

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



NGÔ THỊ THẢO

**NGHIÊN CỨU ĐỘT BIẾN GEN G6PD  
Ở MỘT SỐ DÂN TỘC MIỀN BẮC VIỆT NAM**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC**

**HÀ NỘI – 2023**

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

-----\*\*\*-----

NGÔ THỊ THẢO

**NGHIÊN CỨU ĐỘT BIẾN GEN G6PD  
Ở MỘT SỐ DÂN TỘC MIỀN BẮC VIỆT NAM**

Chuyên ngành : Huyết học và Truyền máu

Mã số : 9720107

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC**

**Người hướng dẫn khoa học:**

**PGS.TS. Trần Văn Khánh**

**HÀ NỘI - 2023**

## LỜI CẢM ƠN

Trong thời gian học tập và làm luận văn, em đã nhận được sự quan tâm, giúp đỡ của rất nhiều các thầy cô, gia đình, bạn bè, nhà trường và bệnh viện.

Trước tiên, Em xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến thầy hướng dẫn **PGS.TS.Trần Văn Khánh** – Phó Giám đốc Trung tâm Nghiên cứu Gen – Protein, Trường Đại học Y Hà Nội đã tận tình giảng dạy, hướng dẫn em hoàn thiện kỹ năng khoa học, cho em cơ hội được thực hiện đề tài tại trung tâm và tạo mọi điều kiện thuận lợi để giúp em hoàn thành luận văn.

Em xin gửi lời cảm ơn chân thành đến **Ths. Lê Thị Phương** và các anh chị em tại Trung tâm nghiên cứu Gen – Protein đã tận tình chỉ bảo, quan tâm, chia sẻ cho em những kinh nghiệm quý báu trong suốt quá trình thực hiện nghiên cứu.

Em xin gửi lời cảm ơn tới tập thể anh chị công tác tại Khoa Xét nghiệm, Khoa sinh hóa - Bệnh viện Nhi Trung Ương đã giúp đỡ em trong quá trình thu thập mẫu.

Em cũng xin gửi lời cảm ơn tới: Ban Giám hiệu, Phòng đào tạo Sau đại học, Bộ môn Huyết học Truyền máu, Trường Đại học Y Hà Nội, Ban Giám đốc Bệnh viện Nhi Trung Ương đã giúp đỡ, tạo điều kiện cần thiết để em hoàn thành công việc.

Cuối cùng, em xin ghi nhớ tình yêu thương và sự hi sinh của gia đình, cùng sự ủng hộ của đồng nghiệp Trường Đại học Kỹ thuật Y tế Hải Dương, bạn bè những người đã luôn ở bên động viên, tạo điều kiện giúp em hoàn thành luận văn này.

*Hà nội, ngày .... tháng ... năm 2023*

**Học viên**

**Ngô Thị Thảo**

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Ngô Thị Thảo, nghiên cứu sinh khoá 33, chuyên ngành Huyết học Truyền máu, Trường Đại học Y Hà Nội, xin cam đoan:

1. Đây là luận văn do tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của PGS.TS.Trần Văn Khánh.
2. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố tại Việt Nam.
3. Các số liệu và thông tin trong nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm về những cam kết này.

*Hà Nội, ngày.... tháng ..... năm 2023*

**Tác giả**

**Ngô Thị Thảo**

## MỤC LỤC

<b>ĐẶT VẤN ĐỀ .....</b>	<b>1</b>
<b>Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU .....</b>	<b>3</b>
1.1. Tổng quan về enzyme G6PD .....	3
1.1.1. Đặc điểm cấu trúc của enzyme G6PD.....	3
1.1.2. Chức năng của enzyme G6PD .....	4
1.2. Bệnh thiếu enzyme G6PD .....	6
1.2.1. Đặc điểm lâm sàng và sinh lý bệnh thiếu enzyme G6PD .....	7
1.2.2. Triệu chứng cận lâm sàng và các xét nghiệm xác định chẩn đoán G6PD.....	12
1.2.3. Phân loại .....	14
1.2.4. Chẩn đoán.....	16
1.2.5. Điều trị và phòng bệnh.....	18
1.3. Đặc điểm di truyền, đột biến gen G6PD.....	19
1.3.1. Đặc điểm di truyền.....	19
1.3.2. Đặc điểm về gen và đột biến gen G6PD .....	23
1.3.3. Phân bố dạng đột biến theo địa lý .....	28
1.4. Các phương pháp sinh học phân tử phát hiện đột biến G6PD.....	30
1.4.1. Phương pháp PCR (Polymerase chain Reaction).....	31
1.4.2. Giải trình tự gen (DNA sequencing).....	34
1.5. Tổng quan tình hình nghiên cứu trên thế giới và Việt Nam.....	37
1.5.1. Trên thế giới .....	37
1.5.2. Tại Việt Nam.....	39
<b>Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>41</b>
2.1. Đối tượng nghiên cứu .....	41
2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu .....	42
2.3. Phương pháp nghiên cứu .....	42
2.3.1. Thiết kế nghiên cứu.....	42

2.3.2. Cỡ mẫu nghiên cứu .....	42
2.3.3. Chỉ số và nội dung nghiên cứu.....	43
2.4. Vật liệu và các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu .....	46
2.4.1. Vật liệu .....	46
2.4.2. Các kỹ thuật xét nghiệm trong nghiên cứu .....	46
2.5. Phân tích và xử lý kết quả.....	54
2.6. Các sai số và biện pháp khắc phục: .....	55
2.7. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu .....	55
<b>CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....</b>	<b>57</b>
3.1. Một số đặc điểm chung của nhóm nghiên cứu .....	57
3.1.1. Đặc điểm về tuổi và giới .....	57
3.1.2. Đặc điểm về địa dư.....	58
3.1.3. Đặc điểm về dân tộc .....	59
3.1.4. Đặc điểm về các chỉ số hồng cầu .....	59
3.2. Xác định các đột biến gen G6PD.....	60
3.2.1. Kết quả tách chiết DNA .....	60
3.2.2. Kết quả chạy PCR khuếch đại các exon.....	60
3.2.3. Kết quả giải trình tự gen xác định đột biến.....	62
3.3. Phân tích đột biến gen G6PD ở một số gia đình bệnh nhi.....	76
3.3.1. Một số đặc điểm địa dư, dân tộc của các gia đình .....	76
3.3.2. Tỷ lệ thiếu enzyme và đột biến gen G6PD các gia đình .....	77
3.3.3. Đặc điểm các loại đột biến với nồng độ enzyme và kiểu di truyền gen G6PD trong các gia đình:.....	79
<b>Chương 4: BÀN LUẬN.....</b>	<b>86</b>
4.1. Một số đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu.....	86
4.1.1. Đặc điểm về tuổi, giới, địa dư và dân tộc .....	86
4.1.2. Đặc điểm các chỉ số hồng cầu .....	91
4.2. Xác định các đột biến gen G6PD.....	92
4.2.1. Kết quả tách chiết DNA .....	92

4.2.2. Kết quả phản ứng PCR khuếch đại các exon .....	93
4.2.3. Kết quả giải trình tự gen xác định đột biến .....	95
4.3. Phân tích đột biến gen G6PD ở một số gia đình.....	124
4.3.1. Một số đặc điểm địa dư, dân tộc của các gia đình .....	124
4.3.2. Phát hiện thiếu enzyme và đột biến gen G6PD các gia đình .....	124
4.3.3. Đặc điểm về nồng độ enzyme và di truyền các biến thể của gen G6PD trong các gia đình:.....	126
<b>KẾT LUẬN .....</b>	<b>131</b>
<b>KIẾN NGHỊ .....</b>	<b>132</b>
<b>DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU ĐÃ CÔNG BỐ</b>	
<b>LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN</b>	
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO</b>	
<b>PHỤ LỤC</b>	

## DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

5'UTR	Untranslation Region	Vùng không dịch mã
AHA	Acute Haemolytic Anaemia	(Thiếu máu tan máu cấp)
ARMS	Amplification Refractory Mutation System	(Hệ thống khuếch đại các đột biến bền với nhiệt)
CNSHA	Chronic 'non-spherocytic' haemolytic anaemia	Thiếu máu tan máu mạn không có hồng cầu hình cầu
CQ	Chloroquine	
CS		Cộng sự
dATP	Deoxy adenosine triphosphate	
dCTP	Deoxy cytidine triphosphat	
ddNTP	Dideoxy nucleotide triphosphat	
dGTP	Deoxy guanosine triphosphat	
DNA	Deoxyribonucleic acid	
dNTP	Deoxy nucleotide triphosphat	
dTTP	Deoxy thymidine triphosphat	
DHT		Dị hợp tử
ĐHT		Đồng hợp tử
EDTA	Ethylen diamin tetraacetic acid	
F	Forward	Mũi xuôi
G6P	Glucose – 6 - phosphat	
G6PD	Glucose - 6 - phosphatase dehydrogenase	
GMS	Greater Mekong Subregion	Các nước Tiểu vùng Sông Mekong mở rộng
GPx, GSHPx	Glutathion peroxidase	
GR	Glutathion reductase	
GSH		Glutathione dạng khử
GSSG		Glutathione dạng oxi hóa
HC		Hồng cầu



HCQ	Hydroxychloroquine	
Hemi	Hemizygous	Nam giới chỉ có một alen
Hete	Heterozygous	Nữ giới dị hợp tử
Homo	Homozygous	Nữ giới đồng hợp tử
ICD	International Classification Diseases	Phân loại bệnh tật Quốc tế
KSTSR		Ký sinh trùng sốt rét
MetHbR		Methemoglobin reductase
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5- Diphenyltetrazolium Bromide	
NADP+	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	(dạng oxy hóa)
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	(dạng khử)
NST		Nhiễm sắc thể
PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng khuếch đại gen
PPP	Pentose Phosphate Pathway	Con đường Pentose
R	Reverse	Mỗi ngược
SLSS		Sàng lọc sơ sinh
SNP	Single nucleotid polymorphisms	Đa hình chuỗi đơn
SR		Sốt rét
SSCP	Single -Strand Conformation Polymorphism analysis	Phân tích cấu trúc đa hình thái chuỗi đơn
TP HCM		Thành phố Hồ Chí Minh
WHO	World Health Organization	Tổ chức Y tế Thế giới

## DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Phân loại của tổ chức Y tế thế giới dựa vào hoạt độ enzyme và biểu hiện lâm sàng .....	15
Bảng 1.2. Các liên kết kiểu gen và các kiểu hình G6PD trên NST X. ....	21
Bảng 1.3. Danh sách các đột biến G6PD được mô tả gần đây đưa .....	26
Bảng 1.4. Các dạng đột biến G6PD hay gặp vùng khu vực Châu Á .....	30
Bảng 2.1. Khoảng tham chiếu các xét nghiệm dòng hồng cầu .....	44
Bảng 2.2. Các trình tự môi dùng để khuếch đại 13 exon .....	51
Bảng 2.3. Thành phần phản ứng PCR.....	52
Bảng 2.4. Thành phần phản ứng giải trình tự gen.....	53
Bảng 3.1. Đặc điểm về tuổi và giới của nhóm nghiên cứu .....	57
Bảng 3.2. Đặc điểm về địa dư của các đối tượng nghiên cứu .....	58
Bảng 3.3. Các chỉ số HC ở các trẻ thiếu hụt G6PD .....	59
Bảng 3.4. Tỷ lệ các loại đột biến được phát hiện.....	63
Bảng 3.5. Xác định tỷ lệ sự kết hợp giữa các đột biến của gen G6PD .....	64
Bảng 3.6. Tỷ lệ đột biến phân bố theo các dân tộc tại khu vực miền Bắc .....	72
Bảng 3.7. Phân loại mức độ thiếu hụt G6PD của nhóm nghiên cứu .....	73
Bảng 3.8. Kết quả xác định đột biến gen G6PD theo phân lớp và hoạt độ enzyme ....	74
Bảng 3.9. Các dạng đột biến của gen G6PD với hoạt độ của enzyme theo kiểu gen ....	75
Bảng 3.10. Đặc điểm địa dư, dân tộc của các gia đình .....	76
Bảng 3.11. Tỷ lệ phát hiện thiếu enzyme và đột biến gen G6PD của các gia đình ..	77
Bảng 3.12. Tỷ lệ phát hiện thiếu enzyme G6PD và đột biến của thế hệ ông bà.....	78
Bảng 3.13. Bảng tổng hợp về các loại đột biến theo kiểu di truyền gen .....	79
Bảng 3.14. Bảng phân bố các kiểu di truyền theo các thế hệ.....	81
Bảng 4.1. So sánh sự phân bố các dạng đột biến G6PD phổ biến ở các các Đông Á và Đông Nam Á theo khu vực sinh sống trong những nghiên cứu gần đây ...	97
Bảng 4.2. So sánh các loại đột biến ở nghiên cứu của chúng tôi với các nghiên cứu trước đây .....	100
Bảng 4.3. So sánh sự xuất hiện các đột biến trên các dân tộc với các nghiên cứu tại VN 115	
Bảng 4.4. Bảng thống kê sự phân bố các dạng đột biến G6PD phổ biến theo các nhóm tộc chính của các nước khu vực Đông Nam Á trong những nghiên cứu gần đây .....	116

## DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 1.1. Cấu trúc tinh thể của enzyme G6PD.....	4
Hình 1.2. Chức năng của G6PD trong HC.....	4
Hình 1.3. Vị trí gen G6PD trên NST X.....	23
Hình 1.4. NST X và phân bố các đột biến trong gen G6PD. <sup>25</sup> .....	24
Hình 1.5. Các biến thể phổ biến và phân loại trong gen G6PD <sup>77</sup> .....	25
Hình 1.6. Phân bố các biến thể G6PD hay gặp trên thế giới <sup>63</sup> .....	28
Hình 1.7. Các dạng đột biến G6PD hay gặp ở vùng Đông Nam Á <sup>78</sup> .....	29
Hình 1.8. Các giai đoạn của phản ứng PCR.....	31
Hình 1.9. Cấu trúc của ddNTP .....	34
Hình 1.10. Giải trình tự gen trên máy giải trình tự gen tự động .....	36
Hình 1.11. Hình ảnh giải trình tự gen trên máy giải trình tự gen tự động .....	37
Hình 2.1. Sơ đồ thiết kế cặp mồi cho các exon trên gen G6PD.....	50
Hình 3.1. Hình ảnh PCR đại diện khuếch đại exon 9, 10 của gen G6PD.....	60
Hình 3.2. Hình ảnh PCR đại diện khuếch đại exon 11, 12 của gen G6PD.....	61
Hình 3.3. Hình ảnh PCR đại diện khuếch đại cặp mồi F9F-9R của gen G6PD.....	61
Hình 3.4. Hình ảnh giải trình tự đột biến Gaohe trên exon 2 của gen G6PD .....	65
Hình 3.5. Hình ảnh giải trình tự đột biến Orissa trên exon 2 của gen G6PD .....	65
Hình 3.6. Hình ảnh giải trình tự đột biến Quing Yan trên exon 5 .....	66
Hình 3.7. Hình ảnh giải trình tự đột biến Valladoid trên exon 5 .....	66
Hình 3.8. Hình ảnh giải trình tự đột biến G6PD NanKang trên exon 5 .....	67
Hình 3.9. Hình ảnh giải trình tự đột biến G6PD Địa Trung Hải trên exon 5.....	67
Hình 3.10. Hình ảnh giải trình tự đột biến Coimbra Shunde trên exon 5 .....	68
Hình 3.11. Hình ảnh giải trình tự đột biến Viangchan trên exon 9.....	68
Hình 3.12. Hình ảnh giải trình tự đột biến Chinese-5 trên exon 9.....	69
Hình 3.13. Hình ảnh giải trình tự đột biến Taiwan exon 9 của gen G6PD.....	69
Hình 3.14. Hình ảnh giải trình tự đột biến Union trên exon 11 .....	70
Hình 3.15. Hình ảnh giải trình tự đột biến Canton và Kaiping.....	70

Hình 3.16. Hình ảnh giải trình tự đột biến c.1311C>T trên exon 11 .....	71
Hình 3.17. Sơ đồ phả hệ gia đình bệnh nhân với lại đột biến Viangchang (c.871G>A) ông ngoại (Hemo) truyền cho mẹ (Hete), mẹ truyền cho con trai (Hemo).....	82
Hình 3.18. Hình ảnh giải trình tự đột biến Viangchan trên exon 9 của gen G6PD ở gia đình bệnh nhân số 5 .....	82
Hình 3.19. Sơ đồ phả hệ gia đình bệnh nhân 11 với lại đột biến dạng Kaiping (c.1388G>A) bà ngoại DHT (Hete) truyền cho mẹ DHT, mẹ truyền cho con trai (Hemo).....	83
Hình 3.20. Hình ảnh giải trình tự đột biến Kaiping trên exon 9 của gen G6PD ở gia đình bệnh nhân số 35 .....	83
Hình 3.21. Sơ đồ phả hệ gia đình bệnh nhân với lại đột biến dạng Viangchan (c.871G>A) bà nội (Đã mất) truyền cho bố (Hemi), bố truyền cho con gái (Hete) và cả con trai (Hemi).....	84
Hình 3.22. Hình ảnh giải trình tự đột biến Viangchan trên exon 9 của gen G6PD ở gia đình bệnh nhân số 24 .....	84
Hình 3.23. Sơ đồ phả hệ gia đình bệnh nhân với lại đột biến dạng Union (c. 1360 C>T) cả ông ngoại (Hemi) và bà ngoại (Hete) truyền cho con gái (Homo), mẹ truyền cho cả con gái (Hete) và cả con trai (Hemi).....	85
Hình 3.24. Hình ảnh giải trình tự đột biến Union trên exon 11 của gen G6PD ở gia đình bệnh nhân số 239 .....	85
Hình 4.1. Vị trí các dạng đột biến trên gen G6PD .....	123

## **DANH MỤC SƠ ĐỒ, BIỂU ĐỒ**

Sơ đồ 1.1. Nguyên lý của kỹ thuật Formazan bán định lượng. ....	13
Sơ đồ 1.2. Di truyền của bệnh thiếu G6PD.....	19
Biểu đồ 3.1. Đặc điểm về dân tộc của các đối tượng nghiên cứu .....	59
Biểu đồ 3.2. Tỷ lệ bệnh nhân có đột biến gen G6PD trên các exon .....	62

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Glucose 6 phosphatase dehydrogenase (G6PD, EC 1.1.1.49) là enzyme oxy hoá khử nằm trên bề mặt hồng cầu (HC), có vai trò then chốt trong chu trình pentose phosphat (PP). G6PD oxy hoá Glucose 6 - Phosphate (G6P) thành 6 Phospho Gluconolactone (6-PG) và khử Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADP) thành NADP dạng xúc tác ( $\text{NADPH}^+$ ), là một co-enzyme quan trọng bảo vệ các tế bào hồng cầu (HC) khỏi các gốc oxy<sup>1-4</sup>. Thiếu hụt G6PD là bệnh lý enzyme phổ biến nhất ở người và có gánh nặng dịch tễ học lớn nhất trên toàn thế giới<sup>5</sup>. Phần lớn bệnh nhân với các biến thể G6PD không có triệu chứng lâm sàng trong suốt cuộc đời của họ ngoại trừ, do vậy, người thiếu G6PD không biết mình mắc bệnh, trừ khi gặp các tác nhân oxy hoá như thức ăn, thuốc, nhiễm trùng, hoá chất,...Biến chứng nặng nề nhất ở người thiếu G6PD là gây tan máu cấp tính có thể dẫn đến tử vong. Đặc biệt ở trẻ sơ sinh có thể liên quan đến tăng nguy cơ mắc bệnh vàng da sơ sinh và bệnh não do tăng bilirubin. Việc quản lý hiệu quả nhất sự thiếu hụt G6PD là ngăn chặn tan máu bằng cách tránh các tác nhân oxy hóa nên đòi hỏi bệnh nhân cần nhận thức được về tình trạng thiếu hụt enzyme này<sup>1-3</sup>.

