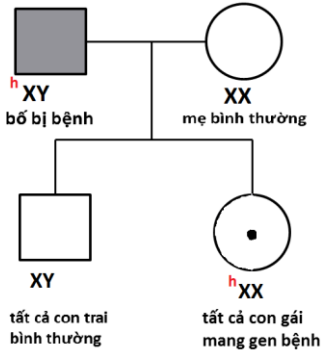
### 1.3 Các phương pháp chẩn đoán người mang gen:

#### 1.3.1. Phân tích phả hệ

Do gen quy định sản xuất yếu tố VIII/IX nằm trên nhiễm sắc thể X, di truyền lặn và không có alen tương ứng trên nhiễm sắc thể Y vì vậy căn cứ vào quy luật di truyền của Mendel, dựa vào phả hệ có thể xác định được nam giới có khả năng

bị bệnh, nam giới bình thường, người phụ nữ chắc chắn mang gen và người phụ nữ có khả năng mang gen.

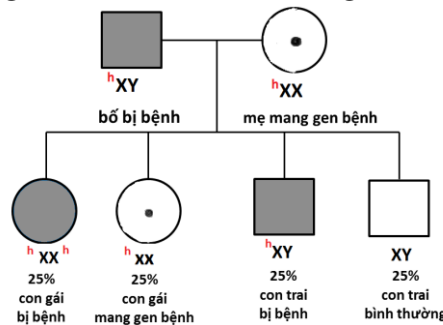
Nếu một người đàn ông bị bệnh lấy một người phụ nữ bình thường thì tất cả con gái của họ là người mang gen, còn con trai thì bình thường (sơ đồ 1.1). Nếu một người phụ nữ mang gen hemophilia lấy một người đàn ông bình thường thì xác suất cho mỗi lần sinh con của họ là: 25% con trai bình thường, 25% con trai bị bệnh, 25% con gái bình thường, 25% con gái mang gen bệnh (sơ đồ 1.2).



Kết quả có thể trên một lần sinh

### Sơ đồ 1.1. và 1.2. Sơ đồ di truyền bệnh hemophilia

Nếu một người phụ nữ mang gen bệnh kết hôn với một người đàn ông bị bệnh thì xác suất cho mỗi lần sinh con của họ là: 25% con trai bị bệnh, 25% con trai bình thường, 25% con gái bị bệnh, 25% con gái mang gen bệnh (sơ đồ 1.3).



Kết quả có thể trên một lần sinh

### Sơ đồ 1.3. Sơ đồ di truyền bệnh hemophilia

**Người phụ nữ chắc chắn mang gen khi thỏa mãn 1 trong 4 điều kiện sau:** (1). Có ít nhất hai con trai bị bệnh; (2). Có bố là bệnh nhân hemophilia; (3) Có 1 con trai bị bệnh và có ít nhất 1 người đàn ông trong họ mẹ bị bệnh; (4). Có 1 con trai bị bệnh và trong gia đình họ mẹ có ít nhất 1 người được chẩn đoán là người mang gen.

**Người phụ nữ có khả năng mang gen khi thỏa mãn 1 trong 3 điều kiện sau:** (1). Có 1 con trai bị bệnh và trong gia đình không có ai bị bệnh cũng như mang gen bệnh; (2). Có ít nhất 1 người đàn ông trong họ mẹ bị bệnh và không có con trai bị bệnh; (3). Là con của một người mang gen bệnh.

#### 1.3.2. Phân tích yếu tố đông máu

Phân tích tỉ số VIII/vWF :Ag có thể xác định được tình trạng mang gen hemophilia nếu người phụ nữ có khả năng mang gen có tỉ số VIII/vWF:Ag nhỏ hơn ngưỡng. Nhược điểm của phương pháp này là không thể khẳng định được

tình trạng mang gen nếu có tỉ số cao hơn ngưỡng, hơn nữa không có một hằng số chung cho tất cả các phòng xét nghiệm, mỗi nơi phải xây dựng cho mình một ngưỡng riêng. Hiện nay, phương pháp này vẫn được áp dụng tại các cơ sở chưa triển khai được xét nghiệm di truyền hoặc các trường hợp không phát hiện được tổn thương di truyền của cá thể bị hemophilia trong gia đình.

### **1.3.3. Phân tích tổn thương di truyền**

#### **1.3.3.1. Phân tích trực tiếp đột biến**

Là phương pháp phát hiện tình trạng mang gen của các thành viên nữ trong gia đình dựa trên đột biến chỉ điểm đã xác định được trên bệnh nhân hemophilia A. Có hai kỹ thuật chính để phát hiện đột biến là kỹ thuật PCR và giải trình tự gen. Với các kỹ thuật này, phân tích trực tiếp có thể phát hiện được 97% các trường hợp hemophilia A. Đây là phương pháp hiện đại, chính xác, tuy nhiên, do độ lớn của gen cũng như sự đa dạng về đột biến nên yêu cầu kỹ thuật và tay nghề cao, tốn nhiều thời gian và chi phí đắt đỏ. Đối với các trường hợp hemophilia A mức độ nặng thì đột biến nên được sàng lọc đầu tiên là đảo đoạn intron 22 sau đó đến đảo đoạn intron 1 vì là các đột biến hay gặp (45 - 50% đối với đảo đoạn intron 22 và 1 - 5% đối với đảo đoạn intron 1).

#### **1.3.3.2. Phân tích liên kết**

Phân tích liên kết là phương thức theo dõi sự di truyền của nhiễm sắc thể X bị đột biến trong gia đình dựa trên các đa hình liên kết trên nhiễm sắc thể X. Các đa hình thường sử dụng enzym cắt giới hạn *BclI*, *HindIII*, *XbaI*, *BglII*, *MspI* (1), *MspI* (2), *TaqI* và đa hình STR trong intron 13 và 22. Phương pháp phân tích liên kết thực hiện nhanh, tương đối rẻ tiền, đáng tin cậy để phát hiện các trường hợp bị mang gen bệnh hemophilia A trong gia đình có mẹ mang gen bệnh. Tuy nhiên, hiệu quả của phương pháp phụ thuộc vào giá trị thông tin của các đa hình sử dụng, phụ thuộc vào từng chủng tộc người.

### **1.4. Chẩn đoán trước sinh :**

Chẩn đoán trước sinh là một phần quan trọng trong chăm sóc người mang gen và gia đình của họ. Trong mỗi lần sinh, người mang gen có nguy cơ truyền gen bệnh cho 50% con gái và 50% con trai. Các thai phụ có nguy cơ sinh con bị hemophilia được lấy mẫu tế bào thai nhi để phân tích đột biến hoặc lấy mẫu máu thai nhi định lượng yếu tố VIII.

### **1.5. Phát hiện bệnh nhân và người mang gen hemophilia:**

#### **1.5.1. Phát hiện bệnh nhân:**

Hiện nay Việt Nam ước tính còn tới 60% bệnh nhân vẫn chưa được chẩn đoán và việc phát hiện bệnh nhân mới trở nên hết sức cần thiết.

Để phát hiện bệnh nhân mới có nhiều cách trong đó lần theo dấu vết là phương pháp căn cứ vào cơ chế di truyền của bệnh mà xác định đối tượng chính là những người có quan hệ huyết thống với bệnh nhân, từ đó tiến hành xét nghiệm chẩn đoán. Do là một bệnh lí hiếm gặp, lại có tính chất di truyền nên việc khoanh vùng đối tượng giúp cho việc chẩn đoán có hiệu quả hơn rất nhiều.

Việc lần theo dấu vết phát hiện bệnh nhân mới đã được triển khai chủ động tại viện Huyết học – Truyền máu trung ương từ năm 2004, giúp cho người bệnh được chẩn đoán sớm và chẩn đoán đúng, được tư vấn và điều trị kịp thời.

### **1.5.2. Phát hiện người mang gen hemophilia**

Có nhiều phương pháp phát hiện người mang gen. Việc phối hợp các phương pháp có thể phát hiện được gần như 100% các trường hợp trong đó dựa vào phân tích phả hệ là phương pháp được áp dụng đầu tiên. Đây là phương pháp đơn giản, có thể cho biết tình trạng người phụ nữ trong gia đình bệnh nhân chắc chắn mang gen hoặc có khả năng mang gen để từ đó đưa ra các chiến lược chẩn đoán cho phù hợp với đặc điểm chủng tộc, kinh tế, nhân lực, văn hóa và tôn giáo của từng quốc gia.

Hiện trên cả nước đã có một số cơ sở triển khai các phương pháp phát hiện người mang gen. Mặc dù vậy, công tác phát hiện và quản lý người mang gen vẫn còn chưa có tính hệ thống và chưa được quan tâm đúng mực ở các trung tâm hemophilia.

## **Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. Đối tượng nghiên cứu**

#### **2.1.1. Đối tượng nghiên cứu**

Là bệnh nhân và người nhà bệnh nhân bao gồm:

- *Nhóm 1*: 100 bệnh nhân hemophilia A không có quan hệ huyết thống đã được chẩn đoán (quy ước là bệnh nhân gốc).
- *Nhóm 2*: 1402 thành viên trong gia đình của 100 bệnh nhân gốc bao gồm:
  - + 869 nam giới: Là những người có khả năng mắc bệnh hemophilia;
  - + 533 nữ giới: Là những người có khả năng mang gen hoặc chắc chắn mang gen hemophilia, gọi chung là người có liên quan đến hemophilia.
- *Nhóm 3*: 70 người phụ nữ khỏe mạnh (nhóm chứng).

#### **2.1.2. Tiêu chuẩn lựa chọn và loại trừ**

##### **2.1.2.1. Nhóm 1: Các bệnh nhân gốc**

\* *Tiêu chuẩn lựa chọn*:

Bệnh nhân đã được chẩn đoán hemophilia A có khả năng khai thác tiền sử gia đình từ 3 thế hệ trở lên.

\* *Tiêu chuẩn loại trừ*:

Không khai thác được tiền sử gia đình đủ 3 thế hệ; Thành viên trong gia đình không có khả năng tập hợp và tham gia nghiên cứu; Không đồng ý tham gia nghiên cứu.

##### **2.1.2.2. Nhóm 2:**

Các thành viên trong gia đình bệnh nhân gốc có khả năng mắc bệnh hoặc mang gen bệnh hemophilia xác định theo quy luật di truyền Mendel.

##### **a. Nam giới có khả năng mắc hemophilia:**

- Các thành viên có quan hệ huyết thống với bệnh nhân thỏa mãn điều kiện:



+ Cùng thế hệ hoặc trước thế hệ với bệnh nhân: Anh em ruột, những người họ hàng bên mẹ bệnh nhân bao gồm: anh em họ, cậu ruột, cậu họ, bác ruột, bác họ, ông ngoại, ông họ, cụ ngoại, cụ họ...

+ Các thế hệ sau của bệnh nhân: Là những nam giới có bệnh nhân là họ hàng bên mẹ bao gồm cháu gọi bằng cậu, cháu gọi là ông ngoại, chắt ngoại...

- Có thể khai thác được thông tin về tình trạng chảy máu bất thường của thành viên đó.

#### *b. Nữ giới có liên quan đến hemophilia:*

Mẹ, chị em ruột và những người có quan hệ huyết thống bên ngoại với bệnh nhân bao gồm: Cùng thế hệ: chị em họ; Trên 1 thế hệ: dì, già, dì già họ; Trên 2 thế hệ: bà ngoại, bà họ; Trên 3 thế hệ: cụ ngoại, cụ họ; Trên 4 thế hệ trở lên: kị ngoại, kị họ...; Sau 1 thế hệ: con gái, cháu gọi bằng cậu, cháu gọi bằng bác (ruột hoặc họ); Sau 2 thế hệ: cháu gọi là ông; Sau 3 thế hệ: chắt gọi là cụ...

\* *Người có khả năng mang gen:* thỏa mãn 1 trong 3 điều kiện: (1). Có 1 con bị hemophilia; (2). Có 1 thành viên trong gia đình được chẩn đoán hemophilia; (3). Là con của người mang gen.

\* *Người chắc chắn mang gen bệnh:* thỏa mãn 1 trong 4 điều kiện sau: (1). Là con gái của bệnh nhân hemophilia; (2). Có ít nhất 2 con trai bị bệnh; (3). Có 1 con trai bị bệnh và có ít nhất 1 thành viên nam giới trong họ mẹ bị hemophilia; (4). Có 1 con trai bị bệnh và ít nhất 1 thành viên nữ trong gia đình họ mẹ được chẩn đoán là người mang gen.

\* Trong nhóm nữ chắc chắn mang gen chọn ra 83 người thỏa mãn điều kiện: tuổi từ 14 - 50, không có thai và không uống thuốc tránh thai, không bị viêm gan để so sánh với nhóm chứng.

#### *2.1.2.3. Nhóm 3 (nhóm chứng):*

70 người phụ nữ khỏe mạnh, tuổi từ 14 – 50, không có thai hoặc uống thuốc tránh thai, tự nguyện tham gia nghiên cứu.

## **2.2. Phương pháp nghiên cứu**

### **2.2.1. Thiết kế nghiên cứu**

Mô tả cắt ngang, hồi cứu.

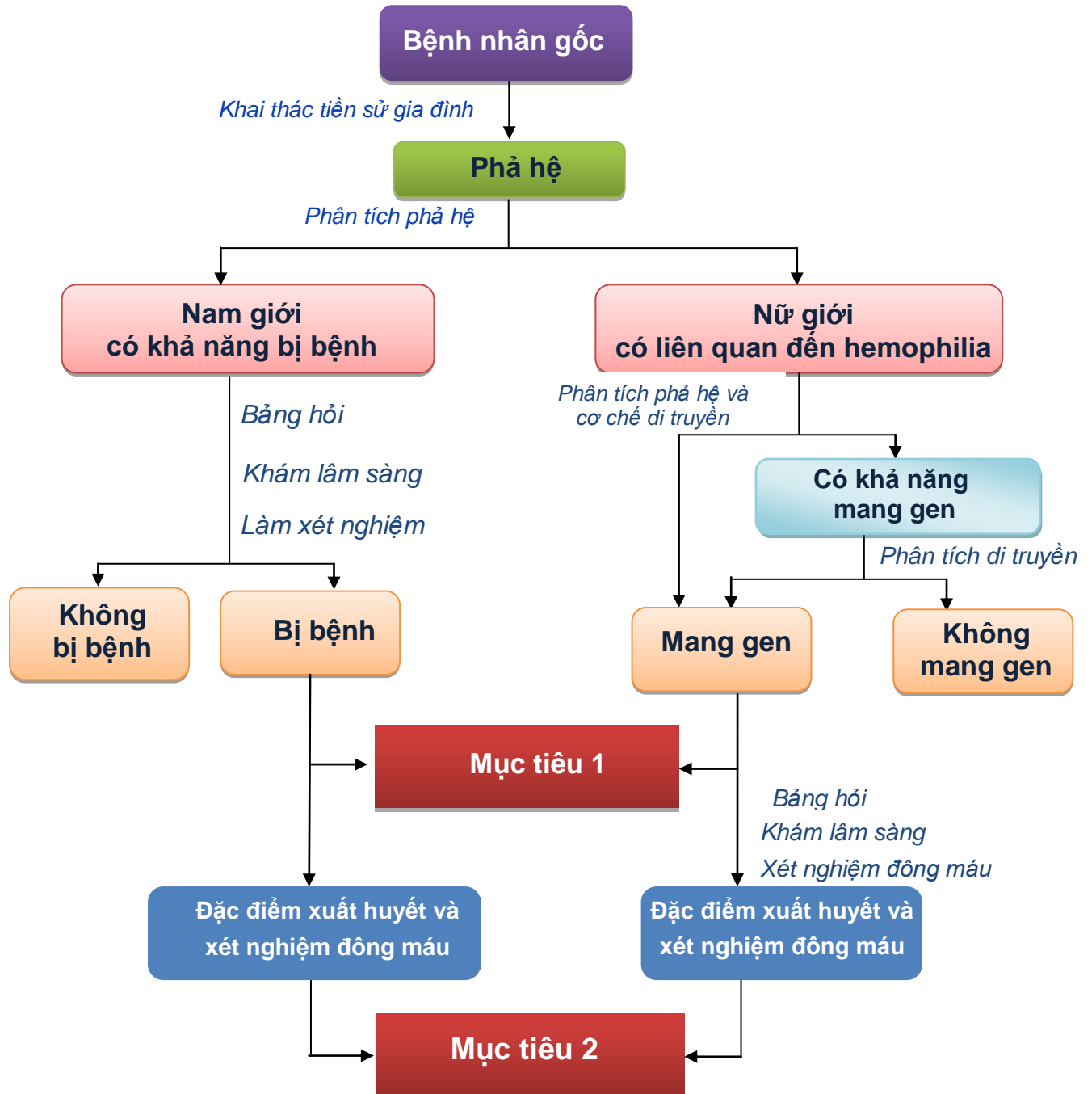
### **2.2.2. Các chỉ số nghiên cứu**

- Thông tin chung, tiền sử gia đình, các triệu chứng lâm sàng, thể bệnh, mức độ bệnh.

- Các chỉ số xét nghiệm: Xét nghiệm đông máu vòng đầu (PT, APTT, TT, Fibrinogen, số lượng tiểu cầu), kháng đông nội sinh, nồng độ yếu tố đông máu (VII, VIII, IX, vWF:Ag), đột biến gen yếu tố VIII, đa hình gen yếu tố VIII/IX.

### **2.2.3. Phương pháp chọn mẫu, các bước tiến hành**

Phương pháp chọn mẫu: Chọn mẫu thuận tiện



Sơ đồ 2.1. Sơ đồ nghiên cứu

### 2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu:

Hồi cứu: Từ 2005 – 2011; Tiến cứu: Từ 2011 – 2016 – tại viện Huyết học – Truyền máu trung ương và Trung tâm Nghiên cứu Gen – Protein Đại học Y Hà Nội.

### 2.5. Đề tài tuân thủ chặt chẽ đạo đức trong nghiên cứu

## Chương 3 KẾT QUẢ

### 3.1. Một số đặc điểm của bệnh nhân gốc

Có 79/100 người chiếm tỉ lệ 79% có tiền sử gia đình.

Bảng 3.1. Mức độ bệnh và đặc điểm tổn thương di truyền của bệnh nhân gốc

		Mức độ (n = 100)		Nặng	Trung bình	Nhẹ	Tổng số	
		Số lượng	Tỉ lệ %					
Đặc điểm tổn thương di truyền	Đảo đoạn intron 22	n	23	0	0	23	32	
		%	30,3	0	0			
	Đảo đoạn intron 1	n	1	0	0	1		
		%	1,3	0	0			
	Đột biến điểm	n	5	1	1	8		
	Đột biến mất đoạn	n	1					

Nhận xét:

- Phần lớn bệnh nhân gốc là mức độ nặng (76%). Tỉ lệ bệnh nhân mức độ trung bình và nhẹ lần lượt là 9% và 15%.

- 23/76 (30,3%) bệnh nhân mức độ nặng có đảo đoạn intron 22; 1/76 (1,3%) bệnh nhân mức độ nặng có đảo đoạn intron 1; 8/9 người tìm được đột biến bằng giải trình tự gen trong đó có 7 đột biến điểm và 1 đột biến mất đoạn.

### 3.2. Phát hiện bệnh nhân mới và người mang gen bệnh

Từ 100 bệnh nhân gốc đã lập ra được 100 phả hệ của 100 gia đình.

Bảng 3.2. Số lượng thế hệ khai thác được thông tin

	3 thế hệ	4 thế hệ	5 thế hệ	6 thế hệ	7 thế hệ	X ± SD
Số lượng (n = 100)	30	58	11	0	1	3,8 ± 0,7
%	30	58	11	0	1	

Nhận xét: Trung bình mỗi gia đình khai thác được thông tin trong vòng 3,8 thế hệ, dao động từ 3 - 7 thế hệ.

#### 3.2.1. Phát hiện bệnh nhân mới

Bảng 3.3 Số người có liên quan đến hemophilia trong các gia đình

Tình trạng	Đối tượng	Nam		Nữ		Tổng số
		n	%	n	%	
Có khả năng bị bệnh (nam)/ mang gen (nữ)		869	73,8	1129	96,8	2343
		308	26,2	37	3,2	
Không có khả năng mắc bệnh (nam)/mang gen (nữ)						
Tổng số		1177	100	1166	100	

Nhận xét: Phân tích 2343 thành viên có quan hệ huyết thống xác định được 869/1177 (73,8%) nam có khả năng bị bệnh và 1129/1166 (96,8%) nữ có liên quan đến hemophilia.

Bảng 3.4. Kết quả phát hiện nam giới nghi ngờ bị hemophilia qua bảng hỏi

Chảy máu bất thường	Còn sống		Đã tử vong		Tổng số		% theo tổng số nam có liên quan (n = 869)
	n	%	n	%	n	%	
Có	166	68,6	76	31,4	242	69,7	27,8
Không (thuộc gia đình mức độ nhẹ)	105	100	0	0	105	30,3	12,1
Tổng số	271	78,1	76	21,9	347	100	39,9

*Nhận xét:* Người nghi ngờ bị bệnh là người có biểu hiện chảy máu bất thường và người không có triệu chứng chảy máu bất thường thuộc gia đình bệnh nhân mức độ nhẹ. Qua bảng hỏi phát hiện 347/869 (39,9%) người nghi ngờ bị hemophilia trong đó có 271 người còn sống (78,1%) và 76 người đã tử vong (21,9%).

*Bảng 3.5 Kết quả xét nghiệm đông máu của những người nam giới nghi ngờ bị bệnh*

	Bị bệnh		Không bị bệnh		Tổng số	
	n	100	n	100	n	100
<b>Có chảy máu bất thường</b>	145	145	0	0	145	100
<b>Không chảy máu bất thường</b>	2	3,7	52	96,3	54	100
<b>Tổng số</b>	<b>147</b>	<b>73,9</b>	<b>52</b>	<b>26,1</b>	<b>199</b>	<b>100</b>
<b>Tỉ lệ (trên tổng số nam có khả năng bị bệnh)</b>	<b>16,9</b>		<b>5,9</b>		<b>22,9</b>	

*Nhận xét:*

199/271 (73,4%) người nghi ngờ hemophilia còn sống được làm xét nghiệm trong đó 145/145 người có biểu hiện chảy máu bất thường bị bệnh và 2/54 người không có biểu hiện chảy máu bất thường thuộc gia đình các bệnh nhân mức độ nhẹ bị bệnh. Tổng số bệnh nhân mới được chẩn đoán là 147 người, chiếm tỉ lệ 73,9% người được xét nghiệm và 16,9% nam giới có liên quan. Những người còn lại do đi vắng nên chưa được làm xét nghiệm.

### 3.2.2. Phát hiện người mang gen bệnh

#### 3.2.2.1. Phát hiện người mang gen bệnh dựa vào phân tích phả hệ

*Bảng 3.6. Kết quả phát hiện người chắc chắn mang gen và người có khả năng mang gen qua phân tích phả hệ*

Đối tượng			n		Tỷ lệ %		
Người chắc chắn mang gen hemophilia	Con của bố bị hemophilia	Đã có con	113	61	61,7	34,3	18,5
		Chưa có con					
	Có ít nhất 2 con trai bị bệnh		49			14,9	100
	Có 1 con và 1 thành viên khác trong gia đình bị bệnh		156			47,4	
Có 1 con bị bệnh và ít nhất 1 thành viên trong gia đình là người mang gen		11		3,3			
Người có khả năng mang gen hemophilia	Có 1 con bị bệnh		21		10,3	100	
	Có ít nhất 1 thành viên trong gia đình bị bệnh		183		89,7		
	Là con của một người mang gen bệnh		0		0		
<b>Tổng số</b>			<b>533</b>		<b>100</b>		

*Nhận xét:*

- 533/1129 (47%) người có liên quan đến hemophilia được tiếp cận do khai thác được thông tin.

- Có 329/533 người (61,7%) chắc chắn mang gen và 204/533 người (38,3%) có khả năng mang gen.

- Người chắc chắn mang gen hay gặp nhất là người có một con trai và một thành viên khác trong gia đình bị hemophilia (47,4%), tiếp đến là những người có

bộ bị hemophilia (34,3%) và người có từ hai con trở lên bị bệnh (14,9%). Chỉ có 3,3% người thỏa mãn điều kiện có một con bị bệnh và có ít nhất một người trong gia đình được chẩn đoán mang gen. Trong số này có 52 người chưa có con.

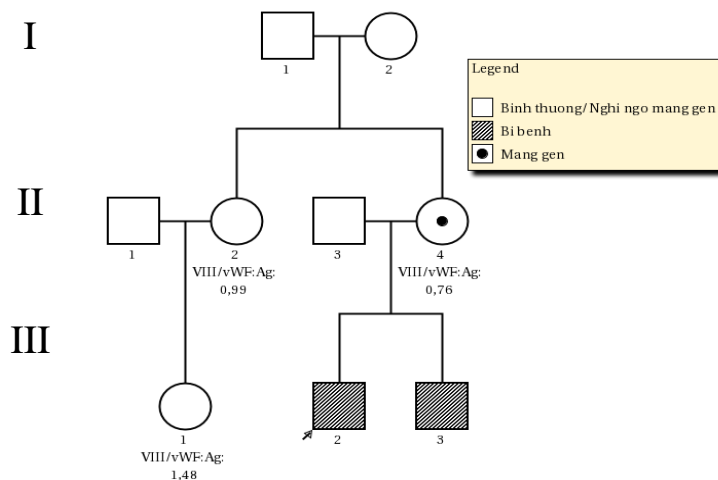
- 89,7% người có khả năng mang gen hemophilia là người có thành viên trong gia đình bị hemophilia, chỉ có 21 người (10,3%) có 1 con bị hemophilia. Không có thành viên nào chỉ thỏa mãn điều kiện là con của một người mẹ mang gen bệnh.

*Bảng 3.7. Tỷ lệ phát hiện người mang gen theo mức độ bệnh của bệnh nhân gốc*

Mức độ của bệnh nhân gốc	Số lượng người mang gen được phát hiện	Số lượng người mang gen được phát hiện mỗi phả hệ	
		X ± SD	Min - max
Nặng <sup>(1)</sup> (n = 76)	183	2,4 ± 2,1	0 - 8
Trung bình <sup>(2)</sup> (n = 9)	42	4,7 ± 1,7	1 - 7
Nhẹ <sup>(3)</sup> (n = 15)	104	6,9 ± 6,0	1 - 22
Tổng số (n = 100)	329	3,3 ± 3,4	0 - 22
p	$p_{(1)(2)} < 0,05$ ; $p_{(1)(3)} < 0,05$ ; $p_{(2)(3)} > 0,05$		

*Nhận xét:*

Trung bình mỗi gia đình có 3,3 người chắc chắn mang gen, trong đó gia đình bệnh nhân mức độ nặng có ít người mang gen được phát hiện hơn gia đình bệnh nhân mức độ trung bình và mức độ nhẹ ( $p < 0,05$ ).



*Sơ đồ 3.1 Phả hệ gia đình bệnh nhân Nguyễn Quang M. (số 26)*

*Nhận xét:*

- Bệnh nhân Nguyễn Quang M. (III:3) bị hemophilia mức độ nặng. Phân tích phả hệ xác định các thành viên có liên quan đến hemophilia bao gồm:
  - + Nam có khả năng mắc bệnh: I:1 và III:3;
  - + Nữ có liên quan đến hemophilia: I:2, II:2, II:4, III:1.
- Qua phỏng vấn phát hiện em trai bệnh nhân là III:3 có biểu hiện chảy máu lâu cầm, làm xét nghiệm cho thấy III:3 bị hemophilia A.
- Mẹ bệnh nhân II:4 có 2 con bị hemophilia A vì vậy là người chắc chắn mang gen hemophilia A.

- Các thành viên nữ khác trong gia đình bao gồm I:2, II:2, III:1 là người có khả năng mang gen hemophilia do trong gia đình có người bị bệnh đồng thời chưa có con bị hemophilia.

3.2.2.2. Phối hợp các phương pháp phát hiện người mang gen ở người có khả năng mang gen

a. Phân tích di truyền

Bảng 3.8. Kết quả chẩn đoán tình trạng mang gen bằng phân tích di truyền

	Mang gen		Không mang gen		Tổng số	
	n	%	n	%	n	%
<b>Phân tích trực tiếp gen F8 (đảo đoạn intron 1, đảo đoạn intron 22, đột biến điểm và đột biến mất đoạn)</b>	30	42,3	41	57,7	71	100
<b>Phân tích gián tiếp gen F8 (PCR – RFLP với BclI)</b>	8	47,1	9	52,9	17	100
<b>Tổng số</b>	38	43,2	50	56,8	88	100

Nhận xét:

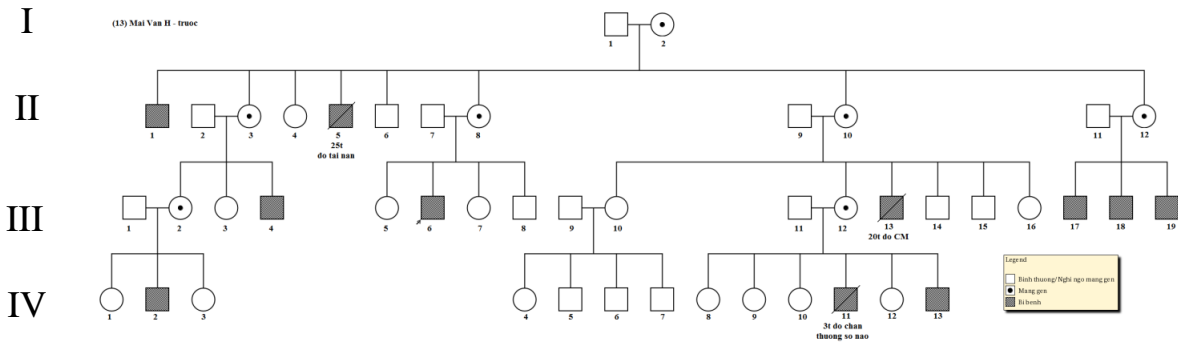
Phân tích di truyền cho 88 người có khả năng mang gen phát hiện 38/88 (43,2%) người mang gen và 50/88 (56,8%) người không mang gen.

Bảng 3.9. Tỷ lệ phát hiện người mang gen khi phối hợp các phương pháp

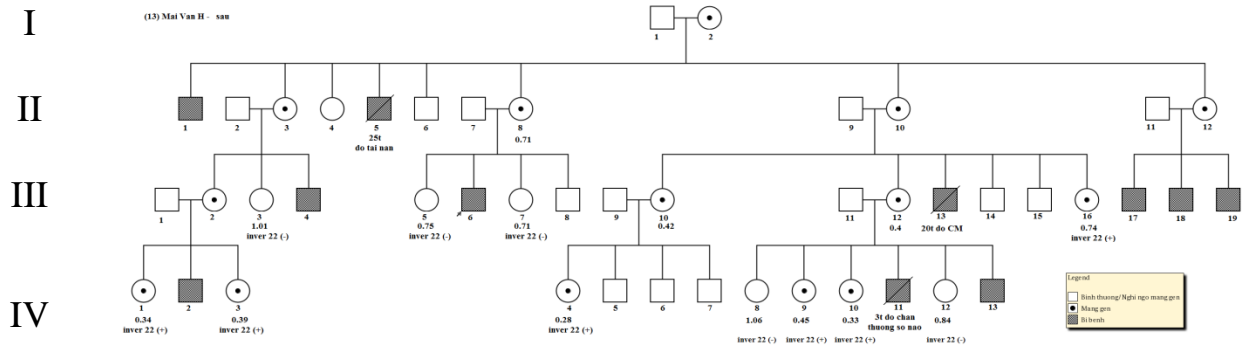
Đối tượng		n (n = 533)		%	
Mang gen	Bảng phân tích phả hệ	367	329	68,9	61,7
	Bảng phân tích gen trực tiếp		30		5,6
	Bảng phân tích gen gián tiếp		8		1,5
Không mang gen (xác định qua phân tích di truyền)		50		9,4	
Có khả năng mang gen		116		21,8	
<b>Tổng số</b>		<b>533</b>		<b>100</b>	

Nhận xét:

Đã phát hiện được tổng số 367 người mang gen trong đó phân tích phả hệ phát hiện được nhiều nhất là 329 người (61,7%), phân tích đột biến gen F8 phát hiện được 30 người (5,6%) và phân tích gián tiếp qua PCR-RFLP với BclI phát hiện được 8 người (1,5%). 50/533 (9,4%) là người không MG được xác định qua phân tích di truyền. 116/533 người (21,8%) có khả năng MG chưa xác định được chính xác tình trạng MG.



Sơ đồ 3.2 Phả hệ gia đình BN Mai Văn H. (số 13) trước phân tích di truyền



Sơ đồ 3.3 Phả hệ gia đình bệnh nhân Mai Văn H. (số 13) sau khi phân tích di truyền

**Nhận xét:**

- Bệnh nhân Mai Văn H. (số 13) mức độ nặng có đảo đoạn intron 22. Trong gia đình có 9 người chảy máu bất thường bao gồm: II:1, II:5, III:4, III:13, III:17, III:18, III:19, IV:11, IV:13 trong đó II:5, III:13, IV:11 đã chết do chảy máu. 6 thành viên còn sống được làm xét nghiệm, kết quả tất cả đều bị hemophilia A mức độ nặng.

- Các thành viên I:2, II:3, II:8, II:10, II:12, III:2, III:12 là người chắc chắn mang gen do thỏa mãn điều kiện có  $\geq 2$  con trai bị bệnh (I:2, II:12, III:12) và có 1 con bị hemophilia và có nhiều người nam khác trong gia đình bị bệnh (II:3, II:8, II:10, III:2).

- Các thành viên nữ II:4, III:3, III:5, III:7, III:10, III:16, IV:1, IV:3, IV:4, IV:8, IV:9, IV:10, IV:12 là người có khả năng mang gen hemophilia do trong gia đình có người nam giới bị bệnh đồng thời lại chưa có con bị hemophilia. Những người này được phân tích đảo đoạn intron 22, kết quả III:3, III:5, III:7, IV:8, IV:12 không mang gen; III:10, III:16, IV:1, IV:3, IV:4, IV:9, IV:10 mang gen.

**b. Phân tích yếu tố đông máu (tỉ số VIII/vWF:Ag)**

**• Xác định ngưỡng chẩn đoán:**

Trong số những người mang gen được phát hiện bằng phân tích phả hệ chọn ra 83 người thỏa mãn điều kiện giống như nhóm chứng (tuổi 14 - 50, không có thai và không uống thuốc tránh thai) để so sánh nồng độ yếu tố VIII, vWF:Ag và tỉ số VIII/vWF:Ag, kết quả được chỉ ra ở bảng 3.10.

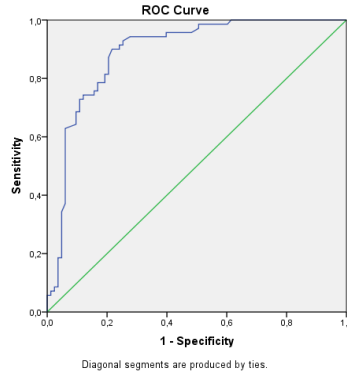
Bảng 3.10. So sánh nồng độ yếu tố đông máu giữa người bình thường và người mang gen bệnh

Đối tượng	Yếu tố VIII (%)		vWF:Ag (%)		Tỉ số VIII/vWF:Ag	
	X $\pm$ SD	Min - max	X $\pm$ SD	Min - max	X $\pm$ SD	Min- max
Bình thường (n = 70)	81,4 $\pm$ 27,9	42 - 191	85,4 $\pm$ 30,3	35 - 195	0,95 $\pm$ 0,21	0,52 - 1,54
Mang gen bệnh (n = 83)	49,9 $\pm$ 19,6	16 - 131	86,2 $\pm$ 23,5	39 - 193	0,59 $\pm$ 0,22	0,21 - 1,3
<b>p</b>	<b>&lt; 0,05</b>		<b>&gt; 0,05</b>		<b>&lt; 0,05</b>	

Nhận xét:

- Giữa nhóm người bình thường và nhóm người mang gen bệnh không có sự khác biệt về nồng độ yếu tố von Willebrand.
- Nhóm người mang gen bệnh có nồng độ yếu tố VIII và tỉ số VIII/vWF:Ag thấp hơn hẳn nhóm người bình thường với  $p < 0,05$ .

b. Áp dụng đặc điểm về tỉ số VIII/vWF:Ag để chẩn đoán người mang gen và chẩn đoán trước sinh



Biểu đồ 3.1. Biểu đồ đường cong ROC của tỉ số VIII/vWF:Ag

Nhận xét:

Phân tích biểu đồ đường cong ROC của tỉ số VIII/vWF:Ag cho thấy diện tích dưới đường cong ROC là 0,89 hoặc là 89% (với  $p < 0,01$ ); như vậy: tỉ số VIII/vWF:Ag cao hoặc thấp có khả năng xác định được tình trạng mang gen và tình trạng không mang gen.

Bảng 3.11. Kết quả tính độ nhạy và độ đặc hiệu của tỉ số VIII/vWF:Ag trong chẩn đoán người mang gen bệnh hemophilia A

Tọa độ của đường cong tỉ số VIII/vWF:Ag		
Ngưỡng kết luận	Độ nhạy	1 - độ đặc hiệu
...	...	...
,6526	,943	,312
,6603	,943	,313
,6659	,943	,330
,6741	,943	,289
,6891	,943	,277
,7034	,929	,253
,7080	,914	,253
,7098	,914	,241
,7112	,900	,241
,7124	,900	,229
<b>Ngưỡng → ,7136</b>	<b>,900</b>	<b>,217</b>
,7150	,871	,205
,7166	,857	,205
,7206	,843	,205
,7268	,829	,205
,7307	,814	,205
,7325	,814	,193
,7356	,800	,193
,7388	,786	,193
,7426	,786	,181
,7477	,786	,169
,7520	,771	,169
,7625	,757	,169
,7737	,757	,157
,7771	,743	,157
,7825	,743	,145
...	...	...