Glucose 6 phosphatase dehydrogenase được mã hóa bởi gen G6PD nằm trên nhánh dài, vùng 2, băng 8 của nhiễm sắc thể (NST) giới tính X (Xq28). Vì vậy, sự di truyền của sự thiếu G6PD cho thấy một kiểu liên kết NST X điển hình với nam giới bị bệnh sẽ luôn là dị hợp tử, còn lại nữ giới có thể dị hợp tử hoặc hiếm hơn là đồng hợp tử. Nữ dị hợp tử là sự ghép gen do bất hoạt NST X nên hoạt động enzyme có thể dao động từ bình thường hoặc thiếu, khiến cho việc chẩn đoán sẽ gặp nhiều khó khăn<sup>6</sup>. Các đột biến phân bố trên khắp gen G6PD có thể dẫn đến thay thế axit amin và sau đó là các biến thể protein với các mức độ hoạt động của enzyme<sup>2,7</sup>. Khoảng hơn 217 biến thể di truyền trong gen G6PD đã được báo cáo trong cơ sở dữ liệu, phần lớn trong số đó là các đột biến sai lệch với một sự thay thế bazơ duy nhất và được Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) phân loại thành năm loại dựa trên hoạt tính của enzyme còn lại và các biểu hiện lâm sàng<sup>8</sup>. Tỷ lệ mắc bệnh và phân bố và các loại biến thể G6PD có liên quan đến các vị trí địa lý cụ thể và các nhóm dân tộc

khác nhau, gặp nhiều ở lưu hành bệnh sốt rét (SR) như lưu vực Địa Trung Hải, Trung Đông, Châu Phi và Châu Á. Tại Châu Á, tỷ lệ mắc và phân bố gặp nhiều quốc gia, đặc biệt các nước nằm trong khu vực Tiểu vùng sông Mê Kông mở rộng (GMS)<sup>9-11</sup>, trong đó có Việt Nam khoảng 2-31% cũng thay đổi tùy theo dân tộc và khu vực<sup>11-14</sup>.

Có ít nhất 8 đột biến phổ biến khác nhau đã được xác định trong dân số Việt Nam rất khác nhau giữa các khu vực hoặc dân tộc, các đột biến này đa phần là thuộc các exon trọng điểm trên ở các nước châu Á<sup>15-18</sup>. Mặc dù các nghiên cứu trước đây đã chứng minh rằng tỷ lệ thiếu enzyme G6PD ở Việt Nam rất khác nhau giữa các khu vực hoặc dân tộc, phổ đột biến của bệnh trong dân số Việt Nam đã được khảo sát nhưng những nghiên cứu này chỉ bao gồm một số lượng nhỏ người và bị giới hạn về mặt địa lý. Thông tin liên quan đến đặc điểm phân tử của G6PD ở Việt Nam cho đến nay vẫn còn rời rạc. Rất ít khảo sát dịch tễ học phân tử trên toàn quốc về tình trạng thiếu enzyme G6PD được báo cáo và cho đến nay, không có nghiên cứu nào về mối tương quan giữa các đột biến G6PD cụ thể và kiểu hình hoạt động G6PD được báo cáo. Nhằm củng cố thêm chẩn đoán chính xác bệnh đặc biệt là các trường hợp nữ dị hợp tử và đóng góp vào cơ sở dữ liệu về nghiên cứu bệnh thiếu enzyme G6PD tại Việt Nam trên nhóm dân tộc khác nhau, giúp cho chẩn đoán người lành mang bệnh, tư vấn di truyền trước sinh nhằm giảm tỉ lệ mắc bệnh, giảm hậu quả cho gia đình bệnh nhân và xã hội, nâng cao chất lượng chăm sóc sức khỏe trong cộng đồng, chúng tôi tiến hành đề tài “**Nghiên cứu đột biến gen G6PD ở một số dân tộc miền Bắc Việt Nam**” với mục tiêu:

- 1. Xác định đột biến của gen G6PD ở bệnh nhân thiếu hụt enzyme G6PD thuộc một số dân tộc miền Bắc Việt Nam bằng kỹ thuật giải trình tự gen.*
- 2. Phân tích đột biến gen G6PD ở một số gia đình bệnh nhi thiếu hụt của nhóm nghiên cứu.*

## Chương 1

### TỔNG QUAN TÀI LIỆU

#### 1.1. Tổng quan về enzyme G6PD

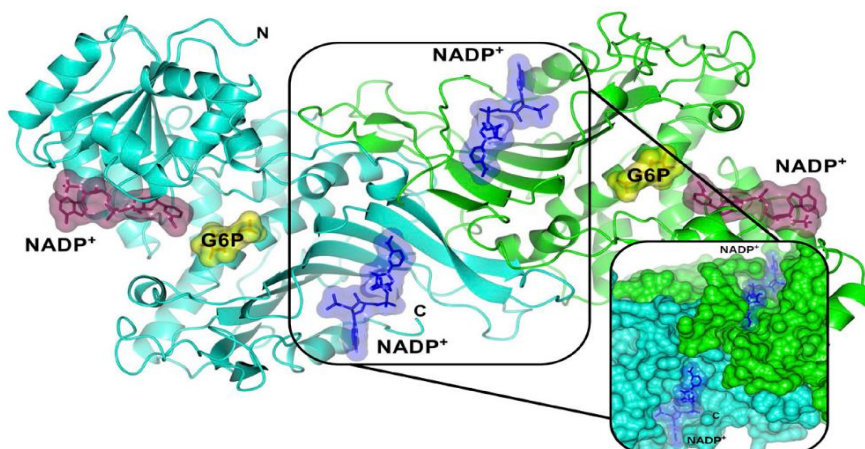
##### 1.1.1. Đặc điểm cấu trúc của enzyme G6PD

Glucose 6 phosphatase dehydrogenase (EC 1.1.1.49) là một enzyme liên kết X có mặt trong tất cả các hình thức của sự sống. G6PD được phát hiện vào năm 1930 trên HC ngựa và sau đó trên một số HC của động vật khác bởi hai tác giả Otto Warburg và Christian trên vi sinh vật, enzyme bia và HC người<sup>19</sup>. Giai đoạn này, các nghiên cứu về G6PD thường tập trung vào các điều tra cơ bản, chủ yếu là hoạt độ xúc tác, độ di chuyển qua phân tích điện di và một số đặc tính enzyme của chúng. Quá trình tinh khiết G6PD được bắt đầu nghiên cứu vào năm 1936, nhưng mãi 25 năm sau G6PD mới được phân lập và tinh khiết thành công từ enzyme bia. Đến năm 1966, Yoshida và cộng sự mới tách chiết được G6PD từ HC người. Từ đó, những thông tin ban đầu về cấu trúc, trọng lượng phân tử và các thông số động học của G6PD mới dần được làm sáng tỏ<sup>20</sup>.

Glucose 6 phosphatase dehydrogenase có hai đặc tính là tính không đồng nhất và tính chuyển dạng phân tử. Điểm đặc biệt là G6PD có thể dưới nhiều dạng khác nhau như monomer, dimer, trimer, tetramer, hexamer, bao gồm 1, 2, 3, 4 hoặc 6 chuỗi polypeptide. Các cấu trúc này có thể chuyển dạng lẫn nhau trong *invitro*. Cấu trúc bậc hai dạng monomer của G6PD có dạng xoắn  $\alpha$  nhưng gần như không xuất hiện ở điều kiện sinh lý. Hai dạng hoạt động chủ yếu là dimer và tetramer, dạng dimer chuỗi kép, bên trong có cầu nối NADP<sup>+</sup> chiếm ưu thế trong HC người. Sự biến đổi từ các monomer không hoạt động sang dạng hoạt động dimer, tetramer đòi hỏi phải có sự hiện diện của NADP<sup>+</sup>. Do đó, trong một enzyme hoạt động, NADP<sup>+</sup> vừa là thành phần cấu trúc nối hai monomer vừa là một chất tham gia phản ứng hóa học. Cấu trúc của enzyme này được quyết định bởi pH của môi trường<sup>20</sup>. Sự trùng hợp của các monomer thành các dimer và các dạng cao hơn có hoạt tính xúc tác cần sự có mặt của NADP<sup>+</sup>. NADP<sup>+</sup> được gắn với enzyme vừa như một phức hợp cấu trúc ổn định G6PD nhờ việc ngăn cản sự chuyển dạng enzyme từ dimer thành monomer không hoạt động, vừa như cơ chất của phản ứng, là chất cộng tác của enzyme G6PD. Trên mỗi dimer có hai vị trí gắn NADP<sup>+</sup>, tại vị trí gắn NADP chức năng, NADP gắn chặt chẽ hơn và cần thiết để duy trì cấu trúc oligo hoạt động của enzyme. Tính đồng nhất của trình tự acid amin thay đổi tùy theo



vùng. Vùng có tính đồng nhất cao được cho là vùng có chức năng quan trọng, ở người, vùng này thuộc acid amin 188-291<sup>21</sup> (Hình 1.1)



**Hình 1.1. Cấu trúc tinh thể của enzyme G6PD**

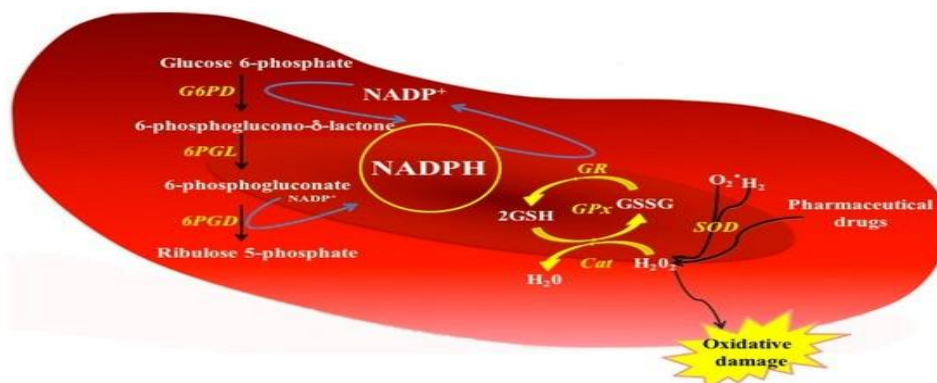
Ô bên trái: Cấu trúc monome NADP (màu lục lam và xanh lá cây); Cấu trúc dạng Dimer: NADP dạng phân tử (màu xanh); NADP<sup>+</sup> dạng xúc tác (màu tím); Chất nền G6P (màu vàng)

Ô bên phải: giao diện dimer và cả các phân tử cấu trúc NADP<sup>+</sup><sup>22</sup>.

### 1.1.2. Chức năng của enzyme G6PD

Glucose 6 phosphatase dehydrogenase là một enzyme oxy hóa khử, có chức năng xúc tác phản ứng đầu tiên của con đường Hexose monophosphat (HMP)-chu trình PP, nó oxy hoá G6P thành 6PG và chuyển NADP thành NADPH.

HMP là con đường cung cấp năng lượng không đáng kể nhưng duy nhất tạo ra NADPH trong HC và cả ribose 5-phosphat sử dụng cho quá trình tổng hợp acid nucleic. NADPH là một coenzyme khử, liên quan mật thiết với một chuỗi phản ứng để bảo vệ HC chống lại các tác nhân oxy hoá. NADPH hoạt động qua chuyển GSSG thành GSH với sự tham gia của enzyme glutathione reductase. GSH tạo thành sẽ ngăn cản quá trình peroxide của HC, trực tiếp bảo vệ HC khỏi các tác nhân oxy hóa<sup>23</sup>.



**Hình 1.2. Chức năng của G6PD trong HC.**

Trong hầu hết các tế bào của cơ thể, ngoài G6PD còn có một số enzyme xúc tác phản ứng dehydrogenase để tạo NADPH nên nếu thiếu G6PD trong một số trường hợp cũng không gây thiếu NADPH. Nhưng riêng trong HC thì hoàn toàn khác với các tế bào khác của cơ thể bởi các lý do sau. Thứ nhất, chức năng chính của HC là vận chuyển oxy và là nơi xảy ra nhiều quá trình chuyển hóa. Vì chứa nhiều oxy như vậy, nên HC thường xuyên có nguy cơ bị oxy hóa và nhạy cảm với các quá trình này, do đó chúng rất dễ bị hủy hoại. HC lại không chứa ty thể, do đó con đường PP là nguồn duy nhất để tạo NADPH, yếu tố then chốt bảo vệ HC làm giảm oxy hoạt động, chống lại sự hủy hoại tế bào từ các gốc tự do qua ba đường dẫn oxy hóa: glutathione, thioredoxin và chu trình glutaredoxin (Hình 1.2). Đầu tiên, điện tử của NADPH chuyển tới các glutathione dạng oxy hoá (GSSG) trong phản ứng xúc tác bởi enzyme glutathion reductase, tạo ra hai glutathion monomers dạng khử (GSH), phòng chống gốc tự do. Hơn nữa, peroxidase glutathione (GPX) loại bỏ peroxit từ HC bằng cách sử dụng GSH làm chất nền, trong khi NADPH được yêu cầu giảm GSSG oxy hóa và các nhóm sulfhydryl của một số protein cần thiết để bảo vệ chống lại sự oxy hóa. Các HC không thể loại bỏ được sự oxy hóa này sẽ bị vỡ và gây thiếu máu<sup>2</sup>. Toàn bộ những chuyển hóa trong HC phần lớn đều nhằm đảm bảo chức năng vận chuyển oxy và bảo vệ HC chống lại quá trình oxy hóa của các tác nhân khác nhau. Thứ hai, trong HC thiếu các con đường tổng hợp NADPH khác, nên sự chuyển hóa glucose theo con đường PP lại chiếm ưu thế<sup>24</sup>, trước một tác nhân oxy hoá bất ngờ thì sự giáng hoá glucose theo con đường này lại tăng lên gấp 20 - 30 lần thậm chí cao hơn nữa<sup>2,25</sup>. Mặt khác, Km của G6PD với NADP rất thấp, khoảng 2-4  $\mu\text{mol/l}$  và enzyme bị ức chế cạnh tranh mạnh bởi NADPH. Vì vậy, tỉ lệ NADPH/NADP trong HC tự điều hòa tốc độ của phản ứng enzyme. Trong thời kỳ trơ, tỉ lệ này rất cao và G6PD gần như bị ức chế hoàn toàn<sup>26</sup>.

Một cơ chế khác bảo vệ HC là: quá trình khử MetHb cùng đồng thời diễn ra nhờ hệ thống enzyme methemoglobin reductase (MetHbR) mà cần coenzyme là NADPH và NADH. Khi NADPH bị oxy hóa, GSSG bị khử thành GSH, NADPH chuyển thành NADP<sup>+</sup> và G6PD hoạt động, khử NADP<sup>+</sup> thành NADPH. Khi HC thiếu G6PD, con đường hexosemonophosphat bị ngừng trệ. NADPH sẽ không được tạo thành, dẫn đến GSH không đủ. Kết quả là việc bảo vệ HC không hiệu quả, HC dễ bị tấn công bởi các tác nhân oxy hóa, quá trình oxy hóa diễn ra rất mạnh và làm tăng quá trình peroxide hóa các cấu tử của nó. GSH sẽ càng không đủ cho nhu cầu của quá trình chuyển hóa, làm thay đổi chức năng màng HC và Hb bị biến tính. Hb bị oxy hóa thành

một hợp chất không bền với  $\text{HbH}_2\text{O}_2^-$  với hàm lượng khá cao và rất độc cho HC. Lúc này, lượng glutathion dạng khử vốn đã giảm, sẽ không còn đủ khả năng khử hợp chất này.  $\text{HbH}_2\text{O}_2$  sẽ bị chuyển thành MetHb và choleglobin. Thể Heinz xuất hiện do sự kết tủa của Hemoglobin, nó gắn vào màng HC gây nên hình thái bất thường của HC, gây vỡ HC cơ học. Thêm vào đó vì nếu thiếu G6PD nên lượng NADPH không đủ cũng làm giảm khả năng chống quá trình peroxy hóa lớp lipid màng tế bào, hiện tượng này cũng đóng góp vào cơ chế gây tổn thương màng làm vỡ HC<sup>27</sup>.

Như vậy, G6PD mở đầu và điều khiển tốc độ con đường PP bằng cách tạo ra NADPH để chống lại các tác nhân oxy hoá và vì vậy G6PD có ý nghĩa lớn trong việc bảo vệ màng HC, đảm bảo thời gian sống của HC, đáp ứng nhu cầu oxy của cơ thể<sup>2,25</sup>

## 1.2. Bệnh thiếu enzyme G6PD

Mô tả lâm sàng có hiện tượng tan máu do thuốc đầu tiên được ghi nhận vào cuối thế kỷ 19 bởi Mule-Bertolo. Và đồng thời những nhà triết học Hy Lạp và nhà toán học Pythagoras đã cảnh báo với những học trò của mình về mối nguy hiểm sau khi tiếp xúc với đậu fava (ăn hoặc hít phải) có biểu hiện vàng da và có hemoglobin niệu. Tiếp sau đó một nhóm các nhà y học ở miền nam Italia và Sardinia đã phác họa hình ảnh lâm sàng của *Favism* (tan máu xảy ra ở một số người sau khi ăn đậu fava) và đã thấy đa phần xảy ra ở nam giới có tính chất gia đình. Cho đến những năm 1950, nguyên nhân gây ra hiện tượng tan máu được giải thích rõ hơn về hiện tượng tan máu tương tự xảy ra sau khi dùng primaquine, một thuốc chống SR ở một nam giới người Châu Phi do bệnh *Plasmodium vivax*<sup>28</sup>. Sau đó, vào năm 1956 tác giả Alving AS, Carson PE với các đánh giá sâu hơn cho thấy hội chứng tan máu này có chung một nguyên nhân về sinh hoá những người nhạy cảm với PQ có hoạt độ của enzyme G6PD trong HC rất thấp<sup>20</sup>. Các nhà khoa học đã xác định các rối loạn của hội chứng trên có liên quan đến liên kết trên NST giới tính X. Sự nhạy cảm với primaquine cũng được ghi nhận ở nữ giới nhưng hội chứng lâm sàng khác với nam giới, tình trạng tan máu có thể không có triệu chứng lâm sàng mà chỉ được phát hiện qua các xét nghiệm<sup>29</sup>. Cho đến nay, những hiểu biết về enzyme G6PD và các hình thái lâm sàng cũng như cơ sở sinh học phân tử liên quan đến thiếu hụt G6PD đã được làm rõ<sup>2,9</sup>. Có nhiều biến thể, mỗi biến thể gây mức độ thiếu enzyme khác nhau và chúng liên quan đến mức độ nặng nhẹ của tan máu hoặc có thể không triệu chứng. Những kỹ thuật sinh học phân tử gần đây đã khám phá được cấu trúc gen bình thường, đột biến và phân tích được rõ các trình tự nucleotid và acid amin của G6PD người bình thường và cADN (comple-

enzymetary DNA) chỉ ra rằng phần lớn các đột biến phát sinh hầu hết từ sự thay thế axit amin đơn lẻ, dẫn đến giảm độ ổn định hoặc hiệu suất xúc tác của enzyme <sup>25</sup>.

### **1.2.1. Đặc điểm lâm sàng và sinh lý bệnh thiếu enzyme G6PD**

Những đối tượng thiếu enzyme G6PD thường phần lớn không có biểu hiện triệu chứng lâm sàng hoặc nếu có chỉ biểu hiện rất nhẹ trong suốt cuộc đời. Tuy nhiên, những người này khi tiếp xúc với các tác nhân oxy hóa như một số loại thuốc, hóa chất, thức ăn có tính oxy hóa cao, nhiễm toan ceton do đái tháo đường với nguy cơ nhiễm trùng <sup>30</sup> có thể dẫn đến các hội chứng chủ yếu là những cơn tan máu. Mức độ nghiêm trọng của biểu hiện lâm sàng thường tương ứng với mức độ rối loạn chức năng enzyme G6PD, kiểu đột biến và loại tác nhân có tính oxy hóa mạnh <sup>31</sup>.

Theo biểu hiện lâm sàng, sự thiếu hụt G6PD có thể được chia thành ba nhóm: Tan máu sơ sinh, thiếu máu tan máu và thiếu máu mạn tính <sup>2</sup>

#### **1) Vàng da sơ sinh**

Tình trạng thiếu máu tan máu và vàng da ở trẻ sơ sinh kéo dài là hai vấn đề nghiêm trọng mà trẻ thiếu enzyme G6PD gặp phải. Tan máu gây vàng da sơ sinh có thể với nhiều mức độ khác nhau <sup>32</sup>. Vàng da bệnh lý là triệu chứng lâm sàng nặng nhất của thiếu G6PD, đỉnh điểm từ 2-3 ngày sau khi sinh. Mức độ vàng da phụ thuộc vào mức độ tan máu <sup>2</sup>. Nguyên nhân là do vỡ HC, gây tăng bilirubin. Nếu bilirubin tự do tăng và ứ nhiều trong máu sẽ thấm vào não gây ra hội chứng vàng da nhân (còn gọi là *Kernicterus*), biểu hiện bởi các cơn tăng trương lực cơ, xoắn vặn, mất các phản xạ sơ sinh, ngừng thở tím tái và có thể dẫn tới tử vong. Nếu qua khỏi, có thể để lại tổn thương thần kinh vĩnh viễn, bất thường về giác quan hay những di chứng ảnh hưởng tới khả năng phát triển tinh thần và vận động của trẻ. Bệnh không điều trị được chỉ có thể phòng ngừa để tránh xảy ra <sup>33</sup>. Các biến chứng nghiêm trọng này không chỉ xảy ra ở trẻ trai dị hợp tử thiếu G6PD mà còn có thể xảy ra ở cả trẻ gái khi mang gen gây bệnh. Chính vì vậy việc sàng lọc sơ sinh về tình trạng thiếu enzyme G6PD được thực hiện thường quy ở các quốc gia là vô cùng cần thiết. Ngoài ra, một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng đột biến G6PD có thể liên quan đến hội chứng Gilbert tạo biến thể Uridine-Diphosphate-Glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1), gây ra suy giảm sự kết hợp giữa dịch mật và axit glucuronic, dẫn đến mức độ mật trong cơ thể rất cao (tăng bilirubin trong máu) càng dễ gây hội chứng *Kernicterus*.