*Nhận xét:*

Căn cứ vào bảng phân tích trên chúng tôi chọn ngưỡng chẩn đoán cho tỉ số VIII/vWF:Ag là 0,7136 (làm tròn thành 0,71) tương đương với độ nhạy là 0,9 (90%) và độ đặc hiệu là  $1 - 0,217 = 0,783$  (78,3%) do ngưỡng này cho chỉ số J cao nhất là 0,683 [ $J = (\text{độ nhạy} + \text{độ đặc hiệu}) - 1$ ]. Áp dụng cho 159 người có khả năng mang gen có 72/159 (45%) có tỉ số VIII/vWF:Ag (gọi tắt là tỉ số) < 0,71. Những người này được xác định là mang gen hemophilia A.

*Bảng 3.12. So sánh kết quả chẩn đoán tình trạng mang gen bằng tỉ số VIII/vWF:Ag với kết quả phân tích di truyền gen F8*

Phương pháp chẩn đoán	Mang gen (n = 38)				Không mang gen (n = 50)			
	Tỉ số < 0,71		Tỉ số ≥ 0,71		Tỉ số < 0,71		Tỉ số ≥ 0,71	
	n	%	n	%	n	%	n	%
PCR - RFLP (n = 17)	6		2		0		9	
Phân tích đột biến gen (n = 71)	27		3		4		37	
<b>Tổng số (n = 88)</b>	<b>33</b>	<b>86,8</b>	<b>5</b>	<b>13,2</b>	<b>4</b>	<b>8,0</b>	<b>46</b>	<b>92,0</b>

*Nhận xét:*

33/38 (86,8%) người mang gen có tỉ số < 0,71; 4/50 (8%) người không mang gen có 4 người có tỉ số < 0,71. Như vậy, so với phân tích di truyền thì tỉ số VIII/vWF:Ag đã phát hiện được đúng 86,8% người mang gen và chẩn đoán nhầm mang gen cho 8% trường hợp không mang gen.

### **3.3. Đặc điểm của bệnh nhân và người mang gen mới được chẩn đoán**

#### **3.3.1. Đặc điểm của bệnh nhân mới**

Tất cả bệnh nhân mới được chẩn đoán đều là nam giới.

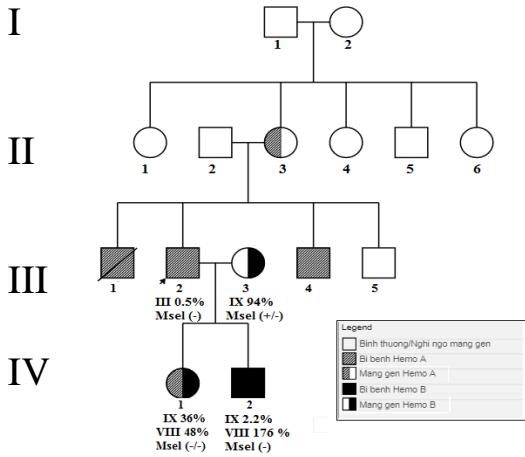
##### **3.3.1.1. Về thể bệnh**

*Bảng 3.13. Phân loại bệnh nhân mới theo thể bệnh*

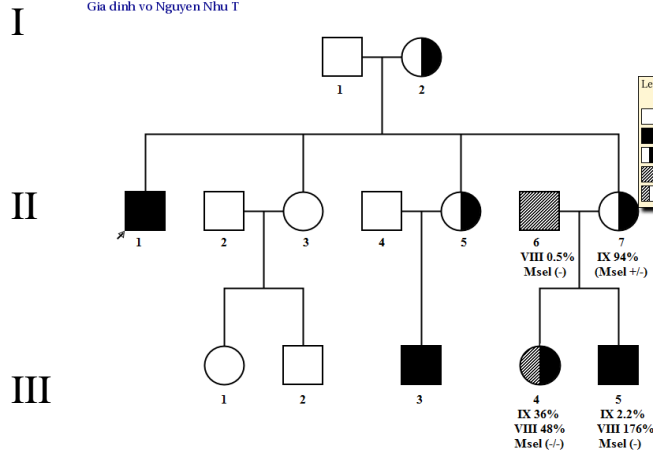
	Số lượng	Tỉ lệ %
<b>Hemophilia A</b>	144	97,9
<b>Hemophilia A kết hợp thiếu yếu tố VII bẩm sinh</b>	1	0,7
<b>Hemophilia B</b>	1	0,7
<b>Thiếu yếu tố VII bẩm sinh đơn thuần</b>	1	0,7
<b>Tổng số</b>	<b>147</b>	<b>100</b>

*Nhận xét:*

- Hầu hết bệnh nhân mới là hemophilia A. Có 1 bệnh nhân bị hemophilia A kết hợp với thiếu tố VII bẩm sinh và 1 bệnh nhân thiếu yếu tố VII bẩm sinh đơn thuần là hai anh em ruột. Có 1 bệnh nhân mới bị hemophilia B. Đây là con của 1 người bố bị hemophilia A và 1 người mẹ mang gen hemophilia B, thuộc gia đình số 77. Phả hệ của gia đình này được mô tả trong sơ đồ 3.4 và sơ đồ 3.5.



Sơ đồ 3.4. Phả hệ gia đình bệnh nhân Nguyễn Như T. (số 77)

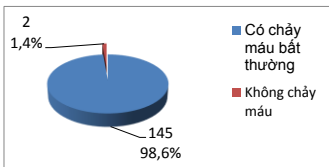


Sơ đồ 3.5. Phả hệ gia đình vợ bệnh nhân Nguyễn Như T. (số 77)

Nhận xét:

- IV:1 có bố bị hemophilia A nên là người chắc chắn mang gen hemophilia A.
- Mẹ của IV:1 (là III:3 trong sơ đồ 3.4 và II:7 trong sơ đồ 3.5) vừa có anh trai bị hemophilia B vừa có con trai bị hemophilia B vì vậy là người chắc chắn mang gen hemophilia B.
- IV:1 có mẹ là người mang gen hemophilia B nên IV:1 có khả năng mang gen hemophilia B.
- Như vậy IV:1 là người mang gen hemophilia A và có khả năng mang gen hemophilia B.

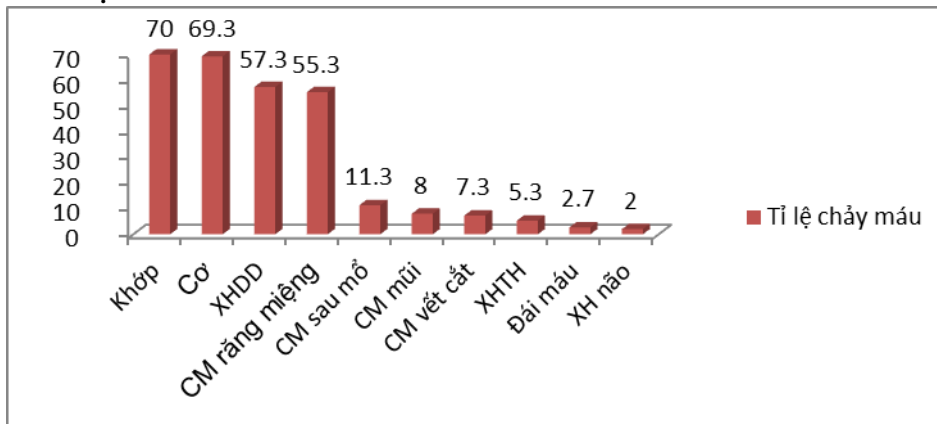
3.3.1.2. Đặc điểm của bệnh nhân mới về biểu hiện chảy máu và xét nghiệm đông máu



Nhận xét:

Hầu hết bệnh nhân mới đều có biểu hiện chảy máu bất thường. Chỉ có 2 bệnh nhân mức độ nhẹ chiếm 1,4% chưa phát hiện chảy máu bất thường.

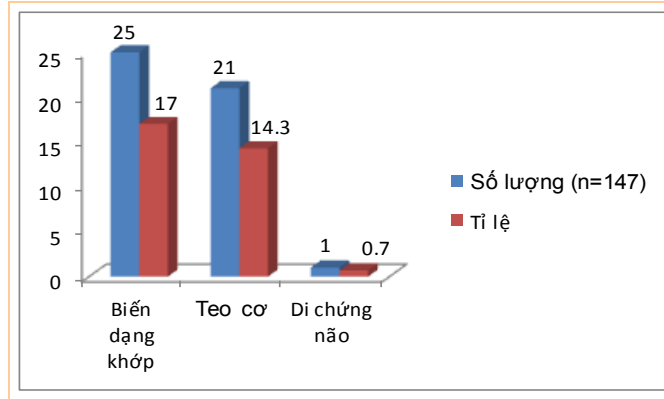
Biểu đồ 3.2. Tỷ lệ chảy máu bất thường của bệnh nhân mới



Biểu đồ 3.3. Triệu chứng chảy máu của các bệnh nhân mới

*Nhận xét:*

- Chảy máu khớp, chảy máu cơ, xuất huyết dưới da, chảy máu răng miệng là các triệu chứng hay gặp nhất, lần lượt là 70%, 69,3%, 57,3% và 55,3%.
- Chảy máu kéo dài sau mổ, chảy máu mũi, chảy máu vết cắt chiếm tỉ lệ thấp hơn, lần lượt là 11,3%; 8%; 7,3%.
- Xuất huyết tiêu hóa, đái máu, xuất huyết não chiếm tỉ lệ thấp.



*Biểu đồ 3.4. Biểu chứng do chảy máu ở các bệnh nhân mới*

*Nhận xét:*

Có 27/147 (18,4%) có biến chứng do chảy máu trong đó có 25 người (17%) có biến dạng khớp, 21 người (14,3%) có teo cơ và 1 người (0,7%) bị di chứng do xuất huyết não.

*Bảng 3.14. Đặc điểm xét nghiệm đông cầm máu của bệnh nhân được chẩn đoán mới*

Chỉ số	n	X ± SD	Min - max
rAPTT	147	3,4 ± 1,5	1,1 - > 5
PT (%)	141	104,3 ± 19,6	52 - 191
rTT	141	1,0 ± 0,1	0,9 - 1,3
Fibrinogen (g/l)	141	3,4 ± 0,9	2,2 - 6,3
Số lượng tiểu cầu (x10 <sup>9</sup> /l)	147	285,5 ± 88,2	150 - 571
Yếu tố VIII (%)	147	6,3 ± 17,1/trung vị 0,9	0,1 - 176
Yếu tố IX (%)	1	2,2	
Yếu tố VII (%)	4	51,5 ± 27,44	28 - 80
Kháng đông nội sinh	146	Âm tính	

*Nhận xét:*

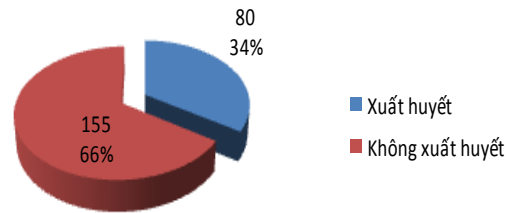
- rAPTT trung bình là 3,4 ± 1,5, trong đó tất cả các bệnh nhân hemophilia đều có APTT kéo dài. Chỉ duy nhất 1 bệnh nhân thiếu yếu tố VII thuộc gia đình số 44 có APTT bình thường.
- Tất cả các bệnh nhân hemophilia có kháng đông nội sinh âm tính và TT trong giới hạn bình thường. Không có bệnh nhân nào có giảm fibrinogen và số lượng tiểu cầu.
- Giá trị trung bình của PT% là 99,0 ± 27,1. Có 2 bệnh nhân (1,4%) có PT giảm nhẹ là 52% và 58%.
- Nồng độ yếu tố VIII trung vị là 0,9% trong đó có 2 trường hợp bình thường là của bệnh nhân thiếu yếu tố VII bẩm sinh (92%) và bệnh nhân hemophilia B (176%).
- Bệnh nhân hemophilia B duy nhất có yếu tố IX giảm là 2,2%.

### 3.3.2. Đặc điểm của người mang gen bệnh

#### 3.3.2.1. Về thể bệnh

Tất cả 329 người mang gen đều mang gen hemophilia A. Tuy nhiên, gia đình số 77 có bố bị hemophilia A mức độ nặng lấy mẹ mang gen hemophilia B, con gái của họ vì vậy vừa mang gen hemophilia A vừa có khả năng mang gen hemophilia B. Phân tích PCR-RFLP với *MseI* cho kết quả con gái mang gen hemophilia B (bố *MseI* (-), mẹ *MseI* (+/-), con trai bị bệnh *MseI* (-), con gái *MseI* (-/-)). Như vậy người con gái vừa mang gen hemophilia A, vừa mang gen hemophilia B.

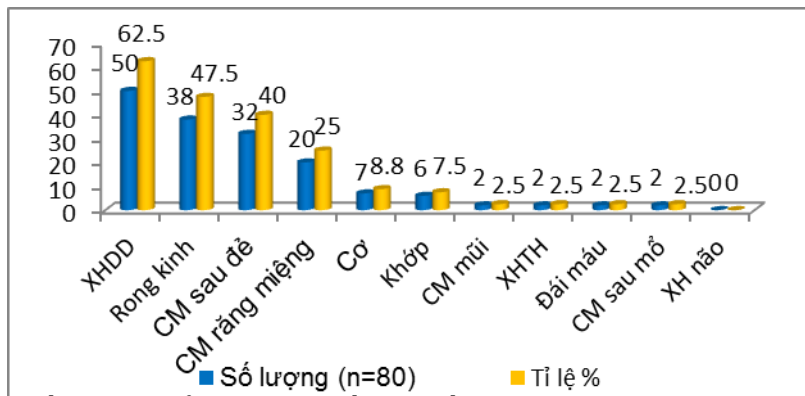
#### 3.3.2.2. Đặc điểm xuất huyết



Biểu đồ 3.5. Tỷ lệ xuất huyết của người mang gen

Nhận xét:

235/329 người mang gen trả lời bộ câu hỏi, trong đó có 80 người có biểu hiện xuất huyết chiếm tỷ lệ 34%.



Biểu đồ 3.6. Biểu hiện xuất huyết của người mang gen bệnh

Nhận xét:

Xuất huyết dưới da, rong kinh, chảy máu sau đẻ, chảy máu răng miệng hay gặp nhất với tỷ lệ lần lượt là 62,5; 47,5; 40 và 25%. Chảy máu khớp và cơ ít gặp hơn với tỷ lệ lần lượt là 7,5% và 8,8%. Có 2 trường hợp bị chảy máu sau mổ trong đó 1 trường hợp phải điều trị bằng bổ sung yếu tố VIII.

#### 3.3.2.3. Đặc điểm xét nghiệm đông máu

##### a. *APTT* và kháng đông nội sinh

Bảng 3.15. Đặc điểm kết quả xét nghiệm *APTT* và kháng đông nội sinh ở người mang gen

rAPTT		n		%		Kháng đông nội sinh
Kéo dài (r > 1,25)	> 1,25 đến ≤ 1,5	35	40	23,4	26,7	
	> 1,5 đến ≤ 2,0	5		3,3		
	> 2,0	0		0		
Bình thường (0,8 đến ≤ 1,25)		110		73,3		
Tổng		150		100		

*Nhận xét:*

150 người chắc chắn mang gen được làm xét nghiệm APTT và định lượng yếu tố VIII. 40/150 (26,7%) người có APTT kéo dài trong đó đa số là kéo dài ở mức độ nhẹ. Tất cả những người có APTT kéo dài đều không có kháng đông lưu hành đường nội sinh.

*Bảng 3.16. Đặc điểm nồng độ yếu tố VIII ở nhóm người mang gen*

Nồng độ yếu tố VIII (%)		n	%	
<b>X ± SD</b>	52,6 ± 20,6	<b>&lt; 40</b>	40	26,7
		<b>≥ 40 đến ≤ 60</b>	65	43,3
<b>Min - max</b>	10 - 131	<b>&gt; 60</b>	45	30
		<b>Tổng số</b>	<b>150</b>	<b>100</b>

*Nhận xét:*

Nồng độ yếu tố VIII trung bình ở người mang gen là 52,6 ± 20,6%, ở giới hạn thấp của bình thường, dao động từ 10 - 131%. Có 40 người (26,7%) có nồng độ yếu tố VIII < 40%. Những người này được coi là bệnh nhân hemophilia A mức độ nhẹ.

*Bảng 3.17. So sánh nồng độ yếu tố VIII giữa những người mang gen hemophilia mức độ khác nhau*

		Nồng độ yếu tố VIII trung bình (%)		Oneway Anova test, F= 2.47, p = 0,088
<b>Mức độ nặng</b> (n = 94)	<b>X ± SD</b>	53,5 ± 19,3		
	<b>Min - max</b>	17 - 120		
<b>Mức độ trung bình</b> (n = 11)	<b>X ± SD</b>	60,7 ± 22,2		
	<b>Min - max</b>	25 - 91		
<b>Mức độ nhẹ</b> (n = 45)	<b>X ± SD</b>	47,3 ± 22,1		
	<b>Min - max</b>	10 - 131		
<b>Chung</b> (n = 150)	<b>X ± SD</b>	52,2 ± 20,6		
	<b>Min - max</b>	10 - 131		

*Nhận xét:*

Giữa những người mang gen mức độ khác nhau không có sự khác biệt về nồng độ yếu tố VIII, với p > 0,05.

*Bảng 3.18. Liên quan giữa nồng độ yếu tố VIII và tình trạng xuất huyết*

Triệu chứng		Có xuất huyết (n = 73)		Không xuất huyết (n = 77)		p
		n	Tỉ lệ	n	Tỉ lệ	
<b>Nồng độ yếu tố VIII</b>	<b>&lt; 40% (n = 40)<sub>(1)</sub></b>	34	85%	6	15%	p <sub>1,2</sub> < 0,01 p <sub>2,3</sub> < 0,01 p <sub>1,3</sub> < 0,01 p <sub>1,4</sub> < 0,01 OR <sub>1,4</sub> = 10,3 OR <sub>1,2</sub> = 5,1 OR <sub>2,3</sub> = 8,7
	<b>≥ 40%<sub>(4)</sub> (n = 110)</b>	34	52,3%	31	47,7%	
	<b>40% - 60% (n = 65)<sub>(2)</sub></b>					
	<b>&gt; 60% (n = 45)<sub>(3)</sub></b>	5	11,1%	40	88,9%	

*Nhận xét:*

Trong 3 mức nồng độ yếu tố VIII < 40%, 40 - 60% và > 60% thì người mang gen có nồng độ yếu tố VIII càng thấp có tỉ lệ xuất huyết càng cao. Nguy cơ xuất huyết ở người có yếu tố VIII < 40% cao hơn người có yếu tố VIII ≥ 40% là

10,3 lần và cao hơn nhóm có nồng độ từ 40 - 60% là 5,1 lần. Nguy cơ xuất huyết ở người có nồng độ yếu tố VIII từ 40 - 60% cao hơn ở người có nồng độ yếu tố VIII > 60% là 8,7 lần.