## 2) Chứng tan máu, thiếu máu

Thiếu máu tan máu cấp tính là biểu hiện phổ biến và hay gặp nhất của thiếu hụt G6PD, có thể do nhiều nguyên nhân khác nhau nhưng hầu hết HC bị vỡ bởi hiện tượng oxy hoá do thức ăn hoặc do thuốc hoặc hiện tượng nhiễm trùng. Tuy thuộc vào mức độ tan máu mà có các triệu chứng khác nhau. Về lâm sàng: tan huyết cấp có thể gây đau lưng, đau bụng và vàng da thứ phát tăng bilirubine gián tiếp. Trong trường hợp chức năng gan bình thường, vàng da sẽ không xảy ra cho tới khi 50% số hồng cầu bị phá hủy. Kết quả nặng nhất của thiếu máu tan máu cấp là tan máu rất nặng gây suy thận cấp có thể gây tử vong<sup>2,34</sup>.

### *Tan máu do đậu tằm (Fava) có thể gây Hội chứng Favism*

Thiếu hụt G6PD với hội chứng Favism có thể xảy ra ở mọi lứa tuổi nhưng phổ biến và thường nghiêm trọng hơn ở trẻ em, thường gặp nhất ở trẻ em từ 2 đến 5 tuổi và trẻ trai gấp 2 đến 3 lần so với trẻ gái<sup>35</sup>.

Liên quan đến thức ăn, một số nghiên cứu và báo cáo trên thế giới chỉ tập trung đến đậu fava có thể dẫn đến tan máu đôi khi gây nghiêm trọng (hay còn gọi là hội chứng Favism). Là bệnh lý thiếu máu tan máu cấp tính xảy ra sau khi ăn đậu tằm vài giờ, đặc biệt là đậu xanh tươi. Nguyên nhân do thành phần trong đậu fava có chất *glycoside pyrimidine* (chủ yếu *convicine* và *vicine*), khi ăn đậu fava, *glycoside pyrimidine* qua quá trình thủy phân bởi glucosidase đường tiêu hoá gây giải phóng ra các *aglycone* (*divicine* và *isouramil*). Các hợp chất này có hoạt tính kháng nấm và như thuốc trừ sâu ngăn ngừa đậu bị thối nhưng lại có khả năng oxy hóa rất mạnh, khi vào cơ thể chúng gây giảm glutathion khử rất nhanh và mạnh. Vì thế, những bệnh nhân thiếu hụt G6PD khi ăn đậu tằm sẽ dẫn đến cơn tan máu cấp sau 24-48 giờ<sup>2</sup>. Cơn tan máu rất mạnh, gây vàng da, hemoglobin niệu, có thể dẫn tới suy thận cấp và tử vong. Đa số các trường hợp tan máu xảy ra ở những cá thể thiếu hụt G6PD nặng, đôi khi gặp ở những cá thể thiếu G6PD thể nhẹ. Bệnh Favism xảy ra ở những nơi có tần xuất thiếu enzyme G6PD cao và đậu Fava là loại thực phẩm phổ biến như Nam Âu, Trung Đông, Đông Nam Á<sup>20</sup>. Đậu Fava được trồng phổ biến ở Địa Trung Hải, Trung Đông đến tận Iran và ở Đông Nam Á nhưng không được trồng ở các nước châu Phi nhiệt đới. Trong một báo cáo gần đây từ rải Gaza, đậu Fava là món ăn ưa thích của người dân nơi đây nên trong số 80 trẻ em thiếu G6PD với triệu chứng tan máu có đến 65 trường hợp có là do ăn đậu Fava<sup>36</sup>. Một số tác giả cho rằng sự tan máu cũng có thể xảy ra khi bệnh nhân thiếu G6PD hít phải phấn hoa trong đậu Fava và có biểu hiện như một phản ứng dị ứng, điều này

không chính xác vì các hóa chất hiện diện ở nồng độ cao trong đậu fava như *vicine* và *convicine*, là các *glycoside pyrimidine* không bay hơi mà chỉ tạo ra các gốc tự do. Các *glycoside* này không có trong các loại đậu khác vì vậy các bác sĩ cần tránh nhầm lẫn để có thể tư vấn tốt, an toàn cho người thiếu enzyme G6PD trong ăn uống<sup>2</sup>. Tình trạng tan máu có thể xảy ra khi thai nhi thiếu enzyme G6PD còn trong bụng mẹ mà có tiếp xúc thụ động với đậu fava. Nhưng thực tế rất hiếm gặp các trường hợp này mà chủ yếu xảy ra khi đứa trẻ được sinh ra<sup>7</sup>. Chỉ có hiện tượng tan máu sau sinh có thể xảy ra khi đứa trẻ bú sữa mẹ sau khi mẹ ăn đậu Fava là nguyên nhân được công nhận rõ nhất<sup>37</sup>.

Ngoài ra các món ăn cổ điển bao gồm rượu vang đỏ (sulfites), nước bồ (quinine) và tinh dầu bạc hà cũng được nói đến gây tan máu ở bệnh nhân thiếu G6PD trong các nghiên cứu<sup>38</sup>. Sự tan máu cũng đã được ghi nhận khi các bệnh nhân thiếu G6PD tiếp xúc với phấn hoa, loài thực vật *hoya carnos*, bạc sulfadiazine, nhôm phosphide và các sản phẩm tinh dầu bạc hà (bao gồm bột tinh dầu bạc hà và thạch cao tẩm thuốc) hoặc liên quan đến việc sử dụng thực phẩm có màu đỏ cam 1 - phenylazo - 2 - naphthol - 6 - axit sulphonic, được tìm thấy trong chất tạo màu thực phẩm, Orange- RN, các phụ gia thực phẩm này sau đó đã bị cấm ở nhiều quốc gia. Tuy nhiên các báo cáo này không có đủ bằng chứng để đưa ra kết luận rõ ràng về nguy cơ của các chất được đề cập trong việc gây tan máu ở những người thiếu enzyme G6PD nói chung<sup>38</sup>. Các nghiên cứu cho rằng, tổn thương HC do sự hủy hoại oxy hóa của thuốc cũng tương tự như Favism vì đậu fava có chứa các hợp chất oxy hóa như *divicine*, *isouramil* và *convicine*<sup>7</sup>.

#### *Tan máu do thuốc*

Các loại thuốc phổ biến được nói đến gây tan máu ở bệnh nhân G6PD bao gồm dapsone, xanh methylen, nitrofurantoin, primaquine, Rasburicase và các thuốc chống viêm không steroid,..trong đó đặc biệt 2 loại thuốc chống SR là primaquine và dapsone<sup>36</sup>.

Vào năm 1920, việc tổng hợp 8-aminoquinolines, đặc biệt là Plasmoquine và primaquine, là một bước tiến lớn trong việc kiểm soát bệnh SR và nó được sử dụng rộng rãi. Năm 1950 khi quân đội Hoa Kỳ đóng quân tại các khu vực của Hàn Quốc, nơi bệnh SR lưu hành, một số binh sĩ có dấu hiệu bị vàng da và thiếu máu sau sử dụng thuốc, chủ yếu gặp ở những người Mỹ gốc Phi, được gọi là hội chứng *nhảy cảm primaquine*<sup>39</sup>. Năm 1956 Carson và cộng sự cho rằng hoạt động enzyme của G6PD đã giảm rõ rệt trong các tế bào HC của những người nhạy cảm với PQ đi

kèm thuật ngữ *thiếu hụt G6PD* ra đời. Năm 1962, các tình nguyện viên người Mỹ gốc Phi sau uống PQ vài ngày thấy hàm lượng Hb giảm xuống rõ rệt còn 50g/l vào ngày thứ 7 và đều có Hb niệu từ 1-3 ngày với hình ảnh HC vỡ trên lam máu dàn<sup>3</sup>. Tại Việt Nam vào năm 1980, Phạm Đình Vy đã báo cáo một trường hợp tan máu cấp trên bệnh nhân thiếu enzyme G6PD và có điều trị thuốc SR dẫn đến suy thận cấp vô niệu phải thay máu toàn bộ<sup>17</sup>.

Năm 2020, sau đại dịch COVID-19 diễn ra trên toàn cầu đã có rất nhiều báo cáo nói đến các loại thuốc chống lại COVID-19, trong đó có chloroquine và hydroxychloroquine có khả năng gây tan máu ở bệnh nhân thiếu G6PD. Mối liên hệ giữa hydroxychloroquine và thiếu G6PD được quan tâm đặc biệt. Sử dụng từ khóa “G6PD và COVID-19” trên trang PubMed (*Pubmed.ncbi.nlm.nih.gov*)<sup>40</sup> cho thấy 27 bài báo trong đó 17 bài (62%) có từ khóa hydroxychloroquine, G6PD-COVID-19 và 6 báo cáo mô tả COVID-19 thiếu G6PD. Điều này đã cho thấy, thiếu G6PD là một trong những rối loạn huyết học liên quan nhiều nhất đến nhiễm COVID-19 ở bệnh nhân dùng hydroxychloroquine<sup>40</sup>. Thông qua báo cáo tất cả các trường hợp hydroxychloroquine ở bệnh nhân thiếu G6PD/COVID-19 được công bố trên PubMed, cho thấy việc điều chỉnh liều HCQ ở các bệnh nhân này rất quan trọng vì liên quan đến mức độ phản ứng oxy hoá và phản ứng miễn dịch làm tăng cường sản xuất cytokine tiền viêm, kích hoạt viêm<sup>40</sup>.

Một số thuốc khác có tính oxy hoá cũng có thể gây nên tình trạng tan máu ở người thiếu enzyme G6PD như acid salicylate (aspirine), cotrimoxazole (bactrim), vitamine K tổng hợp, thuốc giảm đau acetaminophene và một số kháng viêm non-steroides khác<sup>38</sup>... Năm 2017, một số nhà bác học đã mô tả 1 trường hợp bệnh nhân thiếu G6PD tan máu cấp sau truyền Vitamin C liều cao gây thiếu máu tan máu rất rõ rệt<sup>41</sup>. Một nghiên cứu khác cũng chỉ ra, do vô tình nuốt phải naphthalene có trong trong viên phiến, bạc hà cũng là một trong những nguyên nhân gây tan máu cấp tính ở người thiếu enzyme G6PD ở Anh, nhưng hiện nay ít phổ biến do các sản phẩm chứa naphthalene đã bị cấm ở EU từ năm 2008<sup>31</sup>.

Bên cạnh đó, nhiễm trùng như viêm gan siêu vi A và B, Cytomegalovirus, viêm phổi và sốt thương hàn được cho là một yếu tố kích hoạt quan trọng khác của thiếu máu cấp<sup>42</sup>(*www.ncbi.nlm.nih.gov*). Hoặc sau chấn thương nặng, người thiếu G6PD cũng có thể có nguy cơ nhiễm trùng huyết cao hơn và có diễn biến lâm sàng nghiêm trọng, điều này đã được nói đến trong một nghiên cứu ở Anh<sup>43</sup>. Tuy

nhiên, cơ chế chính xác của hiện tượng gây tan máu chưa rõ, có thể do bạch cầu sản xuất các loại oxy hóa gây oxy hóa trong HC.

### **3) Thiếu máu tan máu mạn tính không phải HC hình cầu di truyền**

Năm 1958 người ta cho rằng thiếu G6PD cũng có thể dẫn đến tan máu mạn tính mức độ từ nhẹ đến nặng. Biểu hiện lâm sàng gồm thiếu máu mạn tính, vàng da nhẹ, lách to ít. Con tan máu tăng thêm khi có sốt, dùng các thuốc có tính oxy hóa hoặc ngộ độc đậu tằm. Sinh lý bệnh của trường hợp này được giải thích xảy ra khi thiếu NADPH ở trạng thái ổn định để duy trì mức độ của các chất oxy hóa, sự tích tụ dư thừa lâu dài làm hồng màng HC, dẫn đến giảm tuổi thọ của chúng gây và chứng tan máu mãn tính. Loại này chủ yếu gặp nhiều ở người Bắc Âu, ở những đột biến có tần suất xuất hiện ít và không xảy ra ở những loại đột biến hay gặp như G6PD<sup>A</sup> - G6PDMed<sup>44</sup>.

Bên cạnh đó sự thiếu hụt G6PD còn tương tác với các bệnh di truyền khác liên quan cấu trúc hoặc chức năng của HC hiện nay vẫn chưa được mô tả rõ ràng. Theo một số nghiên cứu ở quần thể có thiếu enzyme G6PD phổ biến, bệnh HC hình liềm (HbS) và bệnh Thalassemia cùng tồn tại với tần suất đáng kể. Các tác giả cho rằng, bệnh thiếu máu HC hình liềm và thiếu G6PD dẫn đến thiếu máu trầm trọng hơn và tăng nguy cơ mắc bệnh mạch máu não<sup>45 46</sup>. Vì vậy, việc xét nghiệm G6PD trong bệnh HC hình liềm và các bệnh lý di truyền khác được khuyến cáo để tránh tiếp xúc với thuốc oxy hóa hoặc các tác nhân gây vỡ HC làm trầm trọng thêm tình trạng bệnh. Nên chủ động xét nghiệm sớm cho trẻ em ngay để phòng ngừa biến chứng vàng da nặng dẫn đến tử vong. Đồng thời, tư vấn nên nhân, tránh 2 người đều bị bệnh thiếu G6PD lấy nhau vì con của họ sinh ra cũng bị bệnh này. Đối với bố mẹ bệnh nhân thì nên biết được bệnh của con mình mà chủ động tránh tất cả những yếu tố làm nặng hơn.

Ngoài các biểu hiện trên, một số tác giả còn cho rằng, lâm sàng của thiếu enzyme G6PD giữa các khu vực cũng có sự khác nhau, có thể do đặc thù của các biến dạng. Ví dụ hầu hết người Mỹ gốc Phi không có triệu chứng<sup>34</sup> nhưng ở Đài Loan 20-40% trẻ sơ sinh bị vàng da liên quan đến thiếu enzyme G6PD<sup>47</sup>.

Tóm lại mức độ nghiêm trọng và diễn biến của một đợt tan máu ở bệnh thiếu G6PD phụ thuộc vào biến thể di truyền G6PD, mức độ thiếu hụt enzyme cũng như loại và thời gian tiếp xúc các tác nhân gây oxy hóa. Ngoài ra, tuổi của bệnh nhân, tình trạng bệnh lý kèm theo cũng là các yếu tố làm cho nguy cơ bệnh nặng hơn. Và

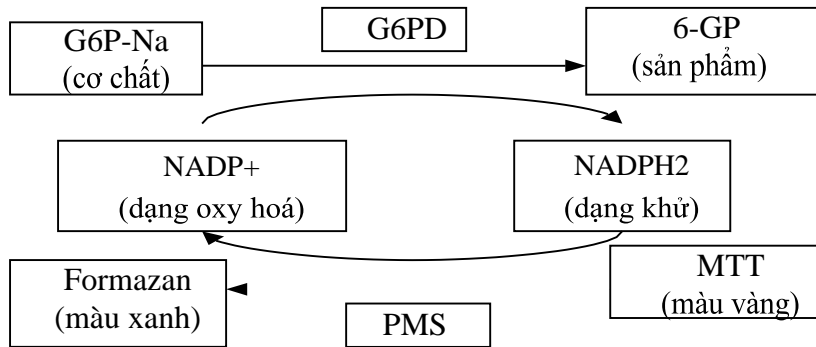


các nghiên cứu đều giải thích hiện tượng tan máu sơ sinh hoặc hội chứng Favism hay gặp ở nam giới do đặc điểm di truyền của bệnh <sup>35</sup>.

### **1.2.2. Triệu chứng cận lâm sàng và các xét nghiệm xác định chẩn đoán G6PD**

Thiếu G6PD là bệnh di truyền trên NST giới tính X nên nam giới biểu hiện kiểu hình rõ ràng và dễ gây tan máu hơn nữ giới, đặc biệt nữ dị hợp tử. Do đó tùy yêu cầu tiếp cận khác nhau để sử dụng các phương pháp chẩn đoán sự thiếu hụt G6PD bằng các xét nghiệm ở cấp độ kiểu gen hay kiểu hình dựa trên các yêu cầu của nhân viên y tế hoặc nhà nghiên cứu. Nếu mục đích là điều trị tránh thuốc oxy hóa hoặc đánh giá nguy cơ tan máu nên sử dụng xét nghiệm kiểu hình đủ để xác định nồng độ enzyme thích hợp và xử trí lâm sàng. Kiểu hình G6PD có thể được đánh giá theo nhiều cách. Phân tích protein luôn được sử dụng cùng với đánh giá hoạt động của enzyme để xác định đặc điểm của các biến thể <sup>24,48-51 50,51</sup>. Nếu mục đích là nghiên cứu đánh giá về tỉ lệ mắc, độ phổ biến, biến đổi phân tử ở cấp độ quần thể thì việc xác định kiểu gen là đủ. Đã có nhiều nghiên cứu lớn đưa ra theo biến đổi địa lý của G6PD có theo kiểu gen trên một nhóm nhỏ các đột biến đã biết trong một quần thể nhất định. Nên sử dụng giải trình tự gen để khám phá các biến thể hiếm hoặc để điều tra các quần thể thiếu thông tin <sup>5,10,52,53</sup>.

Với việc xác định kiểu hình, có nhiều phương pháp phát hiện thiếu G6PD, bao gồm định tính, bán định lượng cho đến định lượng. Dù phương pháp nào, cũng nhằm chẩn đoán xác định tan máu cấp liên quan đến G6PD và phòng hoặc cân nhắc sử dụng loại thuốc có khả năng gây tan máu. Theo Luzzatto ít nhất hai trường hợp cần phải buộc tiến hành xét nghiệm: Sử dụng các loại thuốc nguy cơ tan máu ở khu vực thiếu G6PD tỷ lệ cao và sử dụng các thuốc tan máu mạnh (PQ,...)<sup>3</sup>. Phương pháp định tính phổ biến là: xét nghiệm phát quang và bán định lượng tạo vòng Formazan. Phương pháp phát quang có giá thành cao và khó phát hiện trường hợp nữ dị hợp tử. Phương pháp Formazan áp dụng phổ biến ở trên thế giới và Việt Nam, vì nó đơn giản dễ thực hiện, giá thành rẻ vì không cần thiết tham gia của các thiết bị. Nó được thực hiện thường quy trong sàng lọc sơ sinh ở nhiều nước, chủ yếu là trên máu khô như một test sàng lọc trong cộng đồng, đặc biệt phù hợp cho tại chỗ và các điểm nóng về G6PD. Tuy nhiên, nếu sử dụng trên quy mô lớn là tốn kém và cần cách bảo quản thích hợp của bộ thuốc thử <sup>35</sup>.



**Sơ đồ 1.1. Nguyên lý của kỹ thuật Formazan bán định lượng.**

Phương pháp định lượng là tiêu chuẩn hiện nay trong chẩn đoán thiếu enzyme G6PD, giúp phân loại tình trạng, mức độ thiếu enzyme. Trong đó, xét nghiệm định lượng đo quang phổ là tiêu chuẩn vàng, thông dụng nhất được sử dụng với nguyên tắc dựa trên sự thay đổi của NADPH theo thời gian trong huyết tán của máu được ủ với chất nền (sản phẩm kết quả từ quá trình ly giải của HC) để phát hiện tổng hoạt động của enzyme và được đo bằng độ hấp thụ ở bước sóng 340 nm ở một nhiệt độ nhất định trên số lượng HC nhất định (đơn vị của enzyme trên mỗi HC: IU/SLHC) hoặc đối với nồng độ hemoglobin nhất định (đơn vị enzyme trên gam hemoglobin: IU/gHb). Hoạt động bình thường được coi là từ >200 IU/SLHC hoặc 7-10 IU/gHb tùy theo nhà sản xuất hãng máy với hoá chất tương ứng. Phương pháp này rất có giá trị trong đối tượng nghi ngờ thiếu G6PD và có bệnh SR kèm theo để đảm bảo rằng bệnh nhân sẽ không bị thiếu máu tan máu khi tiếp xúc với thuốc điều trị SR. Tuy nhiên kỹ thuật này có nhược điểm phụ thuộc vào nồng độ của Hb trong máu. Ở những người bị thiếu máu, đặc biệt thiếu máu thiếu sắt, nồng độ Hb trong máu thấp gây ra G6PD tăng giả tạo. Hoặc các trường hợp giảm thể tích HC, tăng số lượng HC lưới cũng sẽ làm tăng hoạt độ enzyme giả tạo<sup>54</sup>. Năm 2017, Banccone đưa ra một xét nghiệm đo tế bào dòng chảy nhanh hơn và đơn giản hơn. Phương pháp đo tế bào dòng chảy như một lựa chọn thay thế giúp phát hiện enzyme hoạt động ở từng HC đơn lẻ, bao gồm cả HC lưới nên rất có giá trị xác định lượng G6PD ở đối tượng phụ nữ dị hợp tử hoặc bệnh nhân có thiếu máu do thiếu sắt hoặc bị bệnh huyết sắc tố trước đó vì nó không bị ảnh hưởng bởi nồng độ hemoglobin<sup>54,55</sup>.

Cả 2 xét nghiệm đo quang phổ và dòng chảy tế bào đều khá tốn kém và đòi hỏi người thực hiện phải có tay nghề cao, thiết bị và vật liệu tin cậy. Mà ở các nước nhiệt đới kém phát triển, nơi căn bệnh này rất phổ biến cần xét nghiệm này sẽ khó thực hiện<sup>29,55</sup>. Vì vậy, xét nghiệm chẩn đoán nhanh, dựa trên thiết bị cảm biến sinh học cầm tay, là một công cụ chẩn đoán với độ nhạy và độ đặc hiệu cao, chẩn đoán chính xác hơn, định lượng nhanh trong 4 phút, rẻ tiền, dễ thực hiện. Mẫu bệnh phẩm cũng rất dễ lấy bằng cách chích ngón tay máu mao mạch hoặc máu tĩnh mạch<sup>3,32</sup>. Mô hình này được thực hiện cả phân tích enzyme G6PD và Hb trong cùng một thiết bị<sup>56</sup>.

Tuỳ điều kiện của từng quốc gia mà các xét nghiệm hay định tính được sử dụng phổ biến hơn định lượng. Đồng thời, kết hợp giữa xét nghiệm enzyme và di truyền G6PD trong quần thể giúp phân biệt ở những trường hợp nồng độ enzyme 30–40% so với bình thường, sẽ xác định chính xác tất cả nam giới dị hợp tử và nữ giới đồng hợp tử G6PD<sup>20,32,35,57-60</sup>. Để chẩn đoán chính xác những trường hợp nữ dị hợp tử có thể được phát hiện nếu nồng độ enzyme dưới 20%, còn lại nên thực hiện bằng phương pháp phân tích phân tử, vừa giúp xác định các đột biến đã biết gây ra bệnh<sup>32</sup>. Các kỹ thuật phân tử cổ điển bao gồm phân tích enzyme giới hạn (PCR-RFLP), hệ thống đột biến chịu nhiệt khuếch đại (ARMS), điện di gel gradient (DGGE), biến tính sắc ký lỏng hiệu năng cao (DHPLC), đường cong nóng chảy và xét nghiệm chấm đảo ngược. Hoặc có thể giải trình tự để xác định được đầy đủ các biến thể của gen. Các xét nghiệm này sẽ khắc phục những hạn chế của xét nghiệm sinh hóa vì tính ổn định của DNA<sup>54</sup>.

### **1.2.3. Phân loại**

Bệnh được phân loại lần đầu tiên vào tháng 12 năm 1966 chủ yếu dựa trên biểu hiện lâm sàng với các trường hợp nam giới dị hợp tử. Khi đó, chỉ với 20 biến thể G6PD được mô tả theo % hoạt động G6PD. Tại cuộc họp để phân loại này đã đưa ra khuyến nghị biến thể G6PD tương ứng chỉ báo hoạt động của enzyme: (-): < 25%; (+/-): 25– 65%; (+): 65–150% và (++):> 150%, hoạt động enzyme bình thường<sup>48</sup>. Năm 1971, Yoshida, Beutler và Motulsky mới đề xuất sơ đồ phân loại mà được quen thuộc đến ngày nay là chia các biến thể của bệnh lý thiếu hụt G6PD thành 5 lớp, dựa vào hoạt độ của enzyme trong HC và biểu hiện lâm sàng của chúng<sup>61</sup>. Bảng phân loại này được kèm theo các cảnh báo "sự phân biệt giữa các lớp này

không phải lúc nào cũng rõ ràng”. Phân loại của Yoshida và CS nhanh chóng được gọi là "Phân loại của WHO". Sơ đồ phân loại này đã được củng cố thêm khi WHO tập hợp thêm về tình trạng thiếu enzyme G6PD vào năm 1985, mô tả 310 biến thể G6PD và được chia thành 5 lớp theo mức độ nghiêm trọng bệnh, kèm với hoạt động của enzyme và thông số huyết học của bệnh nhân <sup>9</sup> (Bảng 1.3)

**Bảng 1.1. Phân loại của tổ chức Y tế thế giới dựa vào hoạt độ enzyme và biểu hiện lâm sàng**

Lớp	Lâm sàng	Hoạt độ enzyme	Tỷ lệ hay gặp
I	Thiếu G6PD nặng với thiếu máu tan máu mạn tính, vàng da sơ sinh (không có tế bào HC hình cầu)	<10% so với bình thường	Không phổ biến; ít xảy ra trên quần thể. (Ví dụ: G6PD Minnesota, G6PD Tokyo, G6PD Campinas) <sup>62</sup>
II	Thiếu G6PD nặng với thiếu máu tan máu cấp tính, từng đợt	<10% so với bình thường	Thay đổi; phổ biến hơn ở các nước châu Á và Địa Trung Hải (Ví dụ: G6PD Meditterrian, G6PD Canton, G6PD Union, G6PD Kaiping) <sup>62</sup> .
III	Thiếu G6PD nhẹ và trung bình, có cơn tan máu cấp khi tiếp xúc với các tác nhân oxy hóa	10 - 60 % so với bình thường	10 % nam giới người da đen ở Hoa Kỳ. (Ví dụ, G6PD A <sup>-</sup> ) <sup>62</sup>
IV	Thiếu G6PD rất nhẹ hoặc không, không có biểu hiện lâm sàng.	60 - 150% so với bình thường	Hiếm (Ví dụ: G6PD A <sup>+</sup> ) <sup>62</sup>
V	Không có biểu hiện lâm sàng	Tăng	Hiếm ((ví dụ, G6PD Hektoen) <sup>62</sup>

Năm 1986, trình tự cDNA G6PD được công bố một cách đầy đủ, các đột biến riêng lẻ của nhiều biến thể G6PD được xác định cho thấy các biến thể khác nhau là

do cùng một đột biến trên DNA gây ra. Từ đó, qua phân tích phân tử đột biến, các biến thể mới được báo cáo đã cung cấp cả đặc điểm về sinh hóa và sự nhận dạng của các đột biến và cho thấy mối liên quan của chúng; xác định lại hoạt động G6PD "bình thường" thành  $> 70\%$  hoặc  $> 80\%$  bình thường<sup>63,64</sup>. Đồng thời theo cách phân loại này nhiều biến thể đã được xếp vào loại II hoặc loại III dựa trên phép đo duy nhất ở một người duy nhất<sup>8</sup>. Do đó, các nhà khoa học cho rằng cần có sự đồng thuận trong quá trình xác định hoạt động của một biến thể cụ thể, ví dụ, cần cụ thể về số lượng bệnh nhân và số lần lặp lại. Vì vậy, tác giả Cunningham và Bosman đề xuất hội đồng kỹ thuật tổ chức để sửa đổi sơ đồ phân loại G6PD vào đề xuất sửa đổi vào ICD-11, phân loại tình trạng thiếu hụt G6PD theo chứng tan máu, cụ thể là thiếu máu tan máu do thiếu hụt G6PD (mã: 3A10.003) là bệnh di truyền phổ biến nhất thiếu hụt enzyme HC có thể biểu hiện bằng vàng da sơ sinh nặng, gây hậu quả thần kinh nghiêm trọng hoặc thường gặp nhất là thiếu máu tan máu cấp tính sau khi sử dụng một số thực phẩm, thuốc hoặc trong quá trình nhiễm trùng ở những người không có triệu chứng. Phiên bản hiện tại của ICD-11 được cập nhật vào tháng 2 năm 2020 với 3 mục tiêu: Sửa đổi phân loại được sử dụng rộng rãi nhất của các biến thể G6PD, thảo luận các yêu cầu để xác định các biến thể mới và đề xuất phân loại mới G6PD cho ICD-11, bao gồm phân loại các biến thể G6PD và các biểu hiện lâm sàng<sup>8</sup>.

#### **1.2.4. Chẩn đoán**

##### **1.2.4.1. Chẩn đoán sàng lọc**

Nên thực hiện sàng lọc ở các gia đình đã có trẻ bị vàng da hay trong vùng SR hoặc vùng có tỷ lệ thiếu hụt G6PD cao hoặc tiền sử tan máu sau khi sử dụng một số thuốc và thực phẩm có tính oxy hoá. Hầu hết những người thiếu enzyme G6PD không có triệu chứng, chỉ biểu hiện khi tiếp xúc với một số yếu tố oxy hoá gây kích hoạt vỡ hồng cầu (đậu fava, một số loại thuốc, một số bệnh truyền nhiễm,...), có thể có thiếu máu tán huyết cấp tính, đặc biệt là ở trẻ em. Các triệu chứng khởi phát trong vòng 2-3 ngày sau khi tiếp xúc với chất kích hoạt này<sup>2,32,65</sup>. Các triệu chứng có thể bao gồm mệt mỏi, xanh xao, khó thở, tim đập nhanh, nước tiểu sẫm màu, nhiệt độ cơ thể tăng đột ngột, đau lưng dưới và lách to. Gặp nhiều là các triệu chứng mắt, niêm mạc và da vàng,... Tuy nhiên, hầu hết các đợt, kể cả đợt nặng, bệnh thường tự giới hạn và tự khỏi. Trong một số trường hợp ít gặp ở biến thể loại I, có thể bị thiếu máu huyết tán mãn tính xảy ra mà không cần đến yếu tố kích hoạt. Những người này được coi là mắc thể bệnh thiếu máu tan máu

HC không hình cầu bả́m sinh, thường là nam giới với các biểu hiện vàng da, có thể bị phì đại lách <sup>57</sup>.

Các hướng dẫn xét nghiệm sàng lọc và chẩn đoán có thể khác nhau tùy theo vị trí địa lý, dân tộc, giới tính và tuổi tác của bệnh nhân <sup>59</sup>. Đối với trẻ sơ sinh, có thể sàng lọc bằng lấy một vài giọt máu ngay sau khi trẻ sinh ra được 48 - 72 giờ bằng kỹ thuật bán định tính để sàng lọc. Sau đó có thể chẩn đoán xác định bằng cách định lượng enzyme G6PD. Điều này giúp hạn chế những biến xấu nhất trong bệnh thiếu enzyme G6PD ở trẻ.

Việc sàng lọc bằng cách này đã được áp dụng ở hầu hết các nước trên thế giới đặc biệt tại các khu vực lưu hành bệnh SR thuộc Châu Á, Châu Phi, Châu Âu và Trung Đông, Châu Á Thái Bình Dương bằng chương trình sàng lọc sơ sinh (SLSS). Ở Trung Quốc qua SLSS từ năm 2013- 2017 tỷ lệ này là 0.008- 3,4% <sup>66</sup>. Các nước thuộc Tiểu vùng sông Mê Kông mở rộng và khu vực Châu Á Thái Bình Dương nơi có mức độ thiếu hụt G6PD cao (Thái Lan, Myanmar, Lào, Việt Nam và Campuchia) thực hiện SLSS chưa hiệu quả và đồng bộ <sup>56</sup>. Thành công nhất là Malaysia và Singapore, tiến hành SLSS từ máu cuống rốn vào những năm 1965 với tỷ lệ bao phủ là 95% -99% trong dân số. Ở Việt Nam, năm 2006, qua công trình “SLSS thiếu enzyme G6PD” tại bệnh viện Từ Dũ ở 500 trẻ sơ sinh cho thấy 5.5% trẻ bị thiếu, trong đó 58.8% bé trai và 42.2% bé gái, giống với kết quả sàng lọc của các nước châu Á lân cận. Ngoài ra, từ năm 1998-2008 trong chương trình SLSS với dự án RAS/6/032, trên cả nước khoảng 8% trẻ em được sàng lọc, chủ yếu ở Hà Nội và Hồ Chí Minh, tỷ lệ trẻ em nam thiếu enzyme G6PD là khoảng 2% (<https://tudu.com.vn/vn/y-hoc-thuong-thuc/suc-khoe-phu-nu/lam-me-an-toan/cham-soc-tre-so-sinh/thuc-hien-xet-nghiem-sang-loc-so-sinh-sau-khi-sinh>). Gần đây nhất năm 2021, qua khảo sát SLSS 5 loại bệnh lý tại bệnh viện Đại học y dược thành phố Hồ Chí Minh cho tỷ lệ thiếu G6PD là 3,09% trong đó nam giới chiếm 68,8% và nữ giới chiếm 32,2% <sup>14</sup>. Tại bệnh viện phụ sản thành phố cần Thơ qua SLSS qua các giai đoạn 2017-2020 và 2021-2022 cũng cho tỷ lệ trẻ mắc bệnh của trẻ là 1,02% và 1,67%<sup>13,67</sup>

Qua chương trình cho thấy sàng lọc thiếu G6PD là rất quan trọng cho tất cả trẻ em. Nếu thiếu, giúp can thiệp kịp thời cũng như cung cấp những thông tin cần thiết có liên quan đến bệnh để cha mẹ các biết mà phòng ngừa, cả việc lập gia đình cho những người thiếu G6PD. Và đồng thời rất có giá trị trong chẩn đoán sớm hội chứng Kernicterus do thiếu G6PD <sup>68</sup>.

1.2.4.2.. Chẩn đoán xác định:

Đối với tất cả các đối tượng, để chẩn đoán xác định thiếu G6PD hiện nay đều dựa vào các xét nghiệm định lượng. Hoặc các nước tỷ lệ bị bệnh cao, kém phát triển có thể sử dụng các xét nghiệm định tính hoặc bán định lượng trên 1 thiết bị cảm biến sinh học chẩn đoán nhanh giúp quản lý nhanh, hiệu quả<sup>69,70</sup>.

Ngoài ra có thể sử dụng kỹ thuật phân tích gen để phát hiện được nguyên nhân và dạng đột biến gen từ đó có hướng tiên lượng và dự phòng. Tuy độ chính xác của kỹ thuật này cao nhưng lại tốn kém.

### **1.2.5. Điều trị và phòng bệnh**

#### **1.2.5.1. Điều trị**

Thường thì triệu chứng sẽ tự hết sau khi dừng tiếp xúc những chất gây tan máu. Tuy nhiên có một số trường hợp cần quản lý, theo dõi và điều trị khi các triệu chứng ảnh hưởng đến tính mạng và chủ yếu là điều trị triệu chứng<sup>32</sup>. Nếu tình trạng thiếu máu ảnh hưởng nghiêm trọng đến tính mạng cần truyền máu. Nếu có tổn thương thận cấp tính cần được chạy thận nhân tạo<sup>32</sup>. Nếu có vàng da sơ sinh, tăng bilirubin máu nghiêm trọng cần thực hiện quang trị liệu giảm nguy cơ tổn thương não<sup>71</sup>. Năm 2019, Raub và CS đã đưa ra các biện pháp điều trị bằng cách sử dụng các chất hoạt hóa phân tử nhỏ của enzyme (AG1) có thể thúc đẩy hoạt động của enzyme dựa trên nguyên tắc tương tác protein-protein (PPIs), tăng cường hoạt động enzyme của G6PD<sup>72</sup>.

#### **1.2.5.2. Phòng bệnh**

Việc phòng bệnh giữ một vai trò quan trọng vì giúp tránh xảy ra các biến chứng. Vì người bị thiếu enzyme G6PD đa phần sẽ có cuộc sống hoàn toàn bình thường, chỉ có thể xảy ra khi sử dụng một số loại thức ăn, thuốc có khả năng oxy hóa thì có thể có các biến chứng nghiêm trọng. Hầu hết bệnh nhân hồi phục một cách tự nhiên sau dùng các chất oxy hoá nhưng cần được theo dõi cẩn thận<sup>32</sup>. Với những bệnh nhân thiếu G6PD đã được biết trước cần thông báo về tình trạng thiếu enzyme G6PD cho bác sĩ và chủ động phòng tránh thức ăn và thuốc có tính oxy hóa đã được khuyến cáo<sup>31</sup> và dự định chỉ định thuốc có tính oxy hóa nghi ngờ gây tan máu thì nên sàng lọc G6PD trước khi dùng. Trường hợp bắt buộc phải dùng các loại thuốc có nguy cơ thì cần theo dõi chặt chẽ vấn đề tan máu, vàng da. Trang bị kiến thức cho cha mẹ của trẻ mắc bệnh về bệnh, các yếu tố nguy cơ và những nguy hiểm có thể gặp phải và các biện pháp phòng tránh. Đối với những vùng có tỷ lệ bệnh cao, vùng SR lưu hành nên đưa xét nghiệm hoạt độ enzyme G6PD thành xét nghiệm

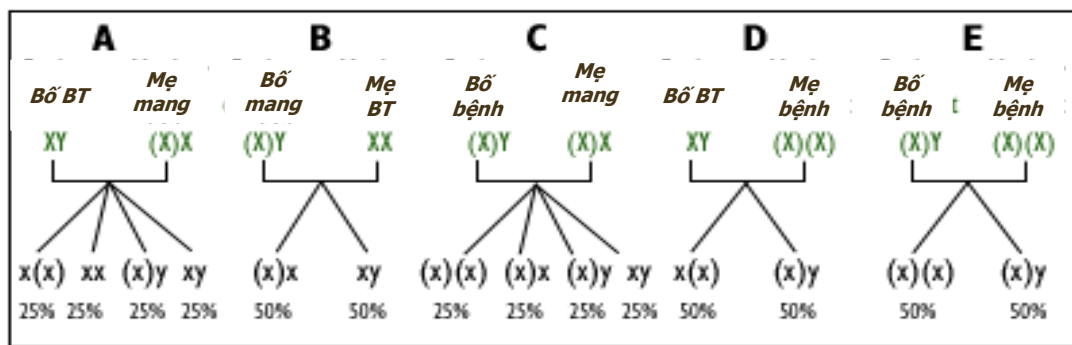
thường quy trước chỉ định điều trị các thuốc chống SR. Đưa việc phát hiện thiếu G6PD vào chương trình SLSS. Giáo dục tuyên truyền trong cộng đồng ý thức được ý nghĩa tầm soát bệnh. Tư vấn trước hôn nhân cho người bệnh, người mang gen về sự di truyền của bệnh. Khi đã có các triệu chứng của bệnh cần phòng biểu hiện biến chứng bằng cách theo dõi thường xuyên các xét nghiệm như: tổng phân tích tế bào máu máu, nước tiểu, theo dõi triệu chứng tan máu. Các việc này cần được duy trì, tuân thủ suốt đời. Ngoài ra, cần tránh những tình trạng ảnh hưởng xấu tới sức khỏe, kể cả những bệnh do nhiễm trùng hoặc nhiễm virus. Các bà mẹ cho con bú không được sử dụng những thức ăn hoặc dược phẩm không được sử dụng ở người bị thiếu enzyme G6PD vì những chất này có thể đi vào cơ thể trẻ qua sữa mẹ<sup>38,73</sup>

Hiện tại bệnh này không thể chữa khỏi được nhưng có thể phòng ngừa được hậu quả tán huyết do bệnh thiếu enzyme G6PD gây ra. Nếu phòng ngừa được thì sẽ sống phát triển như một người bình thường.

### 1.3. Đặc điểm di truyền, đột biến gen G6PD

#### 1.3.1. Đặc điểm di truyền

Thiếu G6PD là bệnh di truyền nằm trên NST X. Vì vậy nữ giới là người mang gen bệnh rồi truyền cho con trai. Người nữ đồng hợp tử gen đột biến hiếm gặp<sup>73</sup>.