## **Chương 4: BÀN LUẬN**

### **4.1. Đặc điểm của bệnh nhân gốc**

#### **4.1.1. Về tiền sử gia đình và mức độ bệnh**

Tỉ lệ có tiền sử gia đình và tỉ lệ mức độ nặng của bệnh nhân trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn so với tác giả khác. Lí do là bởi các bệnh nhân và thân nhân trong những gia đình này quan tâm và lo lắng hơn đến tình trạng bị bệnh và mang gen bệnh của các thành viên trong gia đình do đó dễ chấp nhận tham gia nghiên cứu hơn so với những gia đình chỉ có một bệnh nhân duy nhất và gia đình mức độ trung bình và nhẹ.

#### **4.1.2. Về đặc điểm tổn thương di truyền**

Tỉ lệ bệnh nhân có đảo đoạn intron 1 và intron 22 tương đương với nghiên cứu của các tác giả khác. Có 8/9 người tìm được đột biến gen *F8* bằng phương pháp giải trình tự. Các kết quả này sẽ được sử dụng để xác định tình trạng mang gen cho các thành viên nữ trong gia đình.

### **4.2. Về việc phát hiện bệnh nhân mới và người mang gen dựa vào phân tích phả hệ**

Từ 100 bệnh nhân hemophilia A đã được chẩn đoán đã xây dựng được 100 phả hệ trong đó phần lớn (58%) có thể khai thác được thông tin trong vòng 4 thế hệ. Kết quả này tương đương với tác giả Monica Singh và H. Kaur (2001). Việc có được thông tin để lập phả hệ phụ thuộc rất lớn vào người cung cấp và đòi hỏi sự kiên nhẫn của người khai thác.

#### **4.2.1. Phát hiện bệnh nhân mới:**

Từ 1177 nam có quan hệ huyết thống, qua phân tích phả hệ và cơ chế di truyền xác định được 869 nam giới có khả năng mắc bệnh. Sử dụng bảng hỏi đã khu trú được 347 người nghi ngờ bị bệnh trong đó có 241 người còn sống và 76 người đã tử vong. Làm xét nghiệm cho 199 người nghi ngờ bị bệnh còn sống đã xác định được 147 bệnh nhân mới chiếm tỉ lệ 73,9% người được xét nghiệm và 16,9% nam giới có khả năng mắc bệnh. Bảng 3.5 cho thấy bảng hỏi rất có giá trị trong việc xác định người nghi ngờ bị bệnh, đặc biệt là thành viên trong gia đình mức độ trung bình và nặng, giúp khu trú đối tượng cần làm xét nghiệm. Bên cạnh đó, cần làm xét nghiệm cho những người có khả năng mắc bệnh thuộc gia đình bệnh nhân mức độ nhẹ mà không có triệu chứng chảy máu bất thường để tránh bỏ sót.

Hemophilia là bệnh lí di truyền hiếm gặp (25 - 60 người/1 triệu dân tại Việt Nam), tỉ lệ lại không khác nhau giữa các vùng địa lí và chủng tộc người nên nếu tiến hành tìm kiếm theo phương pháp dịch tễ thông thường thì cần phải sàng lọc ít nhất 2,45 triệu người mới có thể phát hiện được số bệnh nhân hemophilia mới tương đương. Một số nghiên cứu đã tiến hành tìm kiếm theo phương pháp dịch tễ đã phát hiện rất ít, thậm chí không phát hiện được bệnh nhân nào dù đã triển khai trên quần thể lớn. Rõ ràng, với mục đích phát hiện bệnh nhân mới thì việc dựa theo cơ chế di truyền, phân tích phả hệ của bệnh nhân hemophilia phát

hiện bệnh nhân mới có hiệu quả cao cũng như tiết kiệm được nhân lực và chi phí hơn rất nhiều. Tuy nhiên, đối với những gia đình hemophilia đơn phát thì cần quan tâm và theo dõi những đối tượng có khả năng mắc bệnh cùng thế hệ hoặc sau thế hệ với bệnh nhân.

#### **4.2.2. Phát hiện người mang gen bệnh**

##### **4.2.2.1. Phát hiện người mang gen bệnh dựa vào phân tích phả hệ**

Trong số 1129 thành viên nữ có liên quan chúng tôi có được thông tin của 533 người (47%). Để có được thông tin cần thiết thì việc tìm được người trong gia đình có thể liên hệ, kết nối là khâu hết sức quan trọng.

Từ 533 người nữ có thông tin xác định được 329 người chiếm tỉ lệ 61,7% chắc chắn mang gen (CCMG) và 204 người chiếm tỉ lệ 38,3% có khả năng mang gen (CKNMG). Người CCMG hay gặp nhất là người có một con trai và một thành viên khác trong gia đình bị hemophilia (47,4%), tiếp đến là những người có bố bị hemophilia (34,3%), tỉ lệ người có từ hai con trở lên bị bệnh là 14,9%, chỉ có 3,3% người thỏa mãn điều kiện có một con bị bệnh và có ít nhất một người trong gia đình được chẩn đoán mang gen (MG). M. Singh (2002) khi nghiên cứu trên 37 phả hệ của bệnh nhân hemophilia có tiền sử gia đình đã xác định được có 130/425 (30,58%) người CCMG. Tỉ lệ này trong nghiên cứu của Carold Kasper (Mỹ) là 56,14% và của Bùi Thị Thu Hương (2014) là 26%. So với các tác giả trên thì tỉ lệ người CCMG được xác định trong nghiên cứu của chúng tôi là cao hơn.

Trung bình mỗi phả hệ phát hiện được 3,3 người CCMG, trong đó, gia đình bệnh nhân mức độ nặng phát hiện được ít hơn gia đình bệnh nhân mức độ trung bình và nhẹ, lí do bởi ở những gia đình này có nhiều người chết vì chảy máu kéo dài, chất lượng sống của người bệnh và thân nhân thấp nên ảnh hưởng đến việc quyết định sinh đẻ của các thành viên khác.

##### **4.2.2.2. Phối hợp các phương pháp phát hiện người mang gen ở người có khả năng mang gen**

###### **a. Phân tích di truyền**

Phân tích phả hệ là biện pháp rất hiệu quả để xác định tình trạng CCMG và CKNMG cho những phụ nữ có quan hệ huyết thống với bệnh nhân hemophilia. Đối với người CKNMG, bằng phân tích di truyền có thể chẩn đoán được chính xác tình trạng có MG hay không MG bệnh, là cơ sở để tư vấn di truyền và chẩn đoán trước sinh. Bảng 3.8 và 3.9 cho thấy khi phối hợp phân tích phả hệ và phân tích di truyền đã phát hiện thêm 38 người, nâng tổng số người MG được chẩn đoán lên 367 người. Tuy nhiên, để áp dụng được phân tích di truyền cần có máy móc, trang thiết bị hiện đại cũng như nhân lực để làm xét nghiệm do vậy chi phí cũng cao hơn, thời gian tiến hành cũng lâu hơn, bên cạnh đó nếu sử dụng phân tích gián tiếp thì cũng phải thỏa mãn một số điều kiện như tỉ lệ có thông tin của marker đa hình, sự hợp tác của các thành viên trong gia đình trong việc cung cấp mẫu máu. Chính vì vậy rất cần phối hợp các phương pháp để có thể phát hiện tối đa người MG.

###### **b. Phân tích tỉ số VIII/vWF:Ag**

Bảng 3.10 và biểu đồ 3.1 cho thấy tỉ số VIII/vWF:Ag ở người MG thấp

hơn người phụ nữ bình thường và có thể sử dụng để phân tích tình trạng MG hemophilia A.

Với ngưỡng 0,71 tương ứng với độ nhạy là 90% và độ đặc hiệu là 78,3%, áp dụng cho 159 người CKNMG xác định được 72 người (45%) có tỉ số VIII/vWF:Ag < 0,71, những người này được xác định là MG hemophilia A. Sử dụng kết quả chẩn đoán tình trạng MG bằng phân tích di truyền như một tiêu chuẩn vàng cho 88 người thỏa mãn điều kiện, kết quả cho thấy tỉ số VIII/vWF:Ag xác định đúng cho 86,84% trường hợp và xác định nhầm 4 trường hợp chiếm tỉ lệ 8%. Kết quả này tương đương với nghiên cứu của Shetty (Ấn Độ - 0,7)(1999), J. Padre (Philippin - 0,6)(2004), Veerle Labarque (Canada - 0,8)(2016), T Ruchutrakool (Thái Lan - 0,82)(2006).

Như vậy, với sự phát triển của khoa học công nghệ có nhiều phương pháp chẩn đoán người mang gen hemophilia. Mỗi phương pháp đều có ưu điểm và nhược điểm riêng, vì vậy, phối hợp các phương pháp là một việc vô cùng quan trọng giúp tăng tỉ lệ chẩn đoán tình trạng MG hemophilia, đặc biệt trong điều kiện kinh tế còn eo hẹp như ở nước ta hiện nay. Dù chẩn đoán bằng bất cứ phương pháp nào thì bước đầu tiên cũng phải phân tích phả hệ để xác định đối tượng, sau đó tùy thuộc vào từng bệnh nhân gốc cũng như điều kiện, trang thiết bị của từng cơ sở mà lựa chọn phương pháp chẩn đoán phù hợp.

### **4.3. Đặc điểm của bệnh nhân và người mang gen mới được chẩn đoán**

#### **4.3.1. Đặc điểm của bệnh nhân mới**

##### *4.3.1.1. Về thể bệnh*

Hầu hết bệnh nhân mới là hemophilia A, tuy nhiên có 1 trường hợp hemophilia A kết hợp thiếu yếu tố VII bẩm sinh, 1 trường hợp thiếu yếu tố VII bẩm sinh và 1 trường hợp hemophilia B. Hai anh em bị hemophilia A kết hợp thiếu yếu tố VII bẩm sinh và thiếu yếu tố VII bẩm sinh là con của mẹ MG hemophilia A kết hợp mang gen thiếu yếu tố VII với bố MG thiếu yếu tố VII. Đây là trường hợp rất hiếm gặp, cần được tư vấn, quản lý và điều trị phù hợp. Trường hợp hemophilia B là con của bố bị hemophilia A (thuộc gia đình số 77) và mẹ MG hemophilia B.

##### *4.3.1.2. Biểu hiện chảy máu và biến chứng do chảy máu ở các bệnh nhân mới được chẩn đoán*

Hầu hết bệnh nhân mới đều có biểu hiện chảy máu bất thường trong đó các vị trí hay gặp là khớp, cơ, xuất huyết dưới da và chảy máu răng miệng. Chỉ có hai người thuộc mức độ nhẹ chiếm tỉ lệ 1,4% chưa phát hiện bất thường chảy máu, có thể do họ chưa phải trải qua chấn thương, va chạm và phẫu thuật nên triệu chứng chảy máu bất thường chưa bộc lộ.

Khớp và cơ là những vị trí chảy máu hay gặp nhất, giống như trong nghiên cứu của các tác giả Vũ Thị Minh Châu (2001), Nguyễn Anh Trí (2005), Marilyn Manco – Jhonson (2016). Tỉ lệ xuất huyết dưới da và chảy máu răng miệng được ghi nhận khá cao, ở 57,3% và 55,3% các trường hợp, khác với tỉ lệ chảy máu trong nghiên cứu của Vũ Thị Minh Châu và Nguyễn Anh Trí trên các bệnh nhân tại bệnh viện. Lí do là bởi khác nhau về cách ghi nhận dấu hiệu chảy máu. Đối với các bệnh nhân tại bệnh viện thì các biểu hiện chảy máu là lí do để



bệnh nhân đi khám và điều trị; còn trong nghiên cứu của chúng tôi thì là các vị trí mà bệnh nhân đã từng bị chảy máu. Chảy máu não và xuất huyết tiêu hóa trong nghiên cứu này chiếm tỉ lệ thấp, có thể do đây là những vị trí chảy máu nguy hiểm, người bệnh thường khó qua khỏi nếu không được điều trị.

Teo cơ, cứng khớp, hạn chế vận động cơ khớp là hậu quả của việc chảy máu lặp lại trong cơ, khớp mà không được điều trị đầy đủ. Có tới 25% bệnh nhân mới được chẩn đoán bị cứng khớp và 21% bệnh nhân bị teo cơ, gặp ở các trường hợp mức độ nặng. So với tỉ lệ biến chứng cơ khớp của các bệnh nhân đang điều trị tại bệnh viện thì tỉ lệ này thấp hơn: 60,5% theo tác giả Vũ Thị Minh Châu (2001), 58,97% theo Trần Thị Phương Túy (2009) và 61-71% Soon Ki Kim 2016 (Hàn Quốc), lí do bởi tỉ lệ bệnh nhân mức độ nặng của chúng tôi thấp hơn so với tỉ lệ bệnh nhân mức độ nặng trong các nghiên cứu khác.

#### 4.3.1.6. Đặc điểm xét nghiệm của bệnh nhân mới

Do yếu tố VIII/IX tham gia con đường đông máu nội sinh vì vậy ở bệnh nhân hemophilia, trong số các xét nghiệm sàng lọc đông máu gồm PT, APTT, TT, fibrinogen, số lượng tiểu cầu thông thường chỉ có APTT kéo dài, còn các chỉ số khác trong giới hạn bình thường. Các bệnh nhân hemophilia mới được chẩn đoán đều có đặc điểm tương tự. Chỉ có hai bệnh nhân thiếu yếu tố VII bẩm sinh và hemophilia A kết hợp thiếu yếu tố VII có PT kéo dài. Tất cả các bệnh nhân đều không có kháng đông nội sinh, điều này hợp lí vì rất ít bệnh nhân phải điều trị bằng chế phẩm máu. Yếu tố VIII/IX <40% là tiêu chuẩn vàng chẩn đoán hemophilia. Tất cả bệnh nhân hemophilia A đều có yếu tố VIII thấp với trung vị là 0,9%. Nồng độ yếu tố VIII giữa các thành viên bị bệnh trong một gia đình là tương đương, tuy nhiên có xu hướng tăng hơn ở người cao tuổi trong các gia đình bệnh nhân mức độ trung bình và nhẹ và biểu hiện chảy máu ở các thành viên trong một gia đình không hoàn toàn giống nhau. Điều này được lí giải bởi nồng độ yếu tố VIII/IX ngoài việc sản xuất do gen quy định thì còn bị ảnh hưởng bởi một số yếu tố khác như tuổi tác, hoạt động thể lực, nhóm máu, stress...

#### 4.3.2. Đặc điểm của người mang gen bệnh

##### 4.3.2.1. Về thể bệnh

Mặc dù các bệnh nhân gốc đều là hemophilia A, tuy nhiên chúng tôi đã phát hiện một phụ nữ vừa MG hemophilia A, vừa MG hemophilia B là con của một người bố bị hemophilia A mức độ nặng và mẹ MG hemophilia B. Đây là trường hợp mang gen dị hợp tử kép cả hemophilia A và hemophilia B đầu tiên được mô tả tại Việt Nam, rất hiếm gặp, trên thế giới mới có 3 trường hợp được mô tả. Người MG này rất cần được quản lí và tư vấn, đặc biệt là tư vấn di truyền.

##### 4.3.2.3. Về đặc điểm xuất huyết

Có 80/235 (34%) người MG có chảy máu bất thường với biểu hiện đa dạng, trong đó 4 loại chảy máu hay gặp nhất là xuất huyết dưới da, rong kinh, chảy máu sau đẻ và chảy máu răng miệng. Kết quả này cũng tương đồng với kết quả nghiên cứu của các tác giả khác như Paroskie (2014), Eveline P. Mauser-Bunschoten (2008) và Miesbach (2011).

So với bệnh nhân nam giới, người mang gen hemophilia A trong nghiên

cứu này ít bị chảy máu khớp, cơ hơn (7,5% và 8,8%). Có 2 trường hợp chảy máu sau mổ trong đó có 1 người bị chảy máu sau mổ cắt polyp trực tràng phải điều trị bằng bổ sung yếu tố đông máu. Paroskie năm 2015 ghi nhận có < 10% những người MG phải điều trị bằng yếu tố cô đặc để cầm chảy máu.

#### 4.3.2.4. Về đặc điểm xét nghiệm

##### a. APTT và kháng đông nội sinh

Bảng 3.15 cho thấy có đến 40 người MG chiếm tỉ lệ 26,7% có APTT kéo dài trong đó đa số là kéo dài ở mức độ nhẹ ( $1,25 < rAPTT < 1,5$ ). Tất cả trong số họ đều không có kháng đông nội sinh, và nguyên nhân chính làm APTT kéo dài ở đây là do giảm yếu tố VIII. Kết quả này cũng tương đương với nghiên cứu của Paroskie năm 2015.

##### b. Nồng độ yếu tố VIII

Nồng độ yếu tố VIII ở người MG hemophilia A là  $52,6 \pm 20,6\%$ , ở giới hạn thấp của bình thường, tương tự với nghiên cứu của các tác giả Iris Plug, Paroskie, Ay C.

Bảng 3.16 cho thấy có tới 40/150 người (26,7%) có nồng độ yếu tố VIII < 40%. Những người này được coi như bệnh nhân hemophilia A mức độ nhẹ và cần được quản lý, tư vấn chặt chẽ. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Iris Plug (62/225 người tương đương 27,6%)(2006) nhưng cao hơn của Paroskie (1/34 người tương đương 2,9%)(2014).

Bảng 3.17 cho thấy không có sự khác nhau về yếu tố VIII giữa những người MG mức độ nặng nhẹ khác nhau. Kết quả này tương đương với kết quả của tác giả Iris Plug (2006) và Miesbach (2011) nhưng khác biệt so với E. Funding và cộng sự (2015).

##### c. Mối liên quan giữa tình trạng xuất huyết và xét nghiệm đông máu

Bảng 3.18 cho thấy trong 3 mức độ yếu tố VIII < 40%, 40 – 60% và > 60% thì người MG có nồng độ yếu tố VIII càng thấp có tỉ lệ và nguy cơ xuất huyết càng cao. Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của nhiều tác giả khác trên thế giới như Iris Plug (2006), Paroskie (2014). Tác giả Iris Plug cũng nhận người có yếu tố VIII  $\leq 40\%$  mất máu qua kinh nguyệt nhiều hơn và có nhu cầu bổ sung sắt cao hơn 80% so với người có nồng độ VIII > 60%, bên cạnh đó nguy cơ chảy máu sau mổ ở những người này cao gấp 3 lần so với người có nồng độ > 40%. Chính vì vậy, người MG rất cần được quan tâm chẩn đoán, quản lý, tư vấn và phối hợp điều trị, tránh những biến chứng đáng tiếc do chảy máu gây nên.

## KẾT LUẬN

Qua phân tích phả hệ của 100 bệnh nhân hemophilia A bao gồm 869 người nam và 533 người nữ chúng tôi xin đưa ra một số kết luận sau:

### 1. Phát hiện bệnh nhân và người mang gen hemophilia

Phân tích phả hệ là phương pháp hiệu quả trong phát hiện bệnh nhân mới và người mang gen trong gia đình bệnh nhân hemophilia.

#### 1.2. Phát hiện bệnh nhân mới

Phân tích phả hệ giúp phát hiện được 147 bệnh nhân hemophilia là nam

giới, chiếm tỉ lệ 16,9%. Kết quả hồi cứu cũng cho thấy có 76 người đã tử vong nghi ngờ bị hemophilia.

### **1.3. Phát hiện người mang gen**

- Qua phân tích 533 người phụ nữ có liên quan đến hemophilia phát hiện được 367 người mang gen chiếm tỉ lệ 68,9% trong đó:

+ Phân tích phả hệ giúp phát hiện 329 người mang gen chiếm tỉ lệ 61,7%.

+ Phân tích đột biến gen yếu tố VIII phát hiện thêm 30 người mang gen chiếm tỉ lệ 5,6%.

+ Phân tích PCR-RFLP với *BclI* phát hiện thêm 8 người mang gen chiếm tỉ lệ 1,5%.

- Tỉ số VIII/vWF:Ag < 0,71 có giá trị trong chẩn đoán tình trạng mang gen hemophilia A với độ nhạy là 90% và độ đặc hiệu là 78,3%.

- Phối hợp các phương pháp giúp nâng cao hiệu quả chẩn đoán người mang gen.

## **2. Đặc điểm xuất huyết và xét nghiệm đông máu của bệnh nhân và người mang gen mới được chẩn đoán**

### **2.1. Đặc điểm của bệnh nhân mới**

- Đa số (97,9%) bệnh nhân là hemophilia A; có 1 trường hợp hemophilia A kết hợp thiếu yếu tố VII bẩm sinh; 1 trường hợp thiếu yếu tố VII bẩm sinh đơn thuần và 1 trường hợp hemophilia B. Trên 50% bệnh nhân mới thuộc mức độ nặng.

- Hầu hết (98,6%) bệnh nhân có biểu hiện chảy máu lâu cầm. Các vị trí chảy máu hay gặp nhất là khớp, cơ, xuất huyết dưới da và chảy máu răng miệng với tỉ lệ lần lượt là 70%, 69,3%, 57,3% và 55,3%.

### **2.2. Đặc điểm của người mang gen bệnh**

- Hầu hết (99,7%) là người mang gen hemophilia A, có 1 người vừa mang gen hemophilia A vừa mang gen hemophilia B.

- Tỉ lệ xuất huyết của người mang gen là 34%. Loại xuất huyết hay gặp nhất là xuất huyết dưới da, rong kinh, chảy máu sau đẻ và chảy máu răng miệng.

- Nồng độ yếu tố VIII của người mang gen thấp hơn phụ nữ bình thường ( $p < 0,05$ ). Nồng độ yếu tố VIII càng thấp nguy cơ xuất huyết càng cao. Giữa những người mang gen hemophilia mức độ khác nhau không có sự khác nhau về nồng độ yếu tố VIII.

- Có 40 người chiếm tỉ lệ 26,7% có nồng độ yếu tố VIII < 40% được xem là bệnh nhân hemophilia A mức độ nhẹ.

## **KIẾN NGHỊ**

1. Nên áp dụng phương pháp phát hiện bệnh nhân và người mang gen hemophilia bằng phân tích phả hệ bệnh nhân đã được chẩn đoán trên phạm vi toàn quốc bởi tính hiệu quả, khả năng áp dụng rộng rãi của phương pháp.

2. Cần đẩy mạnh công tác tuyên truyền và giáo dục bệnh nhân và người nhà để họ phối hợp với cán bộ y tế trong việc chẩn đoán, điều trị bệnh cũng như kiểm soát việc phát tán nguồn gen bệnh, góp phần cải tạo giống nòi.

3. Cần định lượng yếu tố VIII cho tất cả những người mang gen và có khả năng mang gen. Đối với những người có nồng độ yếu tố VIII < 40% cần quản lí như bệnh nhân hemophilia A mức độ nhẹ.

# DANH MỤC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN ĐÃ ĐƯỢC CÔNG BỐ

## I. ĐĂNG TRÊN TẠP CHÍ TRONG NƯỚC

1. Nguyễn Anh Trí, **Nguyễn Thị Mai**, Nguyễn Thị Nữ, Ngô Huy Minh, Lưu Thị Hà (2012). Nghiên cứu phát hiện hemophilia dựa vào phả hệ gia đình các bệnh nhân đã được chẩn đoán tại viện Huyết học – Truyền máu TW. *Y học Việt Nam*, số 8/2012, trang 566 - 571.
2. Nguyễn Hoàng Hà, Nguyễn Thị Nữ, **Nguyễn Thị Mai**, Nguyễn Anh Trí (2014). Đặc điểm lâm sàng và xét nghiệm của người phụ nữ mang gen hemophilia tại viện Huyết học – Truyền máu TW. *Y học Việt Nam*. tập 423, trang 139 – 143.
3. **Nguyễn Thị Mai**, Vũ Thị Bích Hương, Nguyễn Anh Trí, Bạch Quốc Khánh (2016). Phát hiện người mang gen hemophilia A kết hợp với gen hemophilia B đầu tiên tại Việt Nam, *Y học Việt Nam*, tập 446, trang 404 – 408.

## II. ĐĂNG TRÊN TẠP CHÍ NƯỚC NGOÀI

1. **T. Nguyen**, A. Nguyen, T. Nguyen, H. Ngo and T. Luu (2012). Hemophilia patient outreach: Experience of Vietnam, *Haemophilia*, 18 (Suppl. 3), 76 (Abstract)  
(Tác giả Nguyễn Thị Mai được viết là **T.Nguyen**)
2. Nguyen Hoang Ha, Nguyen Thi Nu, **Nguyen Thi Mai**, Nguyen Anh Tri, (2014). Characteristics of hemophilia carriers in clinic and testing in National Institute of Hematology and Blood Transfusion, Hanoi, Vietnam, *Haemophilia*, 20 (Suppl. 3), 8. (Abstract)

**MINISTRY OF EDUCATION AND TRAINING**

**MINISTRY OF HEALTH**

**HANOI MEDICAL UNIVERSITY**



**NGUYEN THI MAI**

**THE STUDY OF PATIENT AND CARRIER OF  
HEMOPHILIA A DETECTION BASED ON  
PEDIGREE ANALYSIS**

**Major: Hematology and Blood Transfusion**

**Major Code: 62720151**

**MEDICAL DOCTOR DISSERTATION SUMMARY**

**Hanoi - 2018**

**THE DISSERTATION IS COMPLETED AT  
HANOI MEDICAL UNIVERSITY**

**Name of scientific supervisors:**

- 1. Prof. Nguyen Anh Tri, Ph.D.**
- 2. A.Prof. Nguyen Thi Nu, Ph.D.**

**Reviewer 1: .....**

.....

**Reviewer 2: .....**

.....

**Reviewer 3: .....**

.....

**The dissertation will be presented to the Board of Ph.D disseration at  
Hanoi Medical university**

**At ..... day..... month ..... year.....**

**The dissertation can be found at:**

- National Library of Vietnam
- Library of Hanoi Medical University

## BACKGROUND

### 1. Essentials of the topic

Hemophilia is an inherited bleeding disorder due to factor VIII/IX deficiency. The genes that control the production of factor VIII /IX is located in X chromosome and have no respective allele on Y chromosome. Such disease is congenitally recessive; mainly patient were males while females were gene carriers.

If being diagnosed with hemophilia and adequately treated, patients are completely capable of living a normal life; if not, they would have to endure complications due to repeated bleedings, become disabled, even resulting in early death. Beside possibilities of passing affected gene to the next generation, women who were carriers were also at risk of suffering from bleeding due to deficient clotting factors. In estimated, there were approximately 6000 people with hemophilia and 30.000 carriers in Vietnam; however, there only 40% of which properly diagnosed while the majority have not yet been diagnosed and managed. Since hemophilia is a hereditary disease, there may be multiple patients and carriers in a family. Therefore, based on pedigree of diagnosed patient and detect new patients and carriers in order to diagnose in time, which has tremendous meaning in disease treatment and prevention.

### 2. Objectives of the research

1. *Detect new hemophilia A patients and carriers in their families based on pedigree analysis.*
2. *Analyze some hemorrhaging characteristics and coagulation test results of newly detected hemophilia A patients and carriers.*

### 3. Scientific and realistic meaning of the topic

*Scientific contributions:*

- Implement and apply successfully pedigree analysis method in detecting new hemophilia patients and carriers;
- Change the perception that hemophilia gene carriers can have hemorrhaging symptom and need to be considered as patients if the level of factor VIII < 40%.

*Realistic values:*

- More hemophilia patients and carriers would be diagnosed, treated and consulted early in order to avoid complications due to late diagnosis;
- Premise for genetic consultation and prenatal diagnosis for patients' family members.

### 4. Structure of the dissertation

- This dissertation has 141 pages (not including references and appendices), consists of 7 parts: Background (2 pages), Overview (30 pages), Subjects and method of research (25 pages), Outcome (33 pages), Discussion (49 pages), Conclusion (2 pages), Recommendation (1 page).

This dissertation comprises 35 tables, 12 charts, 10 flowcharts and 5 figures. The dissertation used 132 material references include 112 documents in English, 20 documents in Vietnamese. Appendixes include some patients' pedigrees, pedigree information collection form, bleeding status investigation form, list of research subjects.

## Chapter 1: OVERVIEW

### 1.1. What is hemophilia

Hemophilia A is the most common inherited bleeding disorder due to deficiency or dysfunction of factor VIII in plasma. It is a recessive hereditary associated with X chromosome; therefore, most hemophilia patients were males while female were carriers. Although it is an inherited disease, 30% of cases have no family history of it. This is called sporadic hemophilia.

A person is diagnosed with hemophilia A based on 3 features: (1) Clinical symptoms present with prolonged bleeding, repeated multiple times, mostly in joints and muscles; (2) Family history; (3) Coagulation tests show level of factor VIII is less than 40%. Based on level of factor VIII, there can be classified into 3 levels: severe (FVIII < 1%), moderate (FVIII from 1 to 5%), mild (FVIII from 5 to 40%).

### 1.2. Molecular basis of Factor VIII

Factor VIII is a heterodimer, which consists of two heavy and light chains connected by copper ion. Structure of such complex is stabilized thanks to the interaction between hydrophilic and hydrophobic chains with von Willebrand factor and  $Ca^{2+}$ . Gene that regulate the generation of factor VIII (F8 gene) is located at Xq28 on X sex chromosome, one of the biggest genes in human, spans 186 Kb including 26 exon. Mutations in F8 gene cause deficiency or dysfunction in factor VIII protein, slowing down the thrombin production, leading to prolonged bleeding in hemophilia A patients. There were various types of F8 gene mutations: point mutation with highest proportion (47,5%), Inversion including intron 1 and intron 22 (36,7%), depletion mutation (10 - 15%). Depending on types of genes and the location of mutation in F8 gene, different patients suffer from different levels of disease severity.

### 1.3 Methods of diagnosis for carriers

#### 1.3.1. Pedigree analysis

Because F8/F9 gene is located on X sex chromosome, recessively hereditary and have no respective allele on Y sex chromosome, based on Mendel's law of heredity, pedigree analysis can help identify potential male patients, normal male, obligate carriers and possible carriers.

If a man with hemophilia is married to a normal woman, all their daughters were carriers while their sons were normal (Chart 1.1). If a woman, who is a hemophilia carrier is married to a normal man, the probabilities for each time they have a child born is: 25% normal son, 25% son with hemophilia, 25% normal daughter, 25% daughter with hemophilia gene embedded (Chart 1.2).

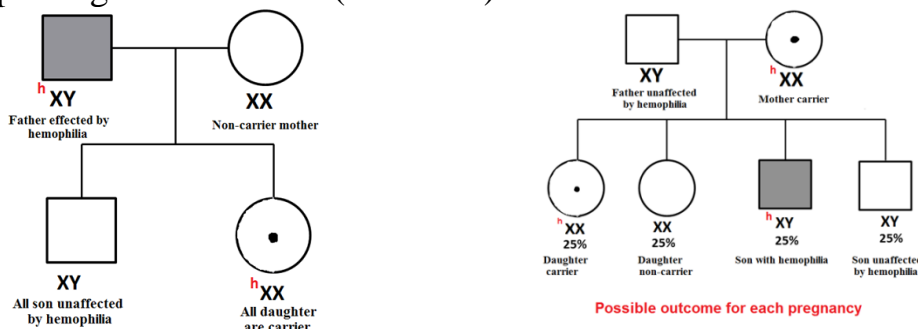


Chart 1.1. and 1.2. Mechanism of hemophilia heredity



If a woman, who is a hemophilia carrier is married to a man with hemophilia, the probabilities for each time they have a child born is: 25% normal son, 25% son with hemophilia, 25% daughter with hemophilia, 25% daughter with hemophilia gene embedded (Chart 1.3).

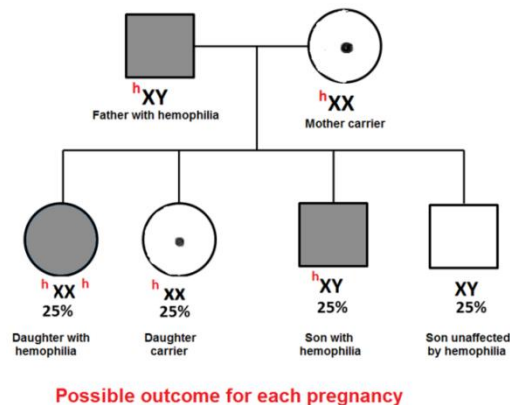


Chart 1.3. Mechanism of hemophilia heredity 2

**Obligate carriers were ones that have one of these four conditions:** (1) daughters of a person with hemophilia, (2) mothers of one son with hemophilia and who have at least one other family member with hemophilia, (3) mothers of one son with hemophilia and who have a family member who is a known carrier of the hemophilia gene, (4) mothers of two or more sons with hemophilia

**Possible carriers were ones that have one of these three conditions:** (1) Mothers of one son with hemophilia and who have no family members with hemophilia or carrying hemophilia gene; (2) Women who have at least one man with hemophilia in mother's side and none of her son has hemophilia; (3) Women who were daughter of a carriers.

### 1.3.2. Clotting factors analysis

Analysis of FVIII/vWF:Ag ratio can identify the status of hemophilia gene carriage if a female called possible carrier have ratio of FVIII/vWF :Ag less than cut - off. The drawback of such method is that it cannot confirm the status of gene carriage if this ratio is higher than cut - off. Besides, there were no fixed ratio and cut-off scores, it's depend on each laboratories. Nowadays, this method is used in medical facilities that were not able to perform genetic analysis or in cases of undetectable genetic mutation in member with hemophilia

### 1.3.3. Genetic defect analysis

#### 1.3.3.1. Mutation direct analysis

Mutation direct analysis is a method to detect the carriers among the female family members based on mutations identified in index patient. There were two principal techniques to identify the mutation, which were PCR and DNA sequencing. Thanks to such techniques, direct analysis is able to detect 97% cases of hemophilia A carriers. This is a modern and precise method, however, due to gene sizes and the variety of mutations, these techniques were time consuming, expensive as well as require high technical capabilities and skills. In cases of severe hemophilia A, mutations should be firstly screened for intron 22 inversion, after which is intron 1 inversion since these were popular mutations (45 - 50% severe patients have intron 22 inversion and 1 - 5% severe patients have intron 1

inversion).

#### *1.3.3.2. Linkage analysis*

Linkage analysis is a method to monitor the heredity of mutated X chromosome among family based on linked polymorphisms on X chromosome. Polymorphisms often use restriction enzyme *BclI*, *HindIII*, *XbaI*, *BglI*, *MspI* (1), *MspI* (2), *TaqI* and with polymorphism STR in intron 13 and 22. Linkage analysis is fast, cheap and trustworthy to detect hemophilia A carriers in family of which mother is a carrier. However, the effectiveness of this method depends on the informative value of the polymorphism used, which depend on the race of subjects.

### **1.4. Prenatal diagnosis:**

Prenatal diagnosis is an important part in hemophilia care. In each labor, carriers were at risk of passing the mutated genes for 50% of daughters and 50% for sons. Pregnant women possibly give birth to son with hemophilia will have their foetus's cell collected to analyze the mutations or take their foetus's blood collected to assay factor VIII.

### **1.5. Identify hemophilia patients and carriers**

#### *1.5.1. Identify hemophilia patients*

At present, in Vietnam, approximately 60% of patients have not been diagnosed yet; therefore, identifying new patients is becoming more necessary.

There were many ways to identify new patients, including outreach program, which using basis of genetic mechanism of the disease to detect the possible patients and carriers among patients' family members, from which carry out the diagnosis test. Because this is a rare inherited disease, circling the area of subjects help diagnosis much more effective. The outreach program to detect new patients was implemented at National Institute of Hematology and Blood Transfusion since 2004, which helps patients would be promptly and precisely diagnosed, consulted and treated.

#### *1.5.2. Identify hemophilia carriers*

There were many methods to identify hemophilia carriers. The combination of these methods is able to identify nearly 100% of cases, in which pedigree analysis should be applied at first. This method is simple, from which obligate and possible carriers among family members could be identified. After that, diagnostic strategy would be specified to meet with the racial, economic, human resource, cultural and religious characteristics of each country.

At present, several laboratories have implemented methods to detect carriers. Nevertheless, carriers' identification and management is systematic and underrated at hemophilia centers.

## **Chapter 2: SUBJECTS AND METHODS**

### **2.1. Research Subjects**

#### *2.1.1. Research Subjects*

The research subjects were patient and families include:

- Group 1: 100 unrelated hemophilia A patient diagnosed (called: Original patients).
- Group 2: 1402 family members of 100 original patients. Include:
  - + 869 males: Those have possibility to be hemophilia A patient by genetic

mechanism analysis (called: related to hemophilia)

+ 533 females: Those were possibility to be carriers by genetic mechanism analysis (called: related to hemophilia)

- Group 3: 70 normal females (controls group)

### **2.1.2. Selection and exclusion standards**

#### **2.1.2.1. Group 1: Original Patients**

\* *Selection standards:*

Patients have been diagnosed with hemophilia A that has capability of create a pedigree with at least 3 generations or more.

\* *Exclusion:*

- Patient were not capable of create pedigree with at least 3 generations.
- Other members in patient's family cannot gather to participate in the research.
- Non - compliance.

#### **2.1.2.2 .Group 2:**

Based on the Mendel's Genetic Law, family members of the original patients were possible a patients or carriers

##### **a. Male was possible affected by hemophilia**

- All members have blood relationship with patient have met conditions of which below:

+ In the same/before generation with hemophilia patient: siblings, and other members on the mother's side: brother, grandfather, maternal grandfather, great-grandfather, uncle, granduncle, great-granduncle, nephew, cousin....

+ In the next generation of patient: males have relationship with hemophilia patient in the mother's family, they call the patient is uncle, maternal grandfather, great-grandfather....

- Were capable to collect information about symptom of bleedings.

##### **b. Female related to hemophilia**

Mother, mother's sibling sisters and members have blood relationship on the mother's side: cousins, aunt, grand-aunt, maternal grandfather, great-grandmother, great-grand-aunt, niece, grandniece, great-grandniece...