X: NST X BT

(X): NST X bệnh

Di truyền của thiếu G6PD

#### Sơ đồ 1.2. Di truyền của bệnh thiếu G6PD

Các tình huống di truyền có khả năng xảy ra 5 tình huống sau đây:

*Trường hợp 1:* Nếu bố không bị bệnh và mẹ là người bình thường nhưng mang gen bệnh:

- Khả năng sinh con gái bị thiếu enzyme G6PD là 0%
- Khả năng sinh con gái bình thường nhưng mang genes là 50%
- Khả năng sinh con trai bị thiếu enzyme G6PD là 50%



- Khả năng sinh con trai hoàn toàn bình thường là 50%

*Trường hợp 2:* Nếu bố bị thiếu enzyme G6PD và mẹ hoàn toàn bình thường (không mang gen bệnh):

- Khả năng sinh con gái bị thiếu enzyme G6PD là 0%
- Khả năng sinh con trai bị thiếu enzyme G6PD là 0%
- Khả năng sinh con gái bình thường nhưng mang genes bệnh thiếu enzyme G6PD là 100%

*Trường hợp 3:* Nếu bố bị thiếu enzyme G6PD và mẹ bình thường nhưng mang gen bệnh:

- Khả năng sinh con gái bị thiếu enzyme G6PD là 50%
- Khả năng sinh con gái bình thường nhưng mang genes là 50%
- Khả năng sinh con trai bị thiếu enzyme G6PD là 50%
- Khả năng sinh con trai hoàn toàn bình thường là 50%

*Trường hợp 4:* Nếu bố và mẹ đều bị thiếu enzyme G6PD:

- Khả năng sinh con trai bị thiếu enzyme G6PD là 100%
- Khả năng sinh con gái bị thiếu enzyme G6PD là 100%

*Trường hợp 5:* Nếu bố không bị thiếu enzyme G6PD và mẹ hoàn toàn bình thường (không mang gen bệnh):

- Khả năng sinh con trai bị thiếu enzyme G6PD là 0%
- Khả năng sinh con gái bị thiếu enzyme G6PD là 0%

Vì gen gây bệnh nằm trên NST X nên có sự khác nhau cả kiểu gen và kiểu hình của nam và nữ. Nam giới có một nhiễm sắc thể X, nếu thừa hưởng một NST X có chứa gen đột biến từ mẹ, sẽ bị bệnh với kiểu gen bán hợp tử (hemizygote) và có biểu hiện kiểu hình là sự thiếu hụt G6PD. Nam giới có kiểu gen bán hợp tử này lại truyền cho tất cả các con gái của họ, là người mang gen bệnh nếu NST X khác từ mẹ bình thường. Nam giới không thể truyền gen X cho con trai của mình vì nam giới luôn truyền Y<sup>73</sup>. Ở nữ giới, có đột biến gen G6PD hay không phụ thuộc vào một quá trình bình thường được gọi là bất hoạt NST X ngẫu nhiên. Hiện tượng bất hoạt này là do nữ giới có hai X, đặc điểm bệnh tật trên 1 NST X, như một gen đột biến và có thể bị gen bình thường trên NST X kia “che dấu”. Về cơ bản, trong mỗi tế bào của cơ thể, một NST X đang hoạt động và một NST bị “im lặng”. Điều này xảy ra ngẫu nhiên và thường xảy ra theo tỷ lệ 50:50. Tuy nhiên, trong một số trường

hợp, phụ nữ có thể bị bất hoạt X thuận lợi, trong đó NST X “im lặng” trong hầu hết các tế bào, khi đó họ có thể có hoạt động G6PD bình thường, không có triệu chứng ngay cả khi có các yếu tố kích hoạt. Ngược lại, nữ giới có thể bị bất hoạt X không thuận lợi, trong đó NST X không bị “im lặng” trong hầu hết các tế bào, khi đó phụ nữ có các dấu hiệu thiếu G6PD tương tự như nam giới bị ảnh hưởng<sup>7</sup>. Chính vì vậy những người nữ dị hợp tử có hai quần thể HC, một quần thể HC bình thường và một quần thể HC bệnh lý; tỉ lệ hai loại này thay đổi trong phạm vi khá rộng, có thể đạt tới tỉ lệ 50:50, hoặc có thể có trường hợp tỉ lệ HC bình thường chỉ chiếm 1%, nhưng cũng có khi loại này cao tới 99%. Tuy nhiên, đa phần kết quả tổng mức hoạt động của enzyme G6PD bình thường ở nữ dị hợp tử chủ yếu nằm trong khoảng 30-80% hoạt động G6PD bình thường. Nên đối với những người nữ dị hợp tử, có thể có kiểu hình (phenotyp) bình thường hoặc thiếu hụt G6PD từ nhẹ đến trung bình, hoặc nặng như nam giới, đặc biệt khi họ mang alen bị đột biến ở vùng có chức năng quan trọng<sup>32,74</sup>.

**Bảng 1.2. Các liên kết kiểu gen và các kiểu hình G6PD trên NST X.**<sup>55,73</sup>

Kiểu gen				Kiểu hình	
Nam giới		Nữ giới		Thể loại lâm sàng	% hoạt động bình thường <sup>a</sup>
Kiểu	Alen	Kiểu	Alen		
Hemizygous (nam giới chỉ có một alen)	Thiếu	Đồng hợp tử (Homozygous)	Thiếu G6PD	Thiếu trầm trọng	<30%
		Dị hợp tử (Heterozygous)			
		Dị hợp tử (Heterozygous)	Thiếu G6PD/Bình thường	Thiếu trung bình hoặc thiếu nhẹ	Chủ yếu là từ 30% đến 80% <sup>b</sup>
Hemizygous (nam giới chỉ có một alen)	Bình thường	Dị hợp tử (Heterozygous)	Bình thường	Bình thường	> 80%
		Đồng hợp tử (Homozygous)	Bình thường		

**Chú thích:**

- Hemizygous: nam giới chỉ có một alen, thiếu G6PD hoặc bình thường;
- Homozygous: nữ giới đồng hợp tử, thiếu G6PD hoặc bình thường.
- Heterozygous: dị hợp tử, thiếu G6PD hoặc bình thường.

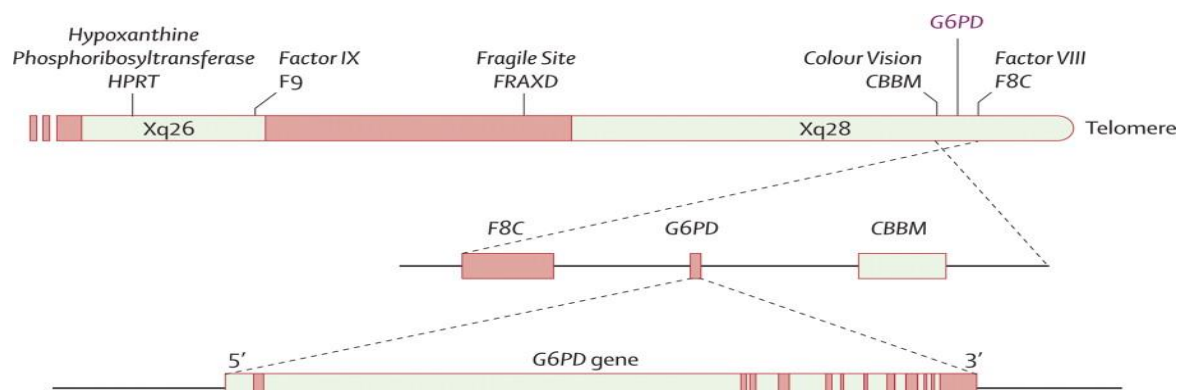
- Các kiểu hình liên quan: <sup>a</sup> Hoạt động enzyme G6PD bình thường (hoặc 100%) của nam giới dị hợp tử; <sup>b</sup> Hoạt động enzyme đồng tử nghiêm trọng đến mức bình thường, chủ yếu nằm trong phạm vi 30-80%.

Bên cạnh đó năm 2018, Lucio Lazzutto và CS <sup>20</sup> cho rằng sự di truyền trên NST X có ý nghĩa quan trọng đối với cả di truyền quần thể và lâm sàng. Thứ nhất, trong một quần thể cụ thể vì nam giới chỉ có một NST X nên tần số của nam giới dị hợp tử thiếu G6PD là giống với tần số gen; Nếu nó ở trạng thái cân bằng Hardy-Weinberg, tần số nữ dị hợp tử sẽ gần như gấp đôi đồng hợp tử. Thứ hai, trái với tuyên bố trong nhiều ấn phẩm cho rằng thiếu enzyme G6PD không phải là tính trạng lặn mà sự biểu hiện của nó phụ thuộc vào tỷ lệ bất hoạt NST X. Thật vậy, bất kỳ bệnh nhân nào mắc hội chứng Favism đều bao gồm cả nam, nữ và hầu hết là dị hợp tử. Đặc điểm biểu hiện ở dị hợp tử không phải là tính trạng lặn mà là sự bất hoạt NST X tạo ra một quần thể HC kép: một số HC có mức G6PD bình thường, còn HC bị thiếu G6PD khi tiếp xúc với các tác nhân oxy hóa khử, cũng dễ bị tán huyết như các tế bào HC thiếu G6PD ở nam giới dị hợp tử. Thứ ba, sự bất hoạt NST X là một hiện tượng ngẫu nhiên và tỷ lệ các HC thiếu G6PD so với HC có G6PD bình thường rất thay đổi, nếu nhiều đến mức ở hai đầu của phân phối chuẩn (Gaussian), có sự xen phủ tương ứng với các đồng hợp tử G6PD bình thường và thiếu. Nên phụ nữ dị hợp tử ở những người có tỷ lệ HC thiếu enzyme G6PD lớn hơn thì biểu hiện của bệnh thiếu máu tan máu cấp tính mức độ nghiêm trọng như nam giới. Ước tính tỷ lệ này ở bất kỳ dị hợp tử qua hoạt động G6PD của tổng quần thể HC hoặc hai loại HC riêng lẻ (HC có G6PD bình thường và HC thiếu G6PD) bằng kỹ thuật đo dòng chảy tế bào để định lượng chính xác. Một số phụ nữ đồng hợp tử có thể phát triển các triệu chứng khi có các yếu tố kích hoạt tùy thuộc vào từng loại đột biến cụ thể.

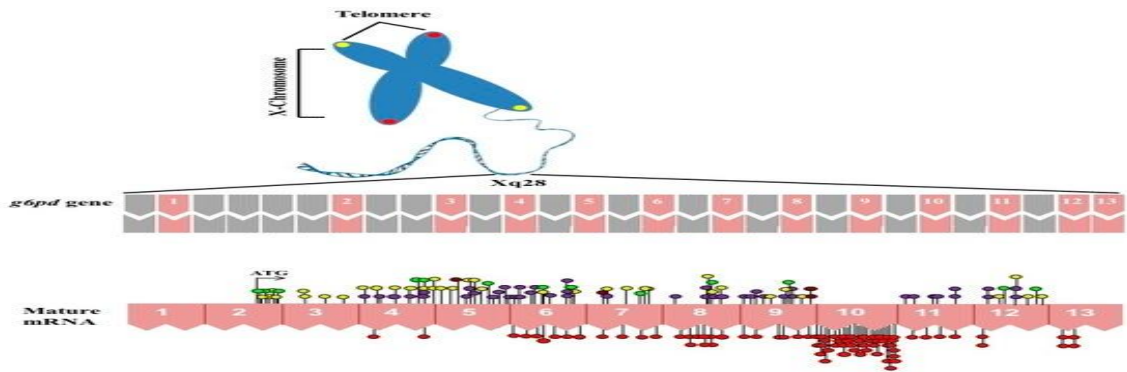
Nên sàng lọc và tư vấn di truyền tình trạng thiếu G6PD cho phụ nữ mang gen rất có ý nghĩa cho sức khỏe, hạn chế sinh ra những đứa trẻ có nguy cơ thiếu enzyme với các biến chứng vàng da sơ sinh, có thể gây tổn thương não, nếu không được kiểm soát <sup>33,59</sup>

### 1.3.2. Đặc điểm về gen và đột biến gen G6PD

Gen mã hóa cho G6PD là một trong những gen nằm trên cánh dài vùng 2 băng 8 NST X (Xq28) được biết đến như 1 điểm nóng gồm tập hợp các bệnh rối loạn sừng hoá, hemophilia A, gen bệnh mù màu,...<sup>57,59</sup> Năm 1986, gen này được phân tích, giải trình tự tương đối đầy đủ bởi các nhà bác học Persico và CS, Takizawa và Yoshida<sup>57</sup>. Gen dài khoảng 18,5 kb, trọng lượng phân tử là 59,256 dalton, có 13 exon và 12 intron với cấu trúc đơn bao gồm 515 acid amin, 25861 nucleotid. Gen cấu trúc của G6PD gồm 20014 bp, 2269 nucleotid, tương ứng với 2,4 kb, mã hoá mRNA của G6PD. Vùng mã hóa nằm ở exon 2-13, bộ ba mã hoá đầu tiên bắt đầu ATG nằm trong base 115 của 127 bp của exon 2. Kích thước của các exon mã hoá thay đổi rất nhiều, từ 38 bp (exon 3) đến 695 bp (exon 13). Hầu hết các intron đều ngắn hơn 1 kb, chỉ có intron 2 dài (khoảng 12 kb). 600 bp đầu tiên đầu 5' nằm trên exon 1 và 8 bp đầu tiên của exon 2, 88 bp đầu tiên của exon 13 tạo thành các phần chưa được dịch mã của mRNA G6PD. Vùng promoter của gen G6PD không mã hoá này tính năng đã được xác định, thể hiện hai tiểu vùng với Guanine và Cytosine cao (80%), đây là đặc điểm chung của các gen có biểu hiện cấu thành<sup>28</sup>. Sự vắng mặt của phần tử CAAT thường nằm ở vị trí -70 đến -90 của các gen là nơi cần thiết cho quá trình phiên mã; sự thay thế của hộp TATA cổ điển theo trình tự ATTAAAT nằm ở -202 bp từ codon bắt đầu ATG và sự hiện diện của ít nhất chín địa điểm CCGCCC, dường như liên quan đến sự điều tiết gen<sup>28</sup>.



**Hình 1.3. Vị trí gen G6PD trên NST X**



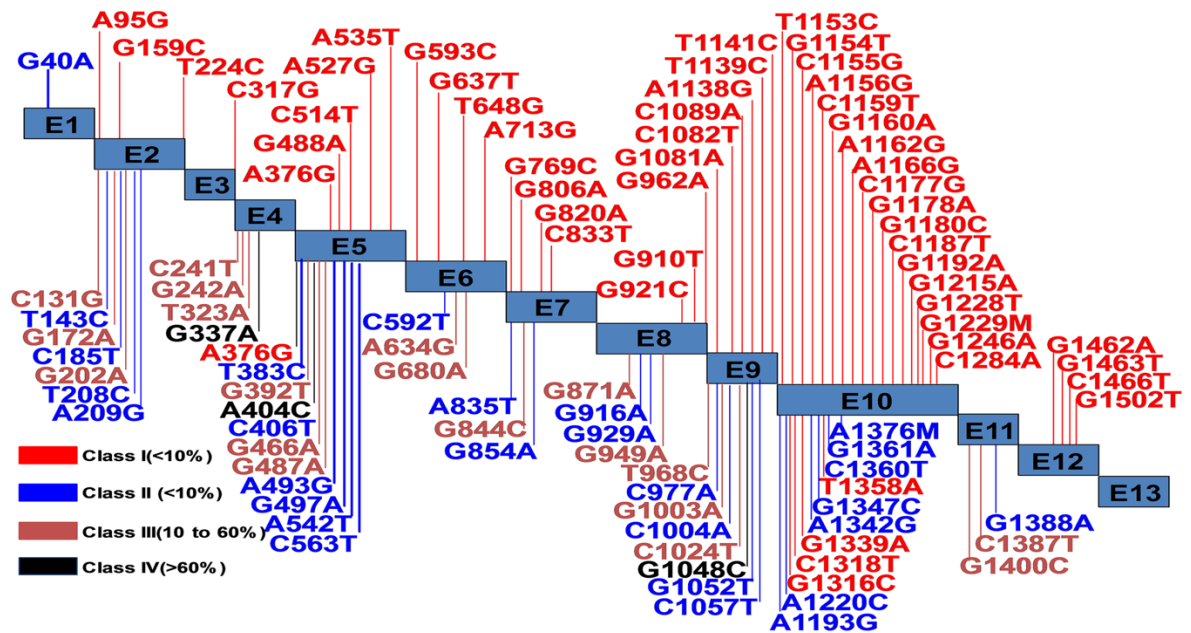
**Hình 1.4. NST X và phân bố các đột biến trong gen G6PD.** <sup>25</sup>

Mặt trên: các intron (xám) và exon (hồng). Mặt dưới: phân loại mRNA và các đột biến biến thể missense. Vòng tròn màu đỏ là các đột biến liên quan đến thiếu máu tan mạn tính. Vòng tròn tím thể hiện các đột biến cấp II, vòng tròn màu vàng thể hiện các đột biến cấp III, vòng tròn màu nâu thể hiện đột biến cấp IV, vòng tròn màu xanh lá cây là các biến thể mới báo cáo gần đây

Gen G6PD được coi là gen có sự điều hoà và kiểm soát (housekeeping) chặt chẽ. Nếu đột biến xảy ra trên gen cấu trúc sẽ phá vỡ cấu trúc bình thường của enzyme, gây thiếu G6PD về mặt chất lượng. Nếu đột biến xảy ra trên gen điều hoà hoặc gen khởi động sẽ làm giảm số lượng enzyme G6PD. Sự thay đổi về số lượng và chất lượng của G6PD đều dẫn đến sự thay đổi hoạt độ của enzyme G6PD <sup>3,28</sup>. Tuy nhiên hầu hết các enzyme bị đột biến luôn luôn có thành phần bất thường về mặt chất lượng. Điều này chứng tỏ những đột biến này xảy ra tại gen cấu trúc - vùng mã hoá (coding region) còn những đột biến gen điều hoà thì chưa được khẳng định <sup>75</sup>.

Với sự phát triển của sinh học phân tử, cơ sở gen học của bệnh thiếu hụt G6PD ngày càng sáng tỏ. Với 13 exon, exon 1 và một phần exon 2 không mã hoá, còn lại hầu như tất cả các exon đều có đột biến <sup>74</sup>. Năm 1993-1994, 60 dạng đột biến với 97 biến thể và hầu hết là đột biến điểm (96,8%) gây ra sự thay thế acid amin đơn lẻ trong gen G6PD <sup>34</sup>, còn lại 4/126 (3,2%) là G6PD loại bỏ ba bazơ trở lên. Đó là G6PD Sunderland xóa bỏ 3 bp, (CAT) xảy ra ở exon 2, dẫn đến mất một phần dư Isoleucine ở vị trí 35; G6PD Stonybrook với sự mất đoạn 6 bp (GGCAAC) ở exon 7 dẫn đến mất Glycine và Threonine ở vị trí 242-243, thứ 3 là G6PD Nara mất 24 bp ở exon 9 ở vị trí 953-976 mất 8 acid amin từ vị trí 319 - 326 và G6PD Vancouver, với ba đột biến thay thế bởi exon 6 ở vị trí 317 <sup>C-G</sup>, 544 <sup>C-T</sup> và 592 <sup>C-T</sup> tạo ra ba acid amin

thay thế (106 Ser-Cys, 182 Arg-Trp và 198 Arg-Cys)<sup>9</sup>. Ngoài trừ những trường hợp này, không có đột biến nào xảy ra ở vùng khởi động hoặc vùng nối của gen G6PD. Năm 2002, Longo và cộng sự<sup>76</sup> đã thống kê khoảng 183 đột biến cho thấy trong số này 70 loại thuộc lớp 1, 40 thuộc lớp 2, 36 thuộc lớp 3 và còn lại thuộc lớp 4. Cụ thể khi phân chia theo các dạng đột biến, ông thấy 164 dạng đột biến đột biến điểm thay thế 1 nucleotid, 8 dạng là đột biến thay thế 2-3 nucleotid, 9 dạng là dạng đột biến bị xoá khung và chỉ có 1 dạng là đột biến ảnh hưởng đến các intron tại vị trí nối (IVS-X), 1 dạng đột biến vô nghĩa (G6PD Georgia) được tìm thấy nhiều năm trước đó. Năm 2012 Minucci cập nhật khoảng 186 đột biến<sup>9</sup>. Trong đó có 159 (85,4%) là đột biến điểm, 15 (8,0%) là dạng đột biến phối hợp nhiều hơn 2 vị trí, 10 (5,3%) là dạng bị mất các nucleotide, và 2 (1,0%) là ảnh hưởng đến các intron.



**Hình 1.5. Các biến thể phổ biến và phân loại trong gen G6PD<sup>77</sup>**

Lớp I: Màu đỏ: sự thiếu hụt enzyme trầm trọng (dưới 10%) với bệnh thiếu máu tan máu không phải tế bào xơ vữa mãn tính (CNSHA). Lớp II: màu xanh lam: sự thiếu hụt trầm trọng (dưới 10%). Lớp III: màu da cam: thiếu hụt từ nhẹ đến trung bình (10-60%). Lớp IV: Màu đen: thiếu hụt rất nhẹ hoặc bình thường (> 60% hoạt động bình thường) và không có biểu hiện lâm sàng.

Năm 2016, Gómez-Manzo và CS đã tổng hợp thêm 31 đột biến mới của G6PD, lên 217 đột biến và phân tích trình tự DNA cũng vẫn chỉ ra rằng phần lớn các đột biến, cũng có những sai sót trong cùng một alen gây ra 2 hay nhiều vị trí thay thế nucleotid cũng như trong các trường hợp mất khung hoặc ảnh hưởng đến quá trình nối nhưng hiếm gặp. Tần số thay thế đơn hoặc nhiều nucleotit là gần như nhau giữa các biến thể hoặc có thể là sự kết hợp với các đa hình, còn sự mất đoạn chỉ được tìm thấy trong các biến thể không đa hình. Cụ thể: 23/31 (83,9%) thay thế đơn nucleotide, 01 là dạng đột biến xoá bỏ, 04 thuộc về dạng phối hợp và có 03 đột biến mới có ảnh hưởng đến intron (Bảng 1.5). Như vậy cho đến năm 2016 đã tổng kết với 217 biến thể G6PD được báo cáo có: 182 (83,9%) là dạng đơn (biến thể missense), 19 (8,7%) là phối hợp, 11 (5,1%) là dạng xoá bỏ, và 5 (2,3%) ảnh hưởng đến intron<sup>65</sup>. Đồng thời 16 đột biến đơn đã được báo cáo bởi Minucci nhưng chưa được xếp lớp theo phân loại của WHO thì đưa sắp xếp vào theo lớp được đưa sắp xếp vào theo lớp: Lớp 1: 7/16 gồm G6PD Zacatecas (Arg 257 Leu, exon 7), G6PD Palermo (Arg 257 Met, exon 7), G6PD Hamburg (Pro 276 Leu, exon 8), G6PD Veracruz (Arg 365 His, exon 10), G6PD Yucatan (Lys 429 Glu, exon 10), G6PD Tennessee (Leu 422 Val, exon 10) và G6PD Taif (174 Gly, exon 6) và lớp 2: G6PD Bahia (Phe 66 Thr, exon 4), G6PD San Luis Potosi (Asn 126 Tyr; exon 5), G6PD Coimbra (Arg 198 His, exon 6), 01 biến thể lớp III với đột biến kép: G6PD Sierra Leone (Arg 104 His, Asn 126 Asp, exon 5), một đột biến ở San Paulo với lớp IV (Ile 220 Met, exon 7). Có 4 đột biến không được phân loại theo hoạt động enzyme: G6PD Shanghai (Ala 231 Pro, exon 7), G6PD Karachi (Asp 325 Asn, exon 9), G6PD Vietnam 1 (Glu 3 Lys, exon 2), và G6PD Việt Nam 2 (Phe 66 Cys, exon 4).

**Bảng 1.3. Danh sách các đột biến G6PD được mô tả gần đây đưa<sup>65</sup>.**

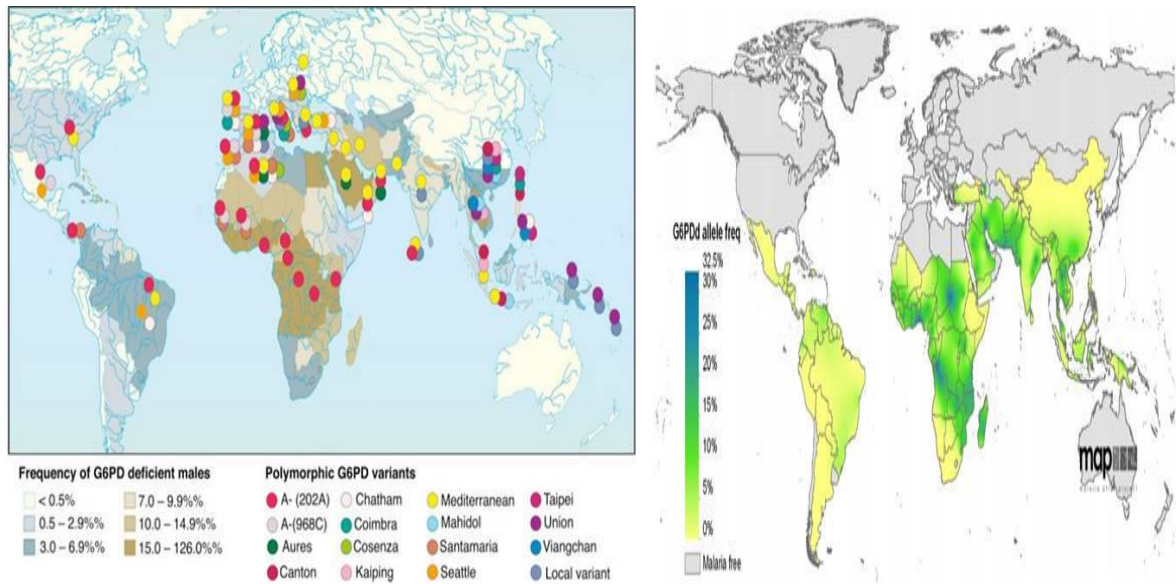
Tên đột biến	Thay thế nucleotide cDNA	Vị trí Codon	Amino acid thay thế	Exon	Lớp	Nơi phát hiện
<i>Đột biến đơn (Missense)</i>						
Việt Nam 1	7G> A	3	Glu → Lys	2	NR	Việt Nam
México DF	193A> G	65	Thr → Ala	4	NR	Mexico
Bahia	197T> A	66	Phe → Thr	4	II	Brazil
Việt Nam 2	197T> G	66	Phe → Cys	4	NR	Việt Nam
San Luis Potosi	376A> T	126	Asn → Tyr	5	II	Mexico
Gaza	536G> A	179	Ser → Asn	6	NR	Palestine
Herlev	592C> A	198	Arg → Ser	6	I / II	Đan Mạch
Coimbra	593G> A	198	Arg → His	6	II	Ấn Độ
San Paulo	660C> G	220	Ile → Met	7	IV	Brazil

Tên đột biến	Thay thế nucleotide cDNA	Vị trí Codon	Amino acid thay thế	Exon	Lớp	Nơi phát hiện
Thượng Hải	691G> C	231	Ala → Pro	7	NR	Trung Quốc
Tunisia	737T> C	246	Arg → Leu	7	III	Tunisia
Zacatecas	770G> T	257	Arg → Leu	7	I	Mexico
Hamburg	827C> T	276	Pro → Leu	số 8	I	Đức
Tunis	920A> C	307	Gln → Pro	9	II	Tunisia
Nefza	968T> C	323	Leu → Pro	9	III	Tunisia
Karachi	973G> A	325	Asp → Asn	9	NR	Pakistan
Quilmes	995C> T	332	Ser → Phe	9	I	Argentina
Vô danh	1088A> T	363	Asn → Ile	10	I	Trung Quốc
Veracruz	1094G> A	365	Arg → His	10	I	Mexico
Vô danh	1187C> G	396	Pro → Arg	10	I	Hàn Quốc
Merlo	1226C> A	409	Pro → Gln	10	I	Argentina
Yucatan	1285A> G	429	Lys → Glu	10	I	Mexico
Tennessee	1465C> G	422	Leu → Val	10	I	Hoa Kỳ
<i>Đột biến kết hợp</i>						
Taif	516-518 del	174	Gly	6	I	Saudi Arabia
Sierra Leona	311G> A	104	Arg → His	5	III	Sierra Leone
	376A> G	126	Asn → Asp			
Palermo	769C> A	257	Arg → Met	7	I	Ý
	770G> T					
Viangchan + Mahidol	871G> A	291	Val → Met	9, 6	II / III	Thái Lan
	487G> A	163	Gly → Ser			
Viangchan + Union	871G> A	291	Val → Met	9, 11	II / III	Thái Lan
	1360C> T	454	Arg → Cys			
<i>Đột biến không mã hoá</i>						
Qingzhen	IVS5-1G> A	-	-	-	NR	-
Vô danh	IVS-VIII 43G> A	-	-	-	III	Tunisia
Vô danh	IVS-V655C>T	-	-	-	III	Tunisia

Các đột biến khác nhau sẽ gây ra bất thường khác nhau trong enzyme, hầu hết dẫn đến giảm độ ổn định hoặc giảm hiệu suất xúc tác của enzyme. Mức độ rối loạn chức năng enzyme được phát hiện trong các biến thể phù hợp với mức độ nghiêm trọng của các biểu hiện lâm sàng<sup>65</sup>. Vì vậy việc phân loại các biến thể G6PD nên dựa trên mức độ thiếu hụt và biểu hiện lâm sàng. Theo phân loại của WHO các biến thể gen G6PD được phân loại thành 4 lớp. Có thể tìm thấy danh sách các biến thể G6PD tại <http://www.bioinf.org.uk/g6pd/db> một cách đầy đủ.



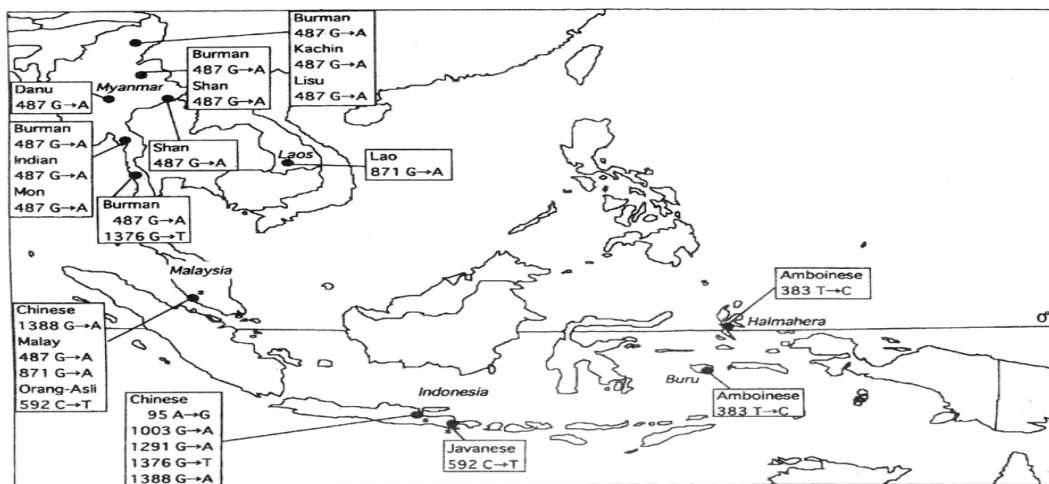
### 1.3.3. Phân bố dạng đột biến theo địa lý



**Hình 1.6. Phân bố các biến thể G6PD hay gặp trên thế giới<sup>63</sup>**

G6PD phân bố phổ biến hơn ở những khu vực có bệnh SR lưu hành hoặc đã từng lưu hành như là ở Châu Phi, Châu Á, Châu Âu và khu vực Địa Trung Hải. Vì đây là bệnh di truyền nên có mối liên quan tỷ lệ và dạng đột biến của mỗi dân tộc có chung nguồn gốc hoặc có mối quan hệ huyết thống lâu đời. Thường gặp những dạng đột biến theo các quốc gia, nhóm dân tộc cụ thể<sup>44</sup>. Khu vực Châu Mỹ và Châu Phi chủ yếu các biến thể của kiểu hình G6PD A(-) và không thấy sự xuất hiện các biến thể khác. Tây Á chủ yếu gặp G6PD Địa Trung Hải; G6PD Kalyan-Kerala<sup>949A</sup> và Orissa<sup>131G</sup> độc quyền tại Ấn Độ; Khu vực Châu Á - Thái Bình Dương có sự đa dạng biến thể G6PD lớn nhất trên toàn cầu, không có biến thể nào chiếm ưu thế mà có tới 10 biến thể cùng xuất hiện: G6PD Mahidol<sup>487A</sup> ở Myanmar và Thái Lan; G6PD Viangchan<sup>871A</sup> hay gặp ở người Lào, Thái Lan, Trung Quốc, Ấn Độ, Philipin, Papua New Guinea. Ở các nước Đông Nam Á trong đó có Việt Nam dạng đột biến thường tập trung ở exon 9, 11 và 12<sup>78</sup>, là những đột biến không nằm ở những domain trực tiếp gắn NADP nhưng lại gần với vùng này do đó có thể làm thay đổi hoạt tính và khả năng bảo vệ HC của G6PD, bệnh nhân chỉ gặp tan máu khi sử dụng thuốc hoặc các tác nhân oxy hoá khác hay nhiễm khuẩn...Exon 9: G6PD

Chatham là dạng đột biến gây giảm hoạt tính G6PD vừa và nhẹ, tìm thấy nhiều ở Philipin và Trung Quốc. Exon 11 hay gặp G6PD Union ở Philipin, Lào, Myanmar, Trung Quốc, Nhật Bản. Exon 12 thường gặp 2 dạng G6PD Canton và Kaiping, gặp rất nhiều ở Nam Trung Quốc (Quảng Đông, Phúc Kiến), gây giảm enzyme nặng hơn. Và cũng tại exon 12, G6PD Kaiping gặp nhiều ở Lào<sup>12</sup>. Ở exon 2, G6PD Gaoha chỉ gặp ở Trung Quốc, ít gặp ở các nước châu Á khác. Khu vực Đông Nam Á còn hay gặp 2 loại đột biến câm do thay đổi nucleotid nhưng không làm thay đổi trình tự acid amin nên được gọi là đột biến câm: Loại thứ nhất gọi là đột biến Silent tại exon 11, điểm đột biến nằm trong vị trí cuối ở codon (1311 C → T) nhưng cả hai bộ ba TAC, TAT đều mã cho Tyrosin nên cấu trúc bậc 1 của G6PD không bị thay đổi, là dạng đột biến câm hay gặp nhất khu vực Đông Nam Á. Dạng đột biến câm thứ 2, ở exon 10 (1116 G → A) còn gọi là G6PD San Luis Potosi, lần đầu được tìm thấy ở Mehico, cũng không làm thay đổi acid amin<sup>79</sup>, dạng này ít gặp ở khu vực Đông Nam Á. (Hình 1.7 và bảng 1.6).



**Hình 1.7. Các dạng đột biến G6PD hay gặp ở vùng Đông Nam Á<sup>78</sup>**

Ở Việt Nam cũng thấy có 8 dạng đột biến hay gặp: G6PD Viangchan, Canton, Kaiping, Union thuộc lớp 2; G6PD Gaohe, Chatham thuộc lớp 3; G6PD Chinese – 5 và Silent. Hay gặp nhất là exon 9 với 3 vị trí 871G, 1003G và 1024C tương ứng G6PD Viangchan, Chatham và Chinese – 5 và dạng đột biến hay gặp nhất là Viangchan. Exon 11 với 2 vị trí 1360C và 1311C tương ứng G6PD Union và Silent., exon 12 cũng với 2 vị trí 1376G và 1388G ứng G6PD Canton và Kaiping và exon 2 là G6PD Gaohe. Những nghiên cứu gần đây đã phát hiện thêm 1 số loại đột biến ở

người Việt Nam (Việt Nam1 (G7A, Glu<sup>3</sup> Lys), Việt Nam2 (T10148G, Phe<sup>66</sup> Cys), Việt Nam3 (C10170 T, Ser<sup>73</sup> Ser)...<sup>17</sup>.

**Bảng 1.4. Các dạng đột biến G6PD hay gặp vùng khu vực Châu Á**

TT	Tên dạng đột biến	Vị trí biến đổi		Acid amin tương ứng	Phân lớp	Địa điểm
		Exon	Nucleocid			
1.	Gaoha	2	95 A → G	32 His → Arg	2	Trung Quốc
2.	Viangchan	9	871 G → A	291 Val → Met	2	Thái Lan, Lào, Ấn Độ, Trung Quốc, Philippin,
3.	Chatham	9	1003 G → A	335 Sla → Thr	3	Philippin
4.	Chinese-5	9	1024 C → T	342 Leu → Phe	2	Trung Quốc, Đài Loan
5.	Union	11	1360 C → T	454 Arg → Cys	2	Philippin, Lào, Trung Quốc, Nhật, Tây Ban Nha, Ý
6.	Canton	12	1376 G → T	459 Arg → Leu	2	Trung Quốc, Myanmar
7.	Kaiping	12	1388 G → A	463 Arg → His	2	Lào, Trung Quốc
8.	Silent	11	1311 C → T	TAT→TAC→ Tyrosin		

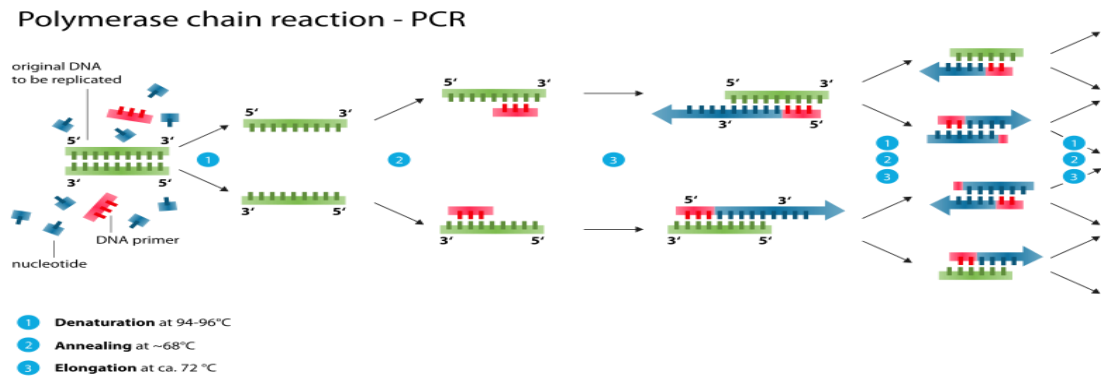
Một số nhà khoa học cũng đặt ra câu hỏi là liệu chúng có nguồn gốc duy nhất cho mỗi dạng đột biến và rồi lan theo dòng người di dân hay không?<sup>29</sup>. Như trong ba dạng đột biến cổ điển G6PD A(+), G6PD A(-), G6PD Med thì G6PD A (-) và G6PD A(+) thường gặp ở Tây Phi, người Mỹ da đen do người Phi di dân đến. Hoặc G6PDUnion phát hiện đầu tiên ở một người Philipin sống trên đảo Hawaii và sau đó lại tìm thấy ở cực rất xa của địa cầu quần đảo Vanuatu ở Tây Nam Thái Bình Dương, sau đó là tìm thấy ở Lào, Trung Quốc, Nhật Bản, Tây Ban Nha, Ý<sup>53,60</sup>. Trong nghiên cứu khác, lại thấy G6PD Coimbra là dạng đột biến rất hay gặp ở người Trung Quốc, đồng thời tìm thấy ở một người đàn ông Indonesia và một người có gốc Đài Loan<sup>12</sup>. Hoặc biến thể Địa Trung Hải được tìm thấy phổ biến ở Nam Âu và Trung Đông, là nguyên nhân gây tan máu cấp tính với hội chứng Favism ở Ý và Hy Lạp cũng thấy gặp nhiều ở Afghanistan<sup>29</sup>.

#### 1.4. Các phương pháp sinh học phân tử phát hiện đột biến G6PD

Trên thế giới cũng như ở Việt Nam đã có rất nhiều phương pháp xác định đột biến gen G6PD bằng PCR thường, phân tích cấu trúc đa hình chuỗi đơn, sử dụng enzyme cắt giới hạn, phân tích đường cong nóng chảy, khuếch đại các đột biến bền với nhiệt, giải trình tự gen...

### 1.4.1. Phương pháp PCR (Polymerase chain Reaction)

Polymerase chain Reaction được phát triển bởi Kary Mullis vào những năm 1980. Đây là một kỹ thuật phổ biến trong sinh học phân tử nhằm nhân bản một hay vài đoạn DNA thành nhiều bản sao. Phản ứng PCR dựa trên nguyên tắc biến tính, hồi tính của DNA bởi nhiệt độ và khả năng của DNA polymerase tổng hợp chuỗi DNA mới bổ sung cho chuỗi mẫu ban đầu<sup>80</sup>.



**Hình 1.8. Các giai đoạn của phản ứng PCR**

1. Giai đoạn biến tính; 2. Giai đoạn gắn mồi; 3. Giai đoạn kéo dài

(Nguồn: <https://en.wikipedia.org/>)

1.4.1.1. Nguyên tắc: Tạo lượng lớn các đoạn DNA đặc thù từ DNA khuôn dựa trên cơ sở hoạt động của DNA-polymerase để tổng hợp sợi mới bổ sung.

1.4.1.2. Các bước tiến hành quy trình: Là một chuỗi gồm nhiều chu kỳ và mỗi chu kỳ gồm 3 giai đoạn:

#### Giai đoạn 1 – Giai đoạn biến tính

Đưa DNA vào dung dịch phản ứng (gồm các thành phần cần thiết cho sự sao chép), tăng nhiệt độ của dung dịch lên tới 90-98°C trong khoảng từ 30 giây -1 phút. Tại nhiệt độ này, các DNA mạch kép bị tách ra (do liên kết hydrô bị đứt), tạo nên các sợi đơn dùng để làm khuôn tổng hợp sợi mới.