**Possible carriers were ones that have one of these three conditions:** (1) Mothers of one son with hemophilia and who have no family members with hemophilia or carrying hemophilia gene; (2) Women who have at least one man with hemophilia in mother's side and none of her son has hemophilia; (3) Women who were daughter of a carriers.

**• Obligate carriers were ones that have one of these four conditions:** (1) daughters of a person with hemophilia, (2) mothers of one son with hemophilia and who have at least one other family member with hemophilia, (3) mothers of one son with hemophilia and who have a family member who is a known carrier of the hemophilia gene, (4) mothers of two or more sons with hemophilia

\* **In the Obligate carriers, we selected 83 people which have same conditions with control group as follow to compare:** Age from 14-59 years old; Not pregnant and not using contraceptive pill; Hepatitis: Negative

#### **2.1.2.3. Group 3: Controls:**

70 healthy female from 14-50 years old; not pregnant and do not use contraceptive pill, enroll into the study voluntarily

## 2.2. Study method

### 2.2.1. Study Designs:

Cross-sectional studies, Retrospective studies.

### 2.2.2. Study index

- General information, family history, clinical symptoms, type of disease, the severity of disease.

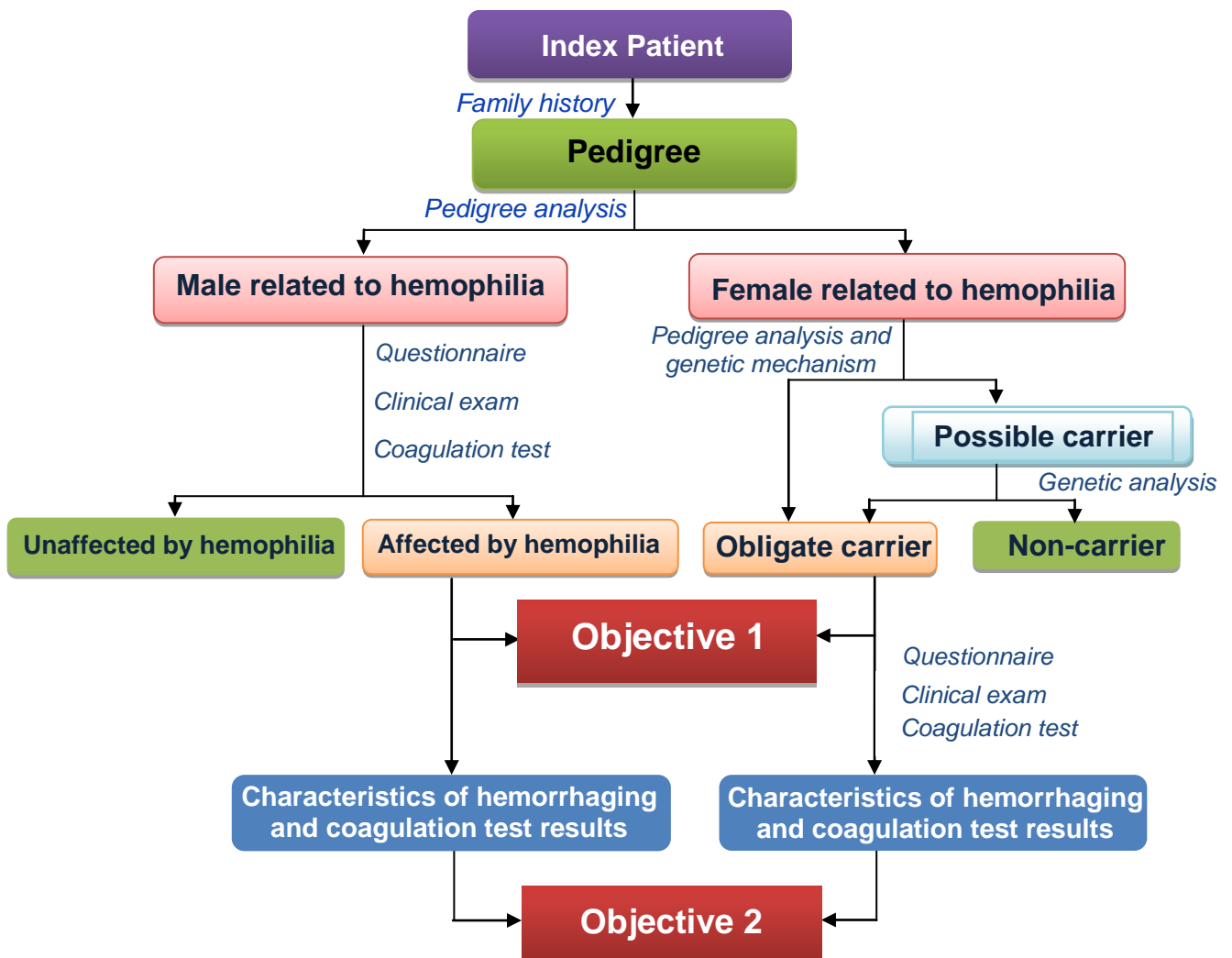
- Coagulation test index: Basic coagulation (PT, APTT, TT, Fibrinogen, Platelet count), Mix test, factor coagulation assay (VII, VIII, IX, vWF:Ag), Factor VIII gene mutations and PCR-RFLP with BclI analysis

2.2.3. Sampling methods: Convenience sampling.

### 2.3.3. Study duration and places:

Restropective study from year 2005 – 2011; Prospective study from 2015-2016 at the National Institute of Hematology and Blood Transfsion and the Centre for Gene and Protein Research, Hanoi Medical University.

**2.5. Research is conducted seriously and respects the principles of ethics in research**



*Diagram of the research*

### Chapter 3: OUTCOME

#### 3.1. Some characteristics of subjects

There were 79/100 patient have family history

Tab 3.1. Severities and characteristics of genetic mutation of the original patients

Severity (n = 100)		Severe	Moderate	Mild	Total		
	Quantity	76	9	15	100		
	Rate %	76	9	15	100		
Characteristics of genetic mutation	Intron 22 Inversion	n	23	0	0	23	32
		%	30,3	0	0		
	Intron 1 Inversion	n	1	0	0	1	
		%	1,3	0	0		
	Point mutation	n	5	1	1	8	
	Delete mutation	n	1				

Comment:

- Majority of original patients were severe hemophilia (76%),
- 23/76 (30,3%) severe patient have intron 22 inversion; 1/76 (1,3%) severe patient have intron 1 inversion; 8/9 patients have been found mutation (7 point mutation and 1 delete mutation).

#### 3.2. Detection of new patients and carriers

From 100 original patients created 100 pedigrees of 100 families

Tab 3.2. The number of generations could exploit information in 100 families

	3 Generations	4 Generations	5 Generations	6 Generations	7 Generations	X ± SD
n (n = 100)	30	58	11	0	1	3,8 ± 0,7
%	30	58	11	0	1	

Comment: In average, each families could be exploited information in 3,8 generations, range from 3-7 generations.

##### 3.2.1. Detection of new patients

Tab 3.3 Number of people related to hemophilia

Situation	Male		Female		Total
	n	%	n	%	
Related to hemophilia	869	73,8	1129	96,8	2343
Unaffected by hemophilia (male)/ Non-carrier(female)	308	26,2	37	3,2	
<b>Total</b>	<b>1177</b>	<b>100</b>	<b>1166</b>	<b>100</b>	

Comment: In 2343 members having blood relationship with 100 original patients, identified 869/1177 (73,8%) male related to hemophilia and 1129/1166 (96,8%)

female related to hemophilia.

*Tab 3.4. Results of detection male possible affected by hemophilia by questionnaire*

Abnormal bleeding	Alive		Died		Total		% /number of male related to hemophilia (n = 869)
	n	%	n	%	n	%	
Yes	166	68,6	76	31,4	242	69,7	27,8
No (members in mild hemophilia families)	105	100	0	0	105	30,3	12,1
<b>Total</b>	<b>271</b>	<b>78,1</b>	<b>76</b>	<b>21,9</b>	<b>347</b>	<b>100</b>	<b>39,9</b>

*Comment:* Among males related to hemophilia, possible patient is male who has abnormal bleedings or male without abnormal bleeding who is member of mild hemophilia families. 347/ 869 were detected possible patients by used questionnaire; in which, there were 271 males were aliving (78,1%) and 76 males was died (21,9%).

*Tab3.5. Results of detection males possible affected hemophilia by coagulation testing*

Abnormal bleeding	Affected by hemophilia		Unaffected by hemophilia		Total	
	n	100	n	100	n	100
Yes	145	145	0	0	145	100
No	2	3,7	52	96,3	54	100
<b>Total</b>	<b>147</b>	<b>73,9</b>	<b>52</b>	<b>26,1</b>	<b>199</b>	<b>100</b>
<b>% /total of males related by hemophilia (n = 869)</b>	<b>16,9</b>		<b>5,9</b>		<b>22,9</b>	

*Comment:*

199/271 (73,4%) males considered possible affected by hemophilia aliving were performed blood tests. In which, there were 145/145 males have abnormal bleeding and 2/54 males without abnormal bleeding were diagnosed with hemophilia. The number of new patient diagnosed were 147 patients, accounting 73,9% of quantity of performed blood test males. Other people not presented for blood testing.

### 3.2.2. Detection of carriers

#### 3.2.2.1. Detection of carriers by using pedigree analysis

Tab 3.6. Results of detection obligate carriers and possible carriers via pedigree analysis

Subject			n		%		
Obligate carriers	Daughter of hemophilia father	Have children	113	61	61,7	34,3	18,5
		Not yet have children		52			15,8
	Have at least 2 sons with hemophilia		49	14,9			
	Have 1 son and 1 male in family were affected by hemophilia		156	47,4			
Have 1 son with hemophilia and 1 carrier in family		11	3,3				
Possible carriers	Have a son with hemophilia		21	10,3	38,3	89,7	100
	At least 1 male in family were hemophilia patient		183				
	Daughter of carrier		0	0			
<b>Total</b>			<b>533</b>	<b>100</b>			

*Comment:*

- 533/1129 (47%) females related to hemophilia were assessed by collected information.

- 329/533 females (61,7%) were detected obligate carriers and 204/533 woman (38,3%) were detected possible carriers.

- 47,4% obligate carriers have 1 son and 1 male on family were diagnosed with hemophilia, 34,3% obligate carriers were daughter of male with hemophilia and 14,9% obligate carriers have at least 2 son with hemophilia. Only 3,3% obligate carriers have 1 son with hemophilia and in her family have 1 carrier. There were 52 obligate carriers not have children yet.

- 89,7% possible carriers have male with hemophilia in the family, 21 possible carriers have 1 son with hemophilia and no one had only condition of being a carrier's daughter.

Tab 3.7. The ratio of detection carriers based on the severity of index patients

Severity of index patients	Number of detected carriers	Number of detected carriers from each pedigree	
		X ± SD	Min - max
<b>Severe<sub>(1)</sub> (n = 76)</b>	183	2,4 ± 2,1	0 - 8
<b>Moderate<sub>(2)</sub> (n = 9)</b>	42	4,7 ± 1,7	1 - 7
<b>Mild<sub>(3)</sub> (n = 15)</b>	104	6,9 ± 6,0	1 - 22
<b>Total (n = 100)</b>	329	3,3 ± 3,4	0 - 22
<b>p</b>	p <sub>(1)(2)</sub> < 0,05; p <sub>(1)(3)</sub> < 0,05; p <sub>(2)(3)</sub> > 0,05		

*Comment:* In average, each family have 3,3 obligate carriers, in which the number of carriers in the family of severe hemophilia patient is less than this number in the family of moderate family and mild family (p<0,05).

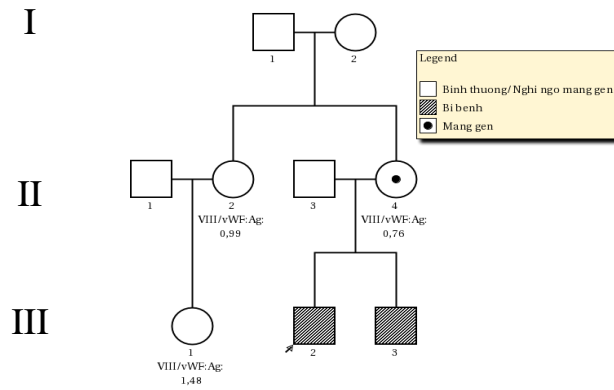


Diagram 3.1. Pedigree of Nguyen Quang M. (26)

Comment:

- Patient Nguyen Quang M. (III:2) is a severe hemophilia. Based on the pedigree, family members have been identified have related to hemophilia were:
  - + Males were possible affected by hemophilia: I:1 and III:3;
  - + Females related hemophilia: I:2, II:2, II:4, III:1.
- By using questionnaire and interview, III:2 have younger brother have abnormal bleeding. III:3 is diagnosed with hemophilia after performing coagulation test.
- Mother of III:2 has 2 son with hemophilia, so she's obligate carrier.
- Female were possible carrier: I:2, II:2, III:1

3.2.2.2. Coordination of pedigree analysis, genetic analysis and ratio of FVIII/vWF:Ag to detect carrier

a. Genetic analysis

Table 3.8. The results of detection carriers by using genetic analysis

	Carriers		Non-carriers		Total	
	n	%	n	%	n	%
<b>F8 gene analysis directly (intron 1 inversion, intron 22 inversion, point mutation and delete mutation)</b>	30	42,3	41	57,7	71	100
<b>Linkage Analysis (PCR – RFLP with BclI)</b>	8	47,1	9	52,9	17	100
<b>Total</b>	38	43,2	50	56,8	88	100

Comment:

In 88 possible carriers have genetic analyzed, there were 38 carriers (43,2%) and 50 non-carriers (56,8%).

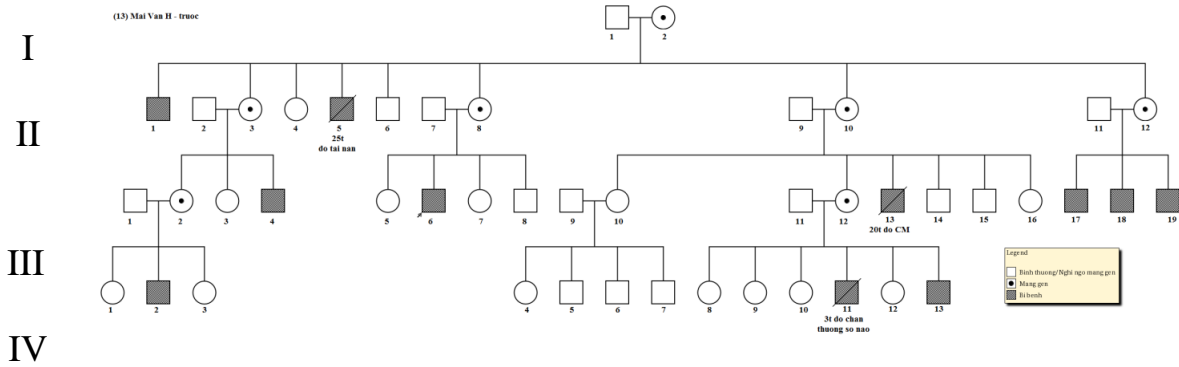
Talbe 3.9. The results of diagnosis carriers by combine methods

Subject		n (n = 533)		%	
Carriers	Pedigree analysis	367	329	68,9	61,7
	F8 gene analysis		30		5,6
	Linkage Analysis		8		1,5
Non- carriers (identified by genetic analysis)		50	9,4		
Possible carriers		116	21,8		
<b>Total</b>		<b>533</b>	<b>100</b>		

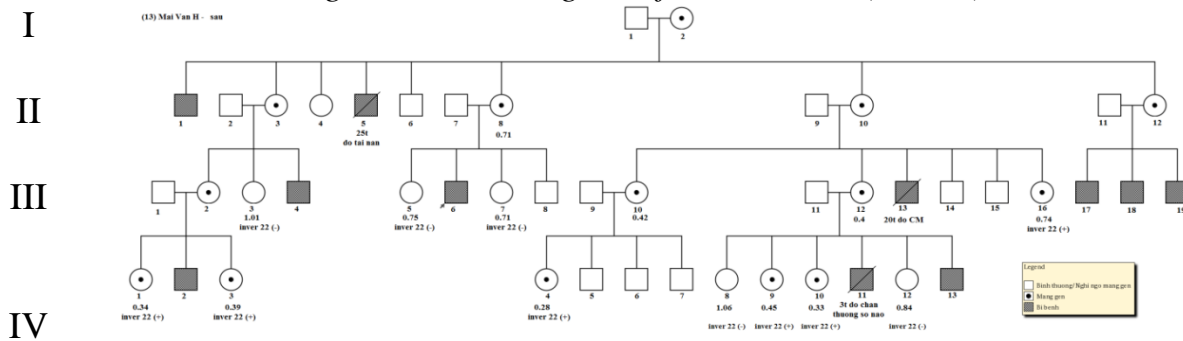


*Comment:*

There were 367 carriers detected in the research, including 329 (61,7%) carriers identified by pedigree analysis; 30 carriers identified by direct genetic analysis (5,6%); 8 carriers identified by PCR-RFLP *Bcl*I analysis (1,5%); There were 50/533 non-carriers have identified by genetic analysis (9,4%). 116/533 (21,8%) were possible carriers.



*Diagram 3.2: Pedigree of Mai Van H (No.13)*



*Diagram 3.3: Pedigree of Mai van H (No.13) after intron 22 inversion analysis*

*Comment:*

- Patient Mai Van H (No.13) was a severe hemophilia A had intron 22 inversion. There were 9 males in his family had abnormal bleeding: II:1, II:5, III:4, III:13, III:17, III:18, III:19, IV:11, IV:13 in which II:5, III:13, IV:11 died due to bleeding. 6 alive members had tested and diagnosed severe hemophilia A.

- These members: I:2, II:3, II:8, II:10, II:12, III:2, III:12 were obligate carriers because they had  $\geq 2$  son with hemophilia (I:2, II:12, III:12) or had a son with hemophilia and many males in their family affected by hemophilia (II:3, II:8, II:10, III:2).

- All these members in the family include: II:4, III:3, III:5, III:7, III:10, III:16, IV:1, IV:3, IV:4, IV:8, IV:9, IV:10, IV:12 were positive hemophilia carriers. After performed intron 22 inversion analysis, they have been identified as hemophilia carrier: III:10, III:16, IV:1, IV:3, IV:4, IV:9, IV:10 and non-carriers: III:3, III:5, III:7, IV:8, IV:12.

*b. Analysis of ratio VIII/vWF:Ag*

- Determine the cut-off

Among of obligate carriers, 83 carriers have the same conditions as control group (age:14-50 years, not pregnant and not using contraceptive pill) selected to compare the level of factor VIII, level of vWF:Ag and ratio of FVIII/vWF:Ag.