#### Giai đoạn 2 – Giai đoạn gắn mồi

Sau giai đoạn 1, lập tức nhiệt độ được hạ xuống từ từ khoảng 37-68°C, nhỏ hơn nhiệt độ  $T_m$  của mồi trong 30s-1 phút. Bổ sung mồi để mồi bắt cặp với sợi khuôn. Mồi được tổng hợp hóa học, có mồi ngược và xuôi. Người ta còn có thể dựa vào trình tự nucleotide ở đầu 3' của khuôn để tổng hợp mồi. Sau đó bổ sung DNA-polymerase để kéo dài mồi.

### *Giai đoạn 2 – Giai đoạn kéo dài (extension)*

Nâng nhiệt phản ứng lên 72°C trong vài chục giây đến 1 phút để DNA-polymerase tổng hợp sợi mới. Thời gian và nhiệt độ phản ứng phụ thuộc vào sợi DNA cần khuếch đại.

Kết thúc một chu kỳ từ một DNA kép mẹ tổng hợp 2 sợi DNA kép con. Phản ứng xảy ra trong 25 đến 40 chu kỳ. Sau chu kỳ cuối, nhiệt độ được duy trì ở 72°C/5-10 phút cho tất cả các sợi đơn xoắn lại và tạo nên sản phẩm của PCR. Rồi hạ xuống 4°C để bảo quản sản phẩm và được kiểm tra bằng cách chạy điện di trên gel agarose 0,8%-2% để phát hiện sự đa hình của các đoạn DNA đặc thù, hoặc DNA bị thay đổi do các tác nhân (đột biến, tái tổ hợp). Trong thực tế, số lượng chu kỳ của phản ứng PCR không vượt quá 40 chu kỳ<sup>80</sup>.

#### *1.4.1.3. Các thành phần và các yếu tố ảnh hưởng của phản ứng PCR:*

+ *DNA khuôn*: Đoạn khuôn DNA (DNA template, DNA target) tinh sạch là yếu tố vô cùng quan trọng, đảm bảo kết quả tạo được các sản phẩm PCR chính xác. Kích thước đoạn khuôn nhỏ hơn 3kb cho kết quả nhân gen tốt nhất. Phản ứng PCR tối ưu với các đoạn khuôn hoàn toàn tinh sạch, ngược lại nếu còn lẫn protein, hiệu quả PCR giảm theo tỷ lệ thuận với độ tinh sạch của DNA khuôn.

+ *Mồi cho phản ứng (Primer)*: Mồi là những đoạn oligonucleotid có chiều dài khoảng 15-30 nucleotid. Để thực hiện nhân một đoạn DNA bằng phản ứng PCR, cần có một cặp mồi thích hợp, bắt cặp đặc hiệu với DNA khuôn. Mỗi cặp mồi gồm 1 mồi xuôi F (Forward) và 1 mồi ngược R (Revert). Mồi xuôi có trình tự acid nucleic tương đồng với trình tự của mạch đơn DNA không mang mã (mạch antisense), mồi xuôi bắt cặp ở đầu 3' của mạch antisense. Mồi ngược có trình tự tương đồng với trình tự của mạch DNA mang mã di truyền (mạch sense) và bắt cặp với mạch sense ở đầu 3'. Nồng độ của mỗi mồi trong phản ứng là 0,1-0,5 μM.

+ *Các nucleotid tự do (dNTP)*: Gồm dATP, dTTP, dGTP, dCTP. Cần chú ý đến tỉ lệ G-C trong đoạn khuôn để xác định hàm lượng mỗi loại dNTP phù hợp. Nồng độ dNTP mỗi loại, thường khoảng 50-200μM. Khi hàm lượng các loại dNTP tự do quá ít, tạo sản phẩm PCR ít không đủ để phát hiện, ngược lại nồng độ quá cao thì phản ứng PCR khó thực hiện.

+ *Enzyme DNA polymerase*: Là yếu tố rất quan trọng, quyết định hiệu quả của phản ứng PCR. Mỗi loại enzyme DNA polymerase có đặc tính và vai trò khác nhau trong phản ứng PCR, thu được các sản phẩm PCR có tính đặc hiệu khác nhau. Một số loại thường được sử dụng trong các phản ứng PCR gồm: *T<sub>4</sub> DNA polymerase*, *Taq DNA polymerase*, *Vent DNA polymerase*, *Tth DNA polymerase*, *Pfu DNA polymerase*... *Enzyme DNA-polymerase*.

+ *Dung dịch đệm cho PCR (Buffer)*: Dung dịch đệm cần đảm bảo thành phần các chất cần thiết cho hoạt động của enzyme DNA polymerase như MgCl<sub>2</sub>, KCl, Tris... Trong đó, ion Mg<sup>2+</sup> là thành phần có ảnh hưởng rõ rệt đến hiệu quả phản ứng PCR, ảnh hưởng đến khả năng bắt cặp và gắn các mồi với mạch khuôn. Để có hiệu quả PCR cao cần lưu ý đảm bảo các thành phần dung dịch đệm, nhiệt độ và các chất cần thiết khi thực hiện phản ứng PCR.

+ *Thiết bị và dụng cụ thực hiện phản ứng PCR*:

Phản ứng PCR là một chuỗi các chu kỳ tuần hoàn nhiệt, do vậy phản ứng PCR phải được thực hiện trong các thiết bị chuyên dụng là các máy PCR. Một máy PCR thông thường, thời gian cho một phản ứng là 3h, với máy hiện đại, có thể giảm xuống còn 30-40 phút hoặc ngắn hơn. Mỗi thiết bị có đặc điểm khuếch đại riêng nên thí nghiệm của một nghiên cứu cần được tiến hành trên cùng một loại thiết bị.

*1.4.1.4. Phân tích sản phẩm PCR*: Khi phản ứng kết thúc, cần phân tích sản phẩm PCR để có thể xác định mức độ thành công của phản ứng. Phương pháp thông thường nhất xác định kích thước các đoạn DNA nhờ điện di trên gel agarose. Tuy nhiên một số phương pháp phân tích khác cho phép chúng ta theo dõi động học của phản ứng trong mỗi chu kỳ mà không cần điện di. Sự thành công hay thất bại của phản ứng có thể được xác định bằng các cách sau: Có sản phẩm của phản ứng không? Có các sản phẩm phụ không?; Kích thước của sản phẩm có đúng như dự kiến không?; Tùy thuộc vào mức độ thành công của phản ứng PCR đầu tiên mà chúng ta có thể thay đổi các điều kiện để tối ưu hóa quy trình phản ứng.

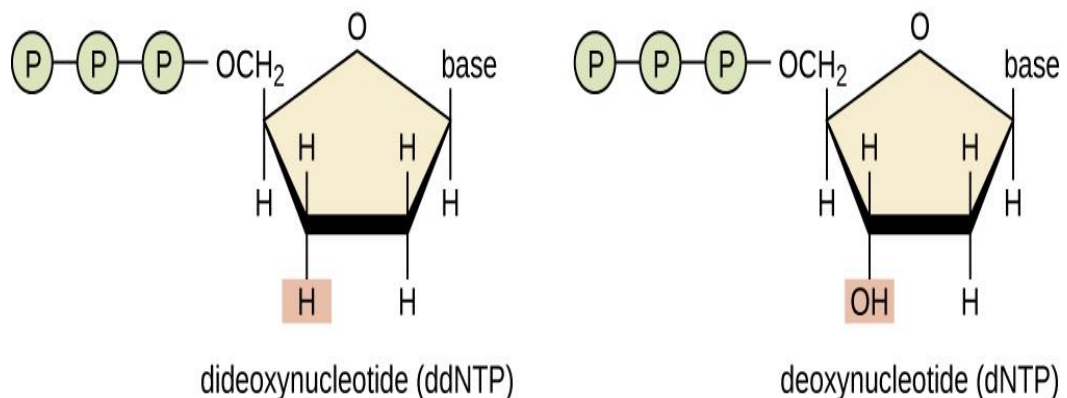
### 1.4.2. Giải trình tự gen (DNA sequencing).

Từ kỹ thuật PCR khuếch đại các đoạn gen mong muốn, sau đó thực hiện kỹ thuật giải trình tự gen để phục vụ nghiên cứu. Giải trình tự gen là phương pháp xác định vị trí sắp xếp của của 4 loại nucleotid: A (Adenin), T (Thymine), G (Guanine), C (Cytosine) trên phân tử DNA. Hiện nay, người ta thường sử dụng hai phương pháp giải trình tự đó là phương pháp dideoxynucleotid và giải trình tự bằng máy tự động. Ngoài ra, giải trình tự thế hệ mới được đưa vào sử dụng với ưu điểm cho phép xác định đồng thời nhiều trình tự DNA đích trong một lần chạy cho phép tăng hiệu suất và giảm chi phí thực hiện.

Các phương pháp giải trình tự gen:

#### 1.4.2.1. Phương pháp dideoxynucleotid (enzyme)- Phương pháp Sanger:

Được phát minh nhờ Frederick Sanger vào năm 1977. Thành phần của kỹ thuật này bao gồm DNA sợi đơn cần được giải trình tự; enzyme DNA polymerase; đoạn mồi deoxynucleotidetriphosphate (dNTPs) và một hành phần đặc biệt là di-deoxynucleotidetriphosphate (ddNTPs). Là một phân tử nhân tạo, cấu trúc của ddNTP tương tự như phân tử deoxynucleotid (dNTP), tuy nhiên ở carbon số 3 của đường deoxyribose không phải là nhóm hydroxyl (-OH) mà là -H. Các ddNTP có nhiệm vụ dừng việc tổng hợp mạch bổ sung do không hình thành được liên kết phosphodiester. Các ddNTP tham gia vào phản ứng tại nhiều thời điểm khác nhau và tạo ra các sợi đơn DNA có kích thước khác nhau.



**Hình 1.9. Cấu trúc của ddNTP**

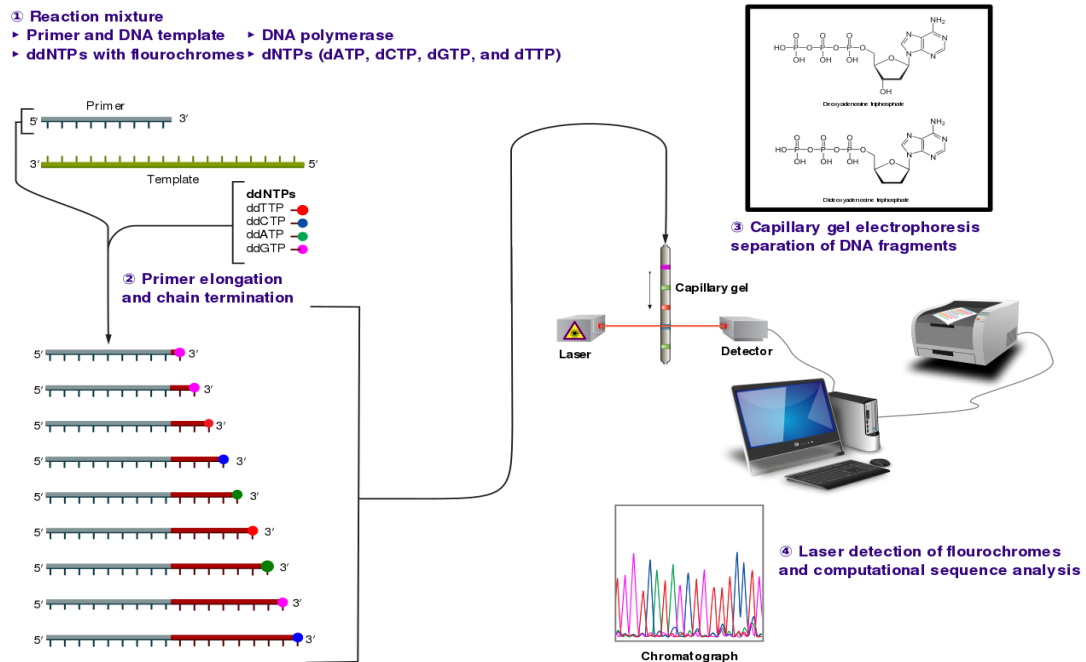
(Nguồn: <http://bio.libretexts.org>)

Để thực hiện kỹ thuật giải trình tự gen, đầu tiên khuếch đại đoạn DNA cần giải trình tự. Sử dụng một đoạn mồi bổ sung với trình tự của vector và gắn vào đầu 3' của vector gần vị trí chèn DNA. Phản ứng sau đó được tiến hành trong 4 ống nghiệm, mỗi ống được cung cấp thêm DNA polymerase, 4 loại dNTP tự do và một trong 4 dideoxynucleic (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP). Nồng độ của mỗi ddNTP được điều chỉnh thận trọng, với một lượng nhỏ khoảng 1%. Trong quá trình tổng hợp chuỗi, enzyme DNA polymerase sẽ gắn các dNTP vào để kéo dài chuỗi. Do hàm lượng rất thấp nên thỉnh thoảng mới có 1 dideoxynucleotid được gắn vào chuỗi và lúc đó phản ứng tổng hợp chuỗi bị dừng lại. Như vậy trong mỗi ống phản ứng chứa các mạch đơn DNA có chiều dài khác nhau và ở đầu 3' của các đoạn DNA chứa một ddNTP tương ứng đã cho vào ống đó. Tiến hành điện di 4 ống phản ứng trên 4 hàng của một gel polyacrylamide để phân tách các đoạn DNA. Do một trong 4 dNTP có đánh dấu phóng xạ nên khi dùng kỹ thuật phóng xạ tự ghi, các mạch đơn trên gel điện di sẽ tạo ra các vạch sáng trên phim X quang. Giải trình tự Sanger có thể thực hiện với các đoạn DNA khoảng 400 – 900 cặp base.

#### *1.4.2.2. Giải trình tự bằng máy tự động:*

Năm 1986 thiết bị giải trình tự tự động dựa trên phương pháp của Sanger được phát minh bởi Lloyd M. Smith và được sản xuất bởi công ty Applied Biosystems. Hệ thống máy gồm nhiều mao quản chứa gel polyacrylamide cho phép phân tích nhiều mẫu một lần điện di. Các ddNTP được đánh dấu huỳnh quang với 4 màu khác nhau, nhờ vậy phản ứng giải trình tự có thể được thực hiện trong một ống nghiệm và chỉ cần điện di trên một hàng. Hệ thống detector gồm các camera có chùm tia sáng laser đi qua nó để ghi nhận tín hiệu huỳnh quang một cách chính xác. Nguyên tắc hoạt động của máy là trong suốt quá trình điện di, khi có một vạch điện di đi qua chùm tia laser thì phân tử ddNTP cuối cùng ở đầu 3' của đoạn DNA sẽ phát ra một màu huỳnh quang tương ứng và được camera ghi nhận lại thành một cường độ đỉnh sáng trong biểu đồ. Dựa vào biểu đồ này, máy sẽ phân tích các đỉnh cường độ sáng, so sánh với các màu, nhận diện được loại nucleotid và cho ra trình tự DNA đích.





**Hình 1.10. Giải trình tự gen trên máy giải trình tự gen tự động**

(Nguồn: [http://en.wikimedia.org/wiki/sanger\\_sequencing](http://en.wikimedia.org/wiki/sanger_sequencing))

Các bước giải trình tự trên máy tự động:

Bước 1: PCR đoạn gen cần giải trình trình tự và tinh sạch sản phẩm PCR

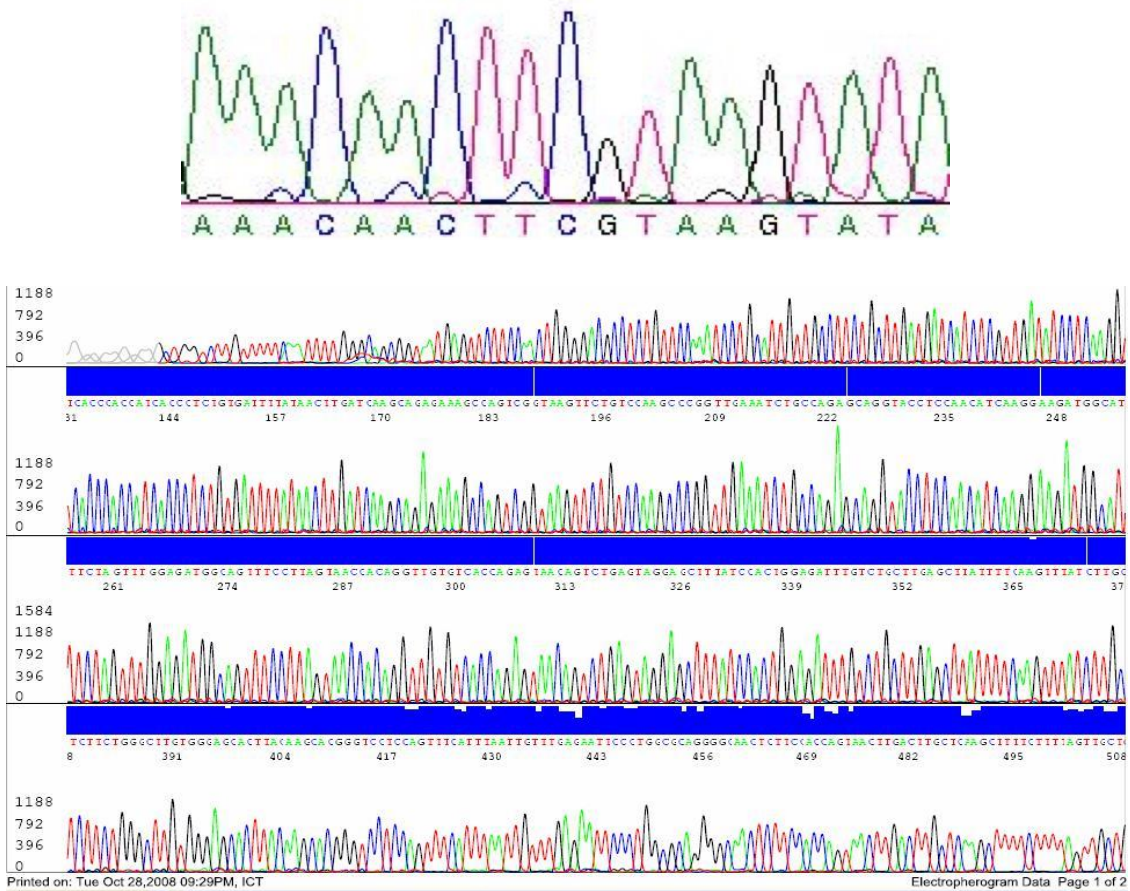
Bước 2: Thực hiện phản ứng chu trình giải trình tự trên máy tự động với một trong hai môi xuôi hoặc môi ngược và các thành phần cần thiết khác.

Bước 3: Tủa sản phẩm giải trình tự và loại bỏ chất đánh dấu thừa

Bước 4: Điện di mao quản sản phẩm trên máy và đọc kết quả.

Nghiên cứu được thực hiện trên máy giải trình tự gen tự động, đem lại kết quả nhanh chóng và chính xác của các gen cần nghiên cứu, giúp phát hiện chính xác các đột biến xảy ra trên gen. Đồng thời tăng khả năng phát hiện các đột biến mới chưa được phát hiện.

Trình tự gen được đối chiếu và so sánh với trình tự gen trên Genbank (NCBI). Phương pháp này cho phép phát hiện tất cả các đột biến, đặc biệt là các đột biến điểm, do đó kỹ thuật này được áp dụng cho việc phát hiện một số SNP không có vị trí cắt enzyme giới hạn của gen.



**Hình 1.11. Hình ảnh giải trình tự gen trên máy giải trình tự gen tự động**  
(Nguồn Trung tâm Gen - Protein, Trường Đại học Y Hà Nội).

Ngoài ra, hiện nay tùy thuộc vào từng quốc gia, từng bệnh viện, một số kỹ thuật sinh học phân tử đã được sử dụng trong xác định đột biến gen G6PD như kỹ thuật phân tích cấu trúc đa hình thái chuỗi đơn (SSCP: Single - Strand Conformation Polymorphism analysis); kỹ thuật đa hình chiều dài sử dụng enzyme cắt giới hạn RFLP-PCR (RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism), Phương pháp PCR - MPTP (Multiplex Tandem forward Primer) Phương pháp PCR-ARMS: (ARMS: Amplification Refractory Mutation System) hoặc Phương pháp Realtime PCR - HRM (HRM: High Resolution Melt)...

## 1.5. Tổng quan tình hình nghiên cứu trên thế giới và Việt Nam

### 1.5.1. Trên thế giới

Cho đến nay, đã có nhiều nghiên cứu về bệnh thiếu G6PD trên toàn thế giới trên tất cả các mặt từ dịch tễ, tần xuất thiếu cho đến đặc điểm di truyền, chẩn đoán,

mối liên quan hoạt động enzyme với các tác nhân gây tan máu,... và ngày càng làm sáng tỏ hơn về bệnh.