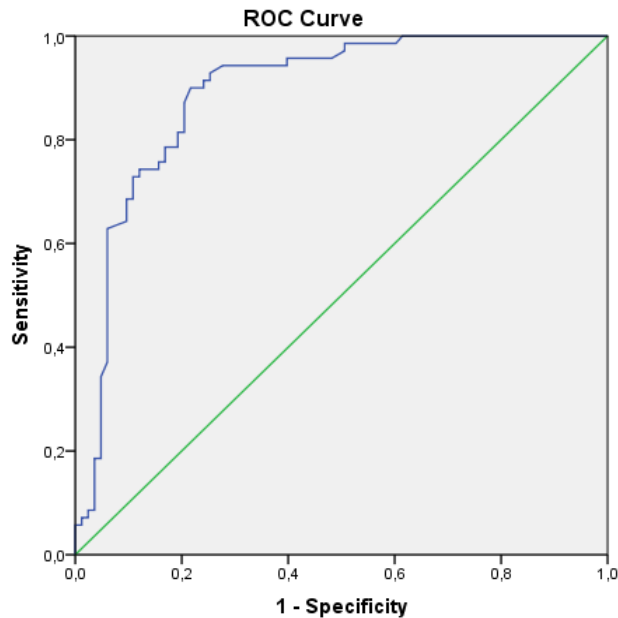
*Table 3.10. Comparative of level of coagulation factor between carrier and non-carrier*

Subject	FVIII (%)		vWF:Ag (%)		Ratio of FVIII/vWF:Ag	
	X ± SD	Min - max	X ± SD	Min - max	X ± SD	Min- max
<b>Non-carriers (n = 70)</b>	81,4 ± 27,9	42 - 191	85,4 ± 30,3	35 - 195	0,95 ± 0,21	0,52 - 1,54
<b>Carriers (n = 83)</b>	49,9 ± 19,6	16 - 131	86,2 ± 23,5	39 - 193	0,59 ± 0,22	0,21- 1,3
<b>p</b>	<b>&lt; 0,05</b>		<b>&gt; 0,05</b>		<b>&lt; 0,05</b>	

Comment:

- There was no difference among non-carrier group and carriers group on the level of factor von Willebrand.
- The carriers group had level of FVIII and the ratio of FVIII/vWF:Ag lower than theses of the non-carrier group (with  $p < 0.05$ )

b. Apply the ratio of VIII/vWF:Ag on detection the carriers and prenatal diagnosis



*Chart 3.1. ROC curve of the ratio VIII/vWF:Ag*

Comment

The value of the area under the curve (AUC) is 0,89 or 89% ( $p < 0,01$ ); so that, the ratio FVIII/vWF:Ag is rather good to detect the carriers.

Table 3.11. The sensitivity and specificity of the ratio FVIII/vWF:Ag in diagnosis hemophilia A carriers

Coordinates of the curve of FVIII/vWF:Ag		
Cut - off	Sensitivity	1 - Specificity
...	...	...
,6526	,943	,312
,6603	,943	,313
,6659	,943	,330
,6741	,943	,289
,6891	,943	,277
,7034	,929	,253
,7080	,914	,253
,7098	,914	,241
,7112	,900	,241
,7124	,900	,229
Cut - off → <b>,7136</b>	<b>,900</b>	<b>,217</b>
,7150	,871	,205
,7166	,857	,205
,7206	,843	,205
,7268	,829	,205
,7307	,814	,205
,7325	,814	,193
,7356	,800	,193
,7388	,786	,193
,7426	,786	,181
,7477	,786	,169
,7520	,771	,169
,7625	,757	,169
,7737	,757	,157
,7771	,743	,157
,7825	,743	,145
...	...	...

*Comment:*

The cut-off 0,7136 (round= 0,71) with sensitivity is 0,9 (90%) and the specificity is  $1 - 0,217 = 0,783$  (78,3%) is detected, because with this cut - off,  $J = 0,683$  is biggest [ $J = (sensitivity + specificity) - 1$ ]. Applied this cut - off for 159 possible carriers, there were 72/159 (45%) possible carriers have the ratio of FVIII/vWF:Ag under 0,71. They were considered as hemophilia A carriers.

Chart 3.12. Comparative between the ratio of FVIII/vWF:Ag and the genetic analysis

Diagnosis methods	Carrier (n = 38)				Non-carrier (n = 50)			
	Ratio < 0,71		Ratio ≥ 0,71		Ratio < 0,71		Ratio ≥ 0,71	
	n	%	n	%	n	%	n	%
PCR - RFLP with BclII (n = 17)	6		2		0		9	
Direct genetic analysis (n = 71)	27		3		4		37	
<b>Total n = 88)</b>	33	86,8	5	13,2	4	8,0	46	92,0

*Comment:*

33/38 (86,8%) carriers had the ratio < 0,71 and 4/50 (8%) non-carrier have the ratio < 0,71. Thus, comparative with genetic analysis, using the ratio of FVIII/vWF:Ag have detected exactly for 86,8% of carriers and misdiagnosis for 8% of non-carriers.

### 3.3. Characteristics of new patients and carriers

**3.3.1. Characteristics of new patients**

All new patient were male.

**3.3.1.1. Type of disease**

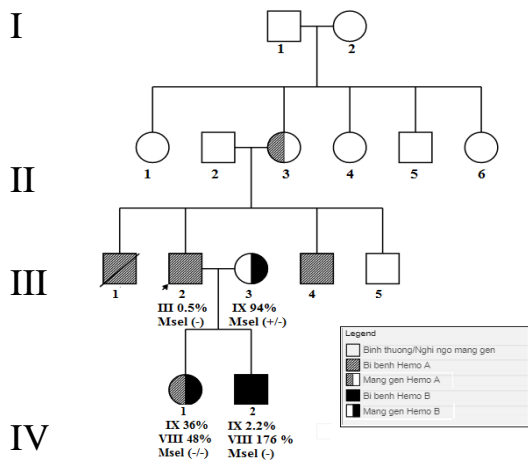
*Chart 3.13. Classification of new patient by type of disease*

	Number of patient	Ratio %
<b>Hemophilia A</b>	144	97,9
<b>Hemophilia A combine with congenital FVII deficiency</b>	1	0,7
<b>Hemophilia B</b>	1	0,7
<b>Congenital FVII deficiency</b>	1	0,7
<b>Total</b>	<b>147</b>	<b>100</b>

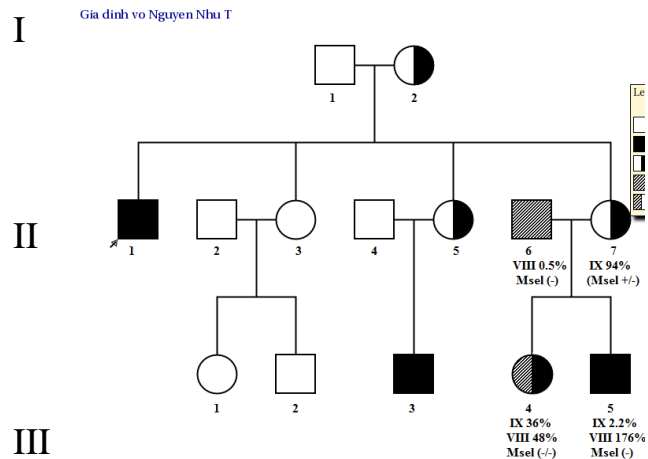
*Comment:*

- Most of new patient were hemophilia A. There was a hemophilia A patient combined with congenital FVII deficiency and a congenital FVII deficiency who is his brother.

- There was a new patient with hemophilia B was son of a father with hemophilia A and a hemophilia B carrier mother (in the family 77).



*Diagram 3.4. Pedigree of Nguyen Nhu T. (No. 77)*

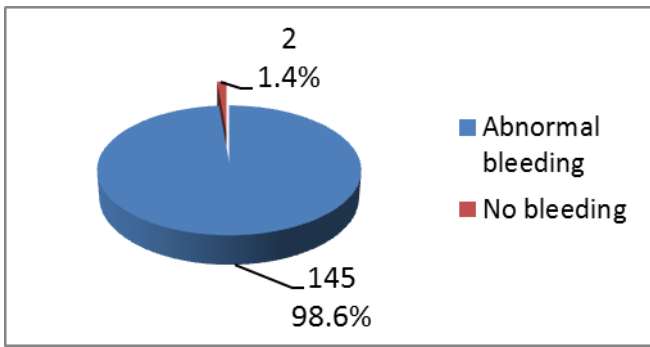


*Diagram 3.5. Pedigree of the wife's family of Nguyen Nhu T. (No. 77)*

*Comment:*

- IV:1 have father with hemophilia A , so she is obligate hemophilia A carrier .
- Mother of IV:1 (person number III:3 in the diagram 3.4 and the number II:7 in the diagram 3.5) has a brother with hemophilia B, and a son with hemophilia B, so she is obligate hemophilia B carrier.
- IV:1 has mother is a hemophilia B carrier, so she is possible hemophilia B carrier.
- So, IV:1 is a hemophilia A carrier and possible hemophilia B carrier.

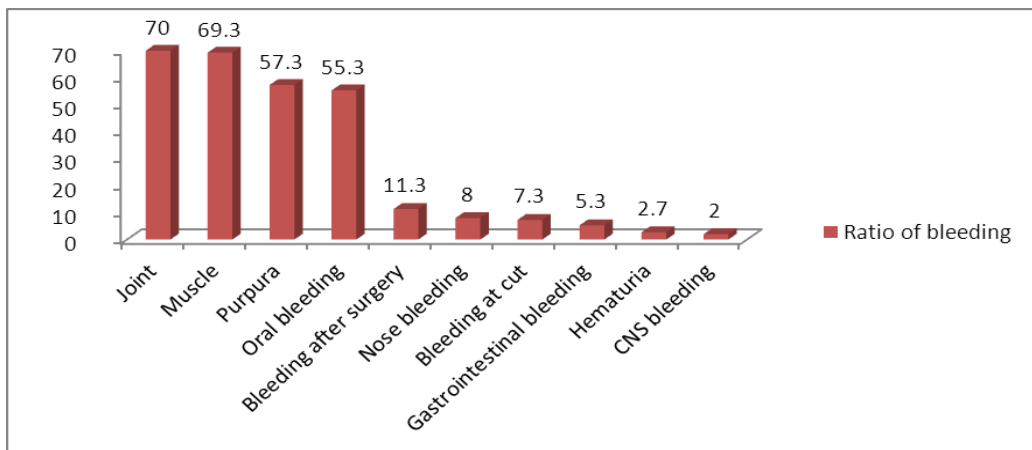
**3.3.1.2. Characteristics on the bleeding symptomatic and coagulation test of new patients**



**Chart 3.2. The ratio of abnormal bleeding in new patients**

*Comment:*

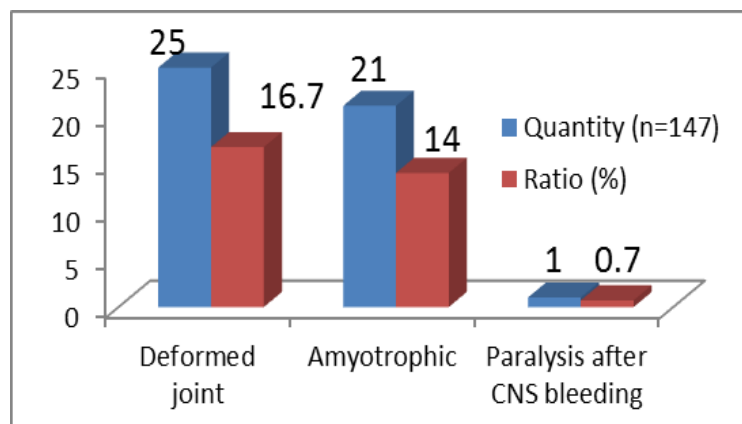
There were a majority of new patients have abnormal bleeding symptoms. There're 2 mild hemophilia patient don't have abnormal bleeding.



**Chart 3.3. Symptomatic of bleeding in new patient**

*Comment:*

- Bleeding in joint, muscles, bleeding under skin, oral bleeding were common symptoms with the ratio is 70%, 69.3%, 57.3% and 55.3% respectively.
- Prolonged bleeding after surgery, nose bleeding, bleeding from a cut in a lower rate (11.3%; 8% and 7.3%).
- Gastrointestinal bleeding, hematuria, CNS bleeding have a low rate.



**Chart 3.4. Complications due to bleeding in new patients**

*Comment:*

27/147 (18,4%) new patients have complications due to bleeding. In which there were 25 patients (17%) have deformed joints, 21 patients (14,3%) have amyotrophy and a patient has paralysis (0.7%) after central nervous system (CNS) bleeding.

Table 3.14. Characteristics of coagulation test of new detected patients

	n	X ± SD	Min - max
rAPTT	147	3,4 ± 1,5	1,1 - > 5
PT (%)	141	104,3 ± 19,6	52 - 191
rTT	141	1,0 ± 0,1	0,9 - 1,3
Fibrinogen (g/l)	141	3,4 ± 0,9	2,2 - 6,3
Platelet count (x10 <sup>9</sup> /l)	147	285,5 ± 88,2	150 - 571
FVIII (%)	147	6,3 ± 17,1/median 0,9	0,1 - 176
FIX (%)	1	2,2	
FVII(%)	4	51,5 ± 27,44	28 - 80
Mix test	146	Negative	

*Comment:*

- The average of rAPTT were 3,4 ± 1,5 and all hemophilia patient have prolonged APTT. There only 1 patient with FVII deficiency in the family number 44 have normal APTT.
- All hemophilia patients had negative results of mix test and their Thrombin Time (TT) result in normal range. No one had reduced of fibrinogen levels and number of platelets.
- The average result of PT were 99,0 ± 27,1%. There were 2 patients (1.4%) had reduced of PT (52% and 58%).
- The median of FVIII level is 0.9%, in which had 2 cases with FVIII normal (a patient with FVII deficiency: FVIII level = 92%, and a hemophilia B patient with level of FVIII 176% )
- There only a patient with hemophilia B has level of factor IX at 2,2%.

**3.3.2. Characteristics of the carriers****3.3.2.1. Characteristics of serverity:**

All of 329 obligate carrier were hemophilia A carries. However, the family with number 77 includes a father with severe hemophilia A and mother is a hemophilia B carriers, their daughter is not only obligate hemophilia A carrier but also possible hemophilia B carrier.

The results of PCR-RFLP with *MseI* showed that the daughter is carrier hemophilia B. (father *MseI* (-), mother *MseI* (+/-), son with hemophilia: *MseI* (-), daughter: *MseI* (-/-)),so that the daughter is a carrier for both hemophilia A and hemophilia B.

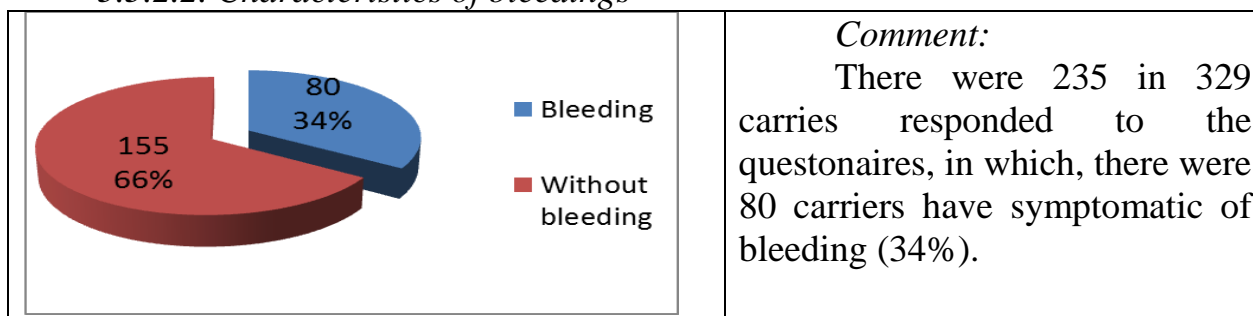
**3.3.2.2. Characteristics of bleedings**

Chart 3.5. The ratio of bleeding occurs in the carries

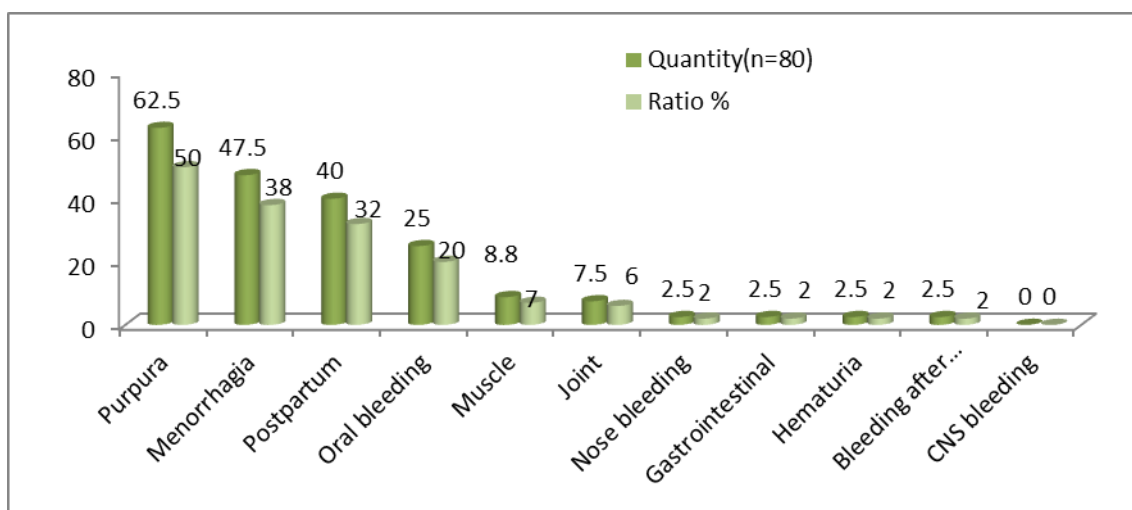


Chart 3.6. Site of bleeding in the carriers

*Comment:*

Purpura, prolonged menstrual period, postpartum bleeding, oral bleeding were majority of bleeding occurred to the carriers with the ratio were 62,5; 47,5; 40 and 25%, respectively. The ratio of joint bleeding and muscle bleeding were 7,5% and 8,8%. There were 2 cases had bleeding after operation and 1 case in which had to treated bleeding by FVIII product.

### 3.3.2.3. Characteristics of coagulation test

#### a. APTT and Mix test

Table 3.15. Characteristics of APTT and Mix test of the carriers

rAPTT		n		%		Mix test
Prolonged (r > 1,25)	> 1,25 to ≤ 1,5	35	40	23,4	26,7	100% Negative
	> 1,5 to ≤ 2,0	5		3,3		
	> 2,0	0		0		
Normal (0,8 to ≤ 1,25)		110		73,3		
<b>Total</b>		<b>150</b>		<b>100</b>		

*Comment:*

In 150 obligate carriers which were appointed to do the APTT test and FVIII assay, there were 40 people (26,7%) have prolonged APTT, the majority of which have results at > 1,5 to ≤ 2,0. All of patient have prolonged APTT have not inhibitor (Mix test negative).

Chart 3.16. Characteristics of carrier's level of FVIII

Level of FVIII (%)		n	%
X ± SD	52,6 ± 20,6	< 40	40 26,7
		≥ 40 to ≤ 60	65 43,3
Min - max	10 - 131	> 60	45 30
		<b>Total</b>	<b>150</b> <b>100</b>

*Comment:*

The average level of FVIII at the carriers is  $52,6 \pm 20,6\%$ , close to the floor level of the normal range, range 10 - 131%. There were 40 people (26,7%) have level of FVIII under 40%. They were considered as to mild hemophilia.

*Table: 3.17. Comparative of factor VIII level among difference severity of carriers*

		Average of FVIII (%)		Oneway Anova test, F= 2.47, p = 0,088
<b>Severe</b> (n = 94)	<b>X ± SD</b>	53,5 ± 19,3		
	<b>Min - max</b>	17 - 120		
<b>Moderate</b> (n = 11)	<b>X± SD</b>	60.7 ± 22.2		
	<b>Min - max</b>	25 - 91		
<b>Mild</b> (n = 45)	<b>X ± SD</b>	47,3 ± 22,1		
	<b>Min - max</b>	10 - 131		
<b>General</b> (n = 150)	<b>X ± SD</b>	<b>52,2 ± 20,6</b>		
	<b>Min - max</b>	<b>10 - 131</b>		

*Comment:*

There is no difference in the level of FVIII among severity hemophilia carriers, with  $p > 0,05$ .

*Table 3.18. Co-relation between level of FVIII and bleedings*

Symptomatic Level of FVIII		Bleeding (n = 73)		Non-Bleeding (n = 77)		p
		n	Ratio	n	Ratio	
< 40% (n = 40) <sub>(1)</sub>		34	85%	6	15%	$p_{1,2} < 0,01$ $p_{2,3} < 0,01$ $p_{1,3} < 0,01$ $p_{1,4} < 0,01$ $OR_{1,4} = 10,3$ $OR_{1,2} = 5,1$ $OR_{2,3} = 8,7$
≥ 40 <sub>(4)</sub> (n = 110)	40% - 60% (n = 65) <sub>(2)</sub>	34	52,3%	31	47,7%	
	> 60% (n = 45) <sub>(3)</sub>	5	11,1%	40	88,9%	

*Comment:* In 3 levels of factor VIII (< 40%, 40 - 60% and > 60%), if the carriers have levels of FVIII in lower range, so they have higher risk of bleeding.

The risk of bleeding in people with levels of FVIII < 40% higher than those with level of FVIII ≥ 40% was 10,3 times and higher than people with level of FVIII from 40 - 60% was 5,1 times. The risk of bleeding in people with levels of FVIII in range from 40-60% was higher than these of people with level of FVIII > 60% was 8,7 times.

## Chapter 4: DISCUSSION

### 4.1. Characteristics of the index patients

#### 4.1.1. Characteristics of family history and severity.

The ratio of patient had family history and the ratio of severe hemophilia patient in this research was higher than that of other researches. The reason is because patients and families in this families were more concerned and anxious about their status of this disease and genial status. Therefore, they were more likely to accept participate in this study than those with only one patient and mild/moderate families.

#### 4.1.2. Characteristic of genetic mutations.



The ratio of patients who have intron 1 inversion and intron 22 inversion were equivalent to that of other authors. There were 8/9 patients had been detected the mutation by *F8* sequencing. These results would be used to determine the carrier status for the female member in families.

## **4.2. Detection new patients and carriers base on pedigree analysis**

100 hemophilia A patient in the research had been asked to create 100 pedigrees, in which, there are majority (58%) could be exploit information within four generations. This result was equivalent to that of research of Monica Singh and H. Kaur (2001). The availability of information for creating pedigrees was heavily dependent on suppliers and required the patience of investigators.

### **4.2.1. Detection of new patients**

Based on genetic mechanic of disease, 869 males were determined related hemophilia from 1177 male had blood relationship with patients. Among 869 males related to hemophilia, there're 347 males were considered possible affected by hemophilia by used questionnaire. In which, there were 271 males were being alive and 76 males were died. 147 new patients have been diagnosed with hemophilia in 199 males were performed coagulation test (the ratio is 73,9%). The table 3.5 showed questionnaires were very useful on determines males who possible affected by hemophilia, especially members in the severe and moderate hemophilia families. In addition, coagulation tests should be performed for those who are possible affected by hemophilia in mild hemophilia families without abnormal bleeding to avoid omission.

Hemophilia is a rare hereditary disease (affects in 25 - 60 people per a million of population in Vietnam), the incidence of this disease does not difference between geographic regions and human races. If the search is conducted by conventional methods, at least 2.45 million people will be screened for detecting equivalent number of new patient. Some studies have conducted epidemiological studies that have found little or no detection of patients, even performed in large populations. Obviously, for the purpose of detecting new patients, performance based on genetic mechanisms, pedigree analysis of hemophilia patients is highly effective as well as save manpower and expenses. However, for sporadic hemophilia families, the attention should be paid to those who are likely to develop the disease in the same or next generation.

### **4.2.2. Detection of carriers**

#### **4.2.2.1. Detection of carriers by pedigree analysis**

In 1129 females related to hemophilia, 533 (47%) females assessed by collected information (47%). To obtain necessary information, finding member who could contact and gather other members in family is very important.

From 533 exploited information, 329 obligate carriers (61,7%) and 204 possible carriers (38,3%) have been determined. Majority (47,4%) of obligate carriers were female had 1 son and another male in her family was patient with hemophilia. 34,3% obligate carriers were having had father with hemophilia. The ratio of obligate carriers who have 2 son with hemophilia was 14,9%. There only 3,3% obligate carriers are having had a son with hemophilia and her family having had at least a

carriers. In the research of author M.Singh in 2002, there were 130/425 (30,58%) obligate carriers have been determined by pedigree analysis. This ratio in Carold Kasper's research (USA) was 56,14% and Bui Thi Thu Huong (2014) was 26%. Compared to the results of these authors, the obligate carriers determined rate in this study was higher.

On average, each pedigree had detected 3,3 obligate carriers, in which, the number of detected carriers in severe hemophilia family were lower than that of moderate and mild hemophilia family. The reason is in the severe hemophilia family, the number of these families had many deaths due to prolonged bleeding, quality of life of patients and relatives were low, thus affecting the reproductive decisions of other members.

#### 4.2.2.2. *Coordination of pedigree analysis, genetic analysis and ratio of FVIII/vWF:Ag to detect carrier*

##### a. *Genetic analysis*

Pedigree analysis was effectiveness method to determine obligate carriers and possible carrier in family.

By genetic analysis method, it is possible to diagnose exactly whether a possible carrier be carrier of non-carrier, which is the basis for the implementation of genetic counseling and prenatal diagnosis.

Table 3.8 and table 3.9 showed that, coordination of pedigree analysis and genetic analysis, there were 38 carriers have been determined, thus raising the number of diagnosed carrier was 367. However, in order to apply genetic analysis, it is necessary to have modern machinery and equipment as well as human resources for testing, so that the expense for testing is higher and the processing time is longer. In addition, if we using linkage analysis method, it also requires satisfying some conditions such as: information on RFLP makers, cooperation of family members in blood sampling. Therefore, coordination of other methods is very necessary in order to detect the maximum number of carriers.

##### b. *Analysis of ratio FVIII/vWF:Ag*

The ratio of FVIII/vWF:Ag in carriers if lower than that of non-carrier and it could be used to analysis of carrier gene hemophilia A.

Applied the cut-off 0,71 with the sensitivity 90% and specificity 78.3% in diagnosing for 159 possible carriers, there are 72 (45%) carriers had been diagnosed.

Genetic diagnostic results were used as a gold standard to determine gene carrying status for 88 eligible possible carriers, it showed that the ratio FVIII/vWF:Ag is right for 86,84% cases and misidentification of 4 cases accounted for 8%. This result is equivalent to the study of Shetty (India - 0,7) (1999), J. Padre (Philippine – 0,6)(2004), Veerle Labarque (Canada – 0,8)(2016) , T Ruchutrakool (Thailand – 0,82)(2006).

Thus, with the development of science and technology, there are many methods for hemophilia carrier diagnosing. Each method has its own advantages and disadvantages; therefore, the combination of other methods is extremely important to increase the rate of diagnosis of carriers hemophilia gene, especially in the current economic conditions of Vietnam.

Whatever the diagnosis, the first step is creating patient's pedigree to identify possible carriers. It depends on each patient as well as the conditions and equipment of each facility, and selects the appropriate diagnostic method.

### **4.3. Characteristics of newly diagnosed patients and carriers**

#### **4.3.1. Characteristics of new patients**

##### *4.3.1.1. Type of disease*

Most newly diagnosed patients have hemophilia A, except 1 case is hemophilia combined with congenital factor VII deficiency, 1 case is congenital factor VII deficiency and 1 case is hemophilia B. Two people with congenital factor VII deficiency were sibling, get factor VII deficiency gene from their father and mother, and one get hemophilia A gene from their mother. This is a very rare case that need consulting, managing and appropriate treatment. The patient with hemophilia B is the son of father with hemophilia A and mother who are hemophilia B gene carrier.

##### *4.3.1.2. Bleeding symptom and complications due to bleeding in new patients*

Most new patients have expressed some sorts of abnormal hemorrhage, of which most commonly seen is joints, muscles, skin hemorrhage and oral hemorrhage. Only 2 persons who have mild hemophilia account for 1,4% that have not presented with any abnormal bleeding, maybe because they haven't suffered from trauma, collision and surgery so that the bleeding symptom have not manifested.

Joints and muscles are the most common bleeding position as stated in research of Vu Thi Minh Chau (2001), Nguyen Anh Tri (2005), Marilyn Manco – Jhonson (2016). The rate of skin and oral hemorrhage is relatively high, 57,3% và 55,3% of the cases, which is different from bleeding rate in research by Vu Thi Minh Chau and Nguyen Anh Tri on patients in hospitals. The reason is the difference in the method to record the bleeding signs. With patients in hospitals, signs of bleeding is the reason for patients to go for diagnosis and treatment while in our research, signs of bleeding is the position where patients have suffered from bleeding. Brain and gastrointestinal hemorrhage in this research only accounts for a small amount, maybe because these bleedings are dangerous and patients usually cannot survive without proper treatment.

Amyotrophy, joint deformity, limited mobility are the consequences of repeated bleeding in muscles and joints without adequate treatment. Up to 25% of new patients have been diagnosed with joint deformity, and 21% are amyotrophy. These complications were seen in severe patient. In compared with joints and muscles complications on patients on demand treated in hospitals, this rate is lower than 60,5% according to Vu Thi Minh Chau (2001), 58,97% according to Tran Thi Phuong Tuy (2009) and 61-71% according to Soon Ki Kim (2016), of which the reason was that the rate of severe patients in our research is lower than that of other researches.

##### *4.3.1.6. Characteristics of blood tests of new patients*

Normally, all of hemophilia patients have prolonged APTT while other indicators including PT, APTT, TT, fibrinogen, platelet count are in normal range. All of newly diagnosed patients in our research had similar characteristic of coagulation test, only two patients (a patient with FVII deficiency and a patient affected by hemophilia A combine with FVII deficiency) have had prolonged PT. All patients

have results negative with mix test (that mean no inhibitor), this was appropriate because fewer patients are treated with blood products. The level of factor VIII/IX less than 40% was the typical standard to diagnose hemophilia. All hemophilia A patients had low level of factor VIII with median of 0,9%. The level of factor VIII among patients within a family was almost the same, however, such level had the tendency to worsen in elders in mild and moderate patients' families as well as bleeding symptoms were not completely similar among family members. It could be explained by the fact that the level of factor VIII/IX in plasma not only depends on F8/F9 gene but also is affected by other conditions such as age, physical activities, blood types, stress...

#### **4.3.2. Characteristics of carriers**

##### **4.3.2.1. Type of carrier**

Although all original patients have hemophilia A, we have discovered a women with combine hemophilia A and hemophilia B gene, her father is a severe hemophilia A and her mother is hemophilia B carrier. This is a case of the first carrier with combine hemophilia A and hemophilia B gene described in Vietnam, which is a very rare and is one of the only 3 cases described on the world. This carrier needs managing and counseling, especially genetic counseling.

##### **4.3.2.3. Characteristics of bleeding**

There were 80/235 (34%) of carriers that had abnormal bleeding with various expression, including 4 majority of bleedings occurred to the carriers: purpura, prolonged menstrual period, postpartum bleeding, oral bleeding. Such results also comply with results showed in Paroskie (2014), Eveline P. Mauser-Bunschoten (2008) and Miesbach (2011).

Comparing to male patients, hemophilia carrier in this research were less likely to have joint and muscular bleeding (7,5% and 8,8%). There were 2 cases of post-operative hemorrhage, one of which had bleeding after rectal polyps removal surgery and had to use clotting factor concentrate. Paroskie (2015) stated that less than 10% of carriers need to be treated with factor concentrates to stop bleeding.

##### **4.3.2.4. Characteristics of testing results**

###### **a. APTT and Mix test**

Table 3.15 shows that there were 40 carriers (26,7%) with prolonged APTT, majority of which were mildly prolonged ( $1,25 < rAPTT < 1,5$ ).

All of them had results negative with mix test and the majority reason of prolonged APTT is low level of factor FVIII. This result was equivalent to that of Paroskie (2015).

###### **b. Level of factor VIII**

Level of factor VIII in hemophilia A carriers was  $52,6 \pm 20,6\%$ , close to the floor level of normal range, which was similar to results showed in research of Iris Plug (2006), Paroskie (2015), Ay C (2010).

Table 3.16 showed that there were 40/150 carriers (26,7%) had level of FVIII less than 40%. These people are considered as mild hemophilia A patients and need to be managed and consulted closely. Such result is similar to that of Iris Plug (62/225 persons - 27,6%)(2006) but higher than that of Paroskie (1/34 person - 2,9%) (214).

Table 3.17 showed no differences in level of factor VIII among carriers with different level of hemophilia severity. This result was consistent with that of Iris Plug (2006) and Miesbach (2011) but different to that of E. Funding, et al. (2015).

*c. The correlation between bleeding and coagulation tests*

Table 3.18 showed that among 3 levels of factor VIII (< 40%, 40 – 60% and > 60%), if the carriers have levels of FVIII in lower range, they have higher risk of bleeding. Such result was consistent with results showed in research of others authors such as Iris Plug (2006), Paroskie (2014)... Iris Plug also recognized that people with level of factor VIII  $\leq$  40% were more menstrual bleeding and higher iron supplementation up to 80% than people with factor VIII > 60%. Besides, such people were also 3 times higher at risk post-operative bleeding than people with level of factor VIII > 40%. Therefore, carriers need to be carefully diagnosed, managed, counseled and coordinated treatment, avoiding unexpected complications caused by bleeding.

## CONCLUSION

Based on analysis of 100 hemophilia A patients' pedigree including 869 males and 533 females, we have come to conclusion as follows:

### 1. Identify new hemophilia patients and gene carriers

Pedigree analysis is an effective method to identify new patients and gene carriers in hemophilia patients' families.

#### 1.2. Identify new patients

Pedigree analysis helps identifying 147 hemophilia patients (16,9%). Regressive result also shows that 76 persons have died and suspected of hemophilia.

#### 1.3. Identify hemophilia gene carriers

- Through analyzing 533 females related to hemophilia, 367 carriers were identified, accounting for 68,9%, which includes:

- + 329 (61,7%) carriers identified by pedigree analysis,
- + 30 (5,6%) carriers identified by directed genetic analysis,
- + 8 (1,5%) carriers identified by PCR-RFLP with *BclI*.

- Ratio of FVIII/vWF:Ag < 0,71 has values in diagnosing the status of carrying hemophilia A gene with sensitivity 90% and specificity 78,3%.

Coordination of these methods helps improving effectiveness of detection carriers.

### 2. Characteristics of bleeding and coagulation test results of newly diagnosed patients and gene carriers

#### 2.1. Characteristics of new patients

- Almost (97,9%) cases were hemophilia A patients; 1 case is hemophilia A combined with congenital factor VII deficiency; 1 case is congenital factor VII deficiency and 1 case is hemophilia B. More than 50% of new patients were at severe hemophilia.

- Almost (98,6%) of new patients show prolonged bleeding. The most popular bleeding locations were joints, muscles, purpura and oral bleeding with proportion was 70%, 69,3%, 57,3% và 55,3%, respectively.

## 2.2. *Characteristics of carriers*

Almost (99,7%) cases were hemophilia A gene carriers, 1 case is a carrier for both hemophilia A and hemophilia B.

The bleeding rate of carrier is 34%. Most common bleeding types were purpura, menstrual bleeding, postpartum hemorrhage and oral bleeding.

The level of FVIII of carrier is lower than that of non-carrier ( $p < 0.05$ ). If the carrier has lower levels of factor VIII, they have a higher risk of bleeding. There is no difference in the level of factor VIII among hemophilia gene carriers with different level of severity.

There were 40 carriers (26.7%) had FVIII  $< 40\%$  considered as mild hemophilia A.

### **RECOMMENDATION**

1. Identifying new hemophilia patients and carriers using analysis of diagnosed patients' pedigree should be applied on national scale because of the effectiveness and broad applicability of this method.

2. It is necessary to promote the propaganda and training for patients as well as their family in diagnosis, treatment and managing the spread of affected gene, contributing to improve our future generation.

3. All obligate and possible carriers should do factor VIII assay. If their level of factor VIII is less than 40%, they should be treated as patients with mild hemophilia A.

## LIST OF PUBLIC SCIENTIFIC WORKS RELATED TO THE DISSERTATION

### I. PUBLISHED ON DOMESTIC JOURNAL

1. Nguyen Anh Tri, **Nguyen Thi Mai**, Nguyen Thi Nu, Ngo Huy Minh, Luu Thi Ha, (2012), “ Detection of hemophilia by pedigree analysis of diagnosed patient who managed at National Institute of Hematology and Blood Transfusion”, *Vietnam Medical Journal*, No. 8/2012, pp 566-571
2. Nguyen Hoang Ha, Nguyen Thi Nu, **Nguyen Thi Mai**, Nguyen Anh Tri, 2014, " Characteristics and tests of hemophilia carrier in National Institute of Hematology and Blood Transfusion", *Journal of Medicine Vietnam*, Vol 423, pages 139-143.
3. **Nguyen Thi Mai**, Vu Thi Bich Huong, Nguyen Anh Tri, Bach Quoc Khanh, 2016, Detection of the first hemophilia A patient combined with hemophilia B gene in Vietnam, *Vietnam Journal of Medicine*, vol 446, p 404 – 408

### II. PUBLISHED ON INTERNATIONAL JOURNAL

1. **T. Nguyen**, A. Nguyen, T. Nguyen, H. Ngo and T. Luu (2012). Hemophilia patient outreach: Experience of Vietnam, *Haemophilia*, 18 (Suppl. 3), 76 (Abstract)  
(Author Nguyen Thi Mai was writed as **T.Nguyen**)
2. Nguyen Hoang Ha, Nguyen Thi Nu, **Nguyen Thi Mai**, Nguyen Anh Tri, (2014). Characteristics of hemophilia carriers in clinic and testing in National Institute of Hematology and Blood Transfusion, Hanoi, Vietnam, *Haemophilia*, 20 (Suppl. 3), 8. (Abstract)