Sự thiếu hụt G6PD đã được công nhận là bệnh lý enzyme phổ biến nhất, ảnh hưởng đến gần hơn 400 triệu người trên toàn thế giới<sup>35</sup>, trung bình mỗi năm làm 4100 người chết<sup>81</sup>. Các điều tra về mặt dịch tễ học đã ghi nhận rằng có sự gia tăng tỷ lệ mắc bệnh ở các quốc gia có nguy cơ cao, thường liên quan đến nhân khẩu học sống trong vùng SR đã và đang lưu hành Bệnh gặ ở tất cả các nhóm dân tộc, chủng tộc khác nhau<sup>32,59</sup>. Tần suất thiếu hụt enzyme G6PD khác nhau tùy thuộc vào dân tộc và vùng địa lý, cao nhất là các khu vực Địa Trung Hải, châu Phi, Trung Đông, Châu Mỹ Latinh và Nam Á, ít gặp hơn ở Bắc Âu. Cụ thể: Ở Châu Phi tỷ lệ này là 1,2- 30.7% (Ivory Coast 30%, Ghana 26%, Burkina Faso 25%, Gabon 22%); ở Địa Trung Hải 4–30%. Châu Mỹ 1.3-9,7% trong đó Mỹ Latinh, dao động từ <2% ở các nước như Guatemala, Mexico và Peru đến 16% ở Honduras, Venezuela ~ 4%<sup>82,83</sup>; Châu Âu tỷ lệ: 0,2-11.9% gặp nhiều ở Hy Lạp và Ý, Trung Đông 2-17% và hiếm gặp ở Châu Thái Bình Dương<sup>78</sup>. Châu Á có tỷ lệ 3,1-28.5%, có ba điểm nóng đáng chú ý với tỷ lệ thiếu hụt G6PD > 20%: các nhóm bộ lạc Orissa-Ấn Độ, biên giới phía bắc Lào/Thái Lan và quần đảo Solomon Islands. Tại Ấn Độ tác giả Devi ST cho thấy tỷ lệ thiếu G6PD ở vùng SR lưu hành nặng là 14.13%, vùng SR lưu hành nhẹ chỉ 5.5%. Tỷ lệ thiếu enzyme chung ở khu vực Đông Nam Á, Địa Trung Hải và New Papue Gunea là 0,5-30%. Ở Lào 7,2%; Thái Lan 7-33%; Indonesia 3,7%; Myanmar 4,4%; Philippin 8- 12%; Đài Loan và Nam Trung Quốc 2-16%, Việt Nam dao động 0,5 - 30%. Gần đây, nhóm tác giả tại các nước tiểu vùng sông Mê Kông mở rộng cho thấy tỷ lệ thiếu G6PD có sự khác nhau giữa các tỉnh thành trong các quốc gia: tỷ lệ chung 10,4% ở nam và 3,4% ở nữ trong đó ở Campuchia từ 10,8 đến 29,6%, 5,1% đến 14,8% ở CHDCND Lào, 6,7% và 8,2% ở Thái Lan và 6,9% và 11,4% ở Việt nam<sup>10</sup>. Các tác giả cũng nói rằng do quá trình toàn cầu hóa và đi kèm sự di cư gây sự thay đổi đáng kể về nhân khẩu học dân số. Do đó, tồn tại các nhóm dân cư bị ảnh hưởng bởi bệnh này ở phần lớn các quốc gia và gia tăng tỷ lệ mắc ở những quốc gia mà trước đây được coi là hiếm gặp<sup>59</sup>. Ví dụ, ở Hoa Kỳ, trước đây chủ yếu hay gặp ở những người gốc Phi thì gần đây, tần suất dân số bị khoảng 10-14%, đặc biệt các nam giới da đen và 24% là người mang mầm bệnh. Một ước tính gần đây cho thấy khoảng 8% dân số thế giới thiếu enzyme G6PD, dao động từ thấp nhất 0,1% ở Nhật Bản và một số nước khu vực châu Âu đến cao nhất 35% ở châu Á<sup>59,74</sup>. Các điều tra về mặt di truyền cho thấy nam bị ảnh

hường nhiều hơn so với nữ giới, tuy nhiên kiểu gen phổ biến nhất là nữ dị hợp tử<sup>31</sup>. Tỷ lệ phổ biến bệnh có liên quan đến các bệnh lý khác, đặc biệt là những bệnh ảnh hưởng đến HC (bệnh huyết sắc tố, HC hình liềm và bệnh thalassemia)<sup>84</sup>

Qua các giai đoạn, WHO cho thấy mức độ nghiêm trọng của bệnh tùy thuộc vào hoạt động của enzyme còn lại và liên kết cơ chất, phân loại bệnh thành 5 loại<sup>8,85,86</sup>. Số lượng các biến dạng đột biến phát hiện tăng dần, năm 2012, là 186, năm 2016 lên 217 với 442 biến thể trong đó 68 đột biến thuộc phân lớp I, mã hóa vị trí gắn chất nền dimer cấu trúc NADP<sup>+</sup> và dẫn đến kiểu hình nghiêm trọng, thiếu máu tan máu HC không hình cầu mạn tính với hoạt tính enzyme dưới 10%, chiếm tần số tương đối cao trên tổng số đột biến điểm được xác định. Loại này tập trung chủ yếu ở các exon 6, 8, 10, 13, cao nhất tại exon 10. Gần 90% đột biến tìm thấy là đột biến điểm, hiếm gặp đột biến xóa đoạn hay đột biến xảy ra trên intron<sup>9,65</sup>. Mỗi dạng đột biến gây ra những bệnh cảnh và mức độ nặng nhẹ khác nhau như thiếu máu tan huyết, vàng da, đái huyết sắc tố, suy thận và hầu hết phải có sự tấn công của các chất oxy hóa như một số thức ăn, một số loại thuốc hay nhiễm khuẩn<sup>35</sup>. Các loại đột biến được tìm thấy thường phân bố có tính khu vực<sup>16,29,52,66</sup>

### **1.5.2. Tại Việt Nam**

Đầu tiên, một số tác giả nghiên cứu về tỷ lệ thiếu G6PD liên quan đến bệnh SR như Hoàng Văn Sơn, Đoàn Hạnh Nhân, Tạ Thị Tĩnh, ... trên một vài nhóm dân tộc chưa tìm được mối liên quan nào giữa SR và thiếu G6PD. (<http://www.impeqn.org.vn/impeqn/vn/portal/InfoDetail.jsp?area=58&cat=944&ID=11629>). Từ năm 1996-1997 Tạ Thị Tĩnh và CS có nghiên cứu chọn ngẫu nhiên trên 1.676 nam sinh tuổi từ 6-15 tại 8 huyện thuộc 4 tỉnh (Hoà Bình, Hà Giang, Sơn La, Thanh Hoá) cho thấy thiếu G6PD có tỷ lệ cao tại một số vùng SR nhẹ như Kim Bôi 34,1%, Mai Châu 20,4%, Như Xuân 19,7%, Mường La 17,8% và thấp tại một số vùng SR không lưu hành như Mèo Vạc 0,3% và Nga Sơn 0,5%. Các dân tộc khác nhau cho kết quả khác nhau, cao nhất là nhóm dân tộc Mường 31%, Thổ 22,6% và Thái 19,3%, thấp nhất ở nhóm Kinh 0,5% và Mông 0,3%. Một nghiên cứu khác cũng của tác giả này tại Gia Lai, Bình Phước nơi SR nặng cho biết tỷ lệ thiếu G6PD của dân tộc Gia Rai, Ba Na, X'Tiêng tương ứng là 2,3%; 1,7% và 3,4% và không thấy có mối liên quan giữa thiếu G6PD với bệnh SR<sup>87</sup>. Tác giả Hoàng Hạnh Phúc khi điều tra tỷ lệ thiếu enzyme G6PD trong phổ thông cơ sở trong học sinh dân tộc Kinh tại Hà Nội là 0,86%, Hoà Bình là 4,53%, Mường tại Hoà Bình là 11 36%. Theo Nguyễn Thọ Viễn khi nghiên cứu thấy tỷ lệ thiếu enzyme G6PD có KSTSR tới 60,71%, trong đó thiếu

hoàn toàn tới 25%, người không có KSTSR là 37,04% và thiếu hoàn toàn là 6,79% và có kết luận thiếu G6PD có liên quan đến SR. Cùng nội dung này, Đoàn Hạnh Nhân và CS nghiên cứu thiếu G6PD ở khu vực miền Bắc Việt Nam thấy tỉ lệ cao tại một số vùng SR lưu hành như Kim Bôi 34,1%; Mai Châu 20,4%; Như Xuân 19,7%; Mường La 17,8% và thấp tại vùng không có SR lưu hành như Mèo Vạc 5,3% và Nga Sơn 0,5%; Trần Thị Chính, Nguyễn Thị Ngọc Dao và CS ở người kinh Hà Nội và quanh Hà Nội là 1,75%; Huỳnh Thị Diễm Thúy vào năm 2004 nghiên cứu tại 3 tỉnh với tỷ lệ chung là 3.4% (Hải Phòng 2,5%, Thanh Hóa 3,8%, Thái Nguyên 4%) và không có sự khác biệt giữa 3 dân tộc Kinh, Tày, Mường<sup>15,88</sup>.

Việc xác định các biến thể tại Việt Nam vẫn với cỡ mẫu nhỏ, nên cho thấy tỷ lệ thiếu enzyme G6PD khác nhau ở nhiều vùng và nhiều nhóm dân tộc. Các dạng đột biến thường gặp tại Việt Nam phần lớn thuộc các exon 2, 9, 11, 12 như: Viangchan, Canton, Kaiping, Union thuộc lớp II; Gaohe, Chatham, Chinese - 5 thuộc lớp III, phát hiện đột biến Silent trên exon 11, 1311C>T (TAC>TAT), xuất hiện với tần suất tương đối cao, đồng thời cùng một số đột biến khác như Viangchan và Canton<sup>15-18,87,89</sup>. Nguyễn Thị Huệ và CS trên 30 trẻ sơ sinh nam dân tộc Kinh cũng đã thấy 7 loại đột biến chủ yếu trên exon 9, 11, 12, không tìm thấy đột biến trên các exon 3, 4, 6, 7, 10, 13. Trong đó Viangchan và Canton là hai loại đột biến gặp nhiều nhất trong nghiên cứu với tỷ lệ lần lượt là 43,33% và 26,6%.<sup>16,89</sup> Kết quả này phù hợp với nhận định của các nghiên cứu nhận thấy hot spot ở các nước châu Á là ở exon 9, 11, 12. Ngoài ra, qua các nghiên cứu của các tác giả Việt Nam cũng đã đóng góp vào cơ sở dữ liệu đột biến gen G6PD cho ngân hàng gen với 5 đột biến phát hiện lần đầu tiên tại Việt Nam như G6PD Bao Loc (118 Tyr > His)<sup>90</sup> Vietnam1 (3Glu > Lys), Vietnam2 (66Phe > Cys), Vietnam3 (73Ser > Ser)<sup>17</sup>, năm 2017 lần đầu phát hiện thêm 1 biến thể được đặt tên G6PD Ho Chi Minh (173 A>G; 58 Asp>Gly)<sup>91</sup>.

## Chương 2

### ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

**Mục tiêu 1:** Gồm 350 bệnh nhi thuộc các tỉnh phía Bắc, đến khám và được chẩn đoán thiếu enzyme G6PD tại bệnh viện Nhi Trung ương

➤ **Tiêu chuẩn lựa chọn.**

- Dưới 16 tuổi tại thời điểm chẩn đoán.
- Có kết quả định lượng hoạt độ enzyme G6PD dưới  $200 \text{ IU}/10^{12} \text{ HC}^{63,92}$ .

➤ **Tiêu chuẩn loại trừ:** Không đồng ý tham gia nghiên cứu.

**Mục tiêu 2:** Theo các tỷ lệ các đột biến phát hiện được từ mục tiêu 1 tiếp tục chọn các hộ gia đình cho mục tiêu 2. Theo tỷ lệ này chọn được 25 gia đình:

TT	Loại biến thể	Exon	Tỷ lệ từ mục tiêu 1	Tỷ lệ mục tiêu 2 theo gia đình
1	Gaohe (c.95A>G)	2	7,4%	2 (8%)
2	Orissa (c.131C>G)	3	1,1%	1 (4%)
3	Quing Yan (c. 392G>T)	5	3,7%	1 (4%)
4	Valladolid (c. 406 C>T)	5	0,6%	1 (4%)
5	NanKang (c.517 T>G)	6	0,3%	1 (4%)
6	Địa Trung Hải (c. 563 C>T)	6	0,3%	1 (4%)
7	Comibra Shunde (592 C>T)	6	0,3%	1 (4%)
8	Viangchan (c.871G>A)	9	24,9%	5 (20%)
9	Chinese-5 (c.1024C>T)	11	4,3%	1 (4%)
10	Taiwan2 (c.1330G>A)	11	0,3%	0
11	Union (c.1360C>T)	11	14,9%	3 (12%)
12	Canton (c.1376G>T)	12	18%	4 (16%)
13	Kaipping (c.1388G>A)	12	20,9%	4 (16%)
<b>Tổng số</b>			<b>100%</b>	<b>25 (100%)</b>

Sau đó, bằng cách gọi điện thoại, hẹn đến tận nhà lấy mẫu toàn bộ các thành viên của gia đình. Việc lấy mẫu, đóng gói, vận chuyển bệnh phẩm theo quy định của thông tư 40/2018/TT-BYT Thông tư quy định về quản lý mẫu bệnh phẩm bệnh truyền nhiễm về đóng gói và vận chuyển mẫu bệnh phẩm.

Tiêu chuẩn loại trừ: Các thành viên của gia đình không đồng ý hợp tác tham gia xét nghiệm.

## 2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

\* **Thời gian nghiên cứu:** Từ năm 2017 – 2020

\* **Địa điểm nghiên cứu:**

- Bệnh viện Nhi Trung Ương
- Trung tâm Nghiên cứu Gen và Protein, Trường Đại học Y Hà Nội.

## 2.3. Phương pháp nghiên cứu

**2.3.1. Thiết kế nghiên cứu:** Nghiên cứu tiến cứu, mô tả cắt ngang.

**2.3.2. Cỡ mẫu nghiên cứu:**

Số lượng bệnh nhân theo phương pháp chọn mẫu có chủ đích. Bên cạnh đó chúng tôi sử dụng công thức tính cỡ mẫu ước lượng theo tỷ lệ phát hiện đột biến đột biến của 1 nghiên cứu trước đó. Công thức tính như sau:

$$n = Z^2_{(1-\alpha/2)} \cdot \frac{pq}{\Delta^2}$$

n: Cỡ mẫu nghiên cứu.

Z: Hệ số giới hạn tin cậy (với  $\alpha=0,01$  ta có  $Z^2_{(1-\alpha/2)}=2,56$ )

p: Tỷ lệ ước lượng của quần thể tại thời điểm nghiên cứu (dựa vào kết quả của nghiên cứu trước).

q: 1-p

$\Delta$ : Khoảng sai lệch mong muốn giữa tỷ lệ thu được từ cỡ mẫu (p) và tỷ lệ của quần thể (p). Khoảng sai lệch này được xác định tùy theo ý tưởng của người nghiên cứu. Khi xác định tỷ lệ đột biến gen ở bệnh nhân thiếu hụt enzyme G6PD chúng tôi sử dụng công thức tính cỡ mẫu của qua một tỷ lệ. Vì đây là xét nghiệm

sinh học phân tử các xét nghiệm khá tốn kém, kinh phí có hạn nên chúng tôi chấp nhận sai số tương đối giữa tỷ lệ thật với tỷ lệ ước lượng ( $\epsilon$ ) là 5% (0,05).

Cụ thể nghiên cứu này dựa trên một nghiên cứu tỷ lệ phát hiện đột biến của gen G6PD của tác giả Nguyễn Thị Huệ trên 30 bệnh nhân<sup>16</sup> là 87,9%

Như vậy số bệnh nhi tối thiểu của mẫu cần lấy ở các dân tộc để xác định tỉ lệ thiếu hụt G6PD được tính và số mẫu thực tế thu thập được như sau:

$$n = 2,56^2 \frac{87,9.(100-87,9)}{5^2} = 279$$

Đồng thời chúng tôi dự kiến 20% của cỡ mẫu trên không tham gia nên cỡ mẫu dự kiến là:  $279 + (279 \times 0,2) = 335$ . Và thực tế cỡ mẫu chúng tôi lấy là 350.

### **2.3.3. Chỉ số và nội dung nghiên cứu**

#### **2.3.3.1. Chỉ số nghiên cứu**

- Các thông số lâm sàng nghiên cứu:

+ Tuổi: Chia làm 3 nhóm

+ Giới: Nam, nữ

+ Dân tộc: Theo các dân tộc của người Việt Nam

- Hoạt độ G6PD được định lượng theo quy trình kỹ thuật của khoa Hoá sinh viện Nhi Trung ương.

Phân loại mức độ thiếu enzyme dựa trên căn cứ chẩn đoán chia các lớp của WHO 2019<sup>8</sup>, được tính dựa trên tỷ lệ % so với giá trị bình thường (theo tiêu chuẩn chẩn đoán của Viện Nhi Trung Ương, thiếu enzyme G6PD khi dưới 200 IU/10<sup>12</sup>HC).

+ Thiếu nặng hoạt động G6PD dưới 10% so với giá trị bình thường (tương ứng: < 20 IU/10<sup>12</sup>HC)

+ Thiếu trung bình hoạt độ G6PD từ 10% đến 60% (tương ứng: 20-120 IU/10<sup>12</sup>HC)

+ Thiếu thiếu vừa nhẹ: hoạt độ G6PD trên 60% (tương ứng: 120 - 200 IU/10<sup>12</sup>HC)



- Các chỉ số dòng HC (SLHC, Hb, Ht, MCV, MCH, MCHC)

**Bảng 2.1. Khoảng tham chiếu các xét nghiệm dòng hồng cầu**

(Tham khảo Sổ tay khoảng tham chiếu của viện Nhi Trung ương)

	Hb (g/dl)		HCT (%)		SLHC (10 <sup>12</sup> /L)		MCV(fl)		MCH (pg)		MCHC (g/dl)	
	TB	- 2SD	TB	- 2SD	TB	- 2SD	TB	- 2SD	TB	- 2SD	TB	- 2SD
1 tuần	17,5	13,5	54	42	5,1	3,9	107	88	34	28	33	28
2 tuần	16,5	12,5	51	39	4,9	3,6	105	86	34	28	33	28
1 tháng	14,0	10,0	43	31	4,2	3,0	104	85	34	28	33	29
2 tháng	11,5	9,0	35	28	3,8	2,7	96	77	30	26	33	29
3-6 tháng	11,5	9,5	35	29	3,8	3,1	91	74	30	25	33	30
0,5-2 tuổi	12,0	10,5	36	33	4,5	3,7	78	70	27	23	33	30
2-6 tuổi	12,5	11,5	37	34	4,6	3,9	81	75	27	24	34	31

Trong đó theo Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị Nhi khoa (2018) và của Tổ chức y tế thế giới cho thấy thiếu máu khi nồng độ Hb < TB - 2SD, tính tổng các giai đoạn từ sơ sinh đến 6 tuổi: 111,25 g/l và chia cụ thể theo lứa tuổi tương ứng:

- Sơ sinh: <135 g/l
- 2-6 tháng: <95 g/l
- 6 tháng - 2 tuổi: <105g/l
- 2-6 tuổi: < 110g/l

- Các dạng đột biến gen *G6PD*: Bằng các phương pháp sinh học phân tử: PCR, giải trình tự gen tại trung tâm nghiên cứu Gen Protein trường Đại học Y Hà Nội.

### 2.3.3.2. Nội dung nghiên cứu

- Nhận xét một số đặc điểm chung của nhóm nghiên cứu theo tuổi, giới, địa dư, dân tộc và các chỉ số dòng hồng cầu (SLHC, Hb, Ht, MCV, MCH, MCHC)
- Mục tiêu 1: Xác định đột biến của gen G6PD ở bệnh nhân thiếu hụt enzyme G6PD
  - + Xác định các loại đột biến và sự kết hợp các đột biến này ở bệnh nhi thiếu enzyme G6PD theo định lượng hoạt độ G6PD.
  - + Xác định tỷ lệ đột biến trên các exon của gen G6PD.
  - + Xác định tỷ lệ từng loại đột biến của gen G6PD trên từng dân tộc.
  - + Xác định tỷ lệ từng loại đột biến của gen G6PD theo mức độ thiếu hụt enzyme G6PD.
  - + Xác định tỷ lệ từng loại đột biến của gen G6PD theo phân lớp của WHO.
  - + Xác định tỷ lệ từng loại đột biến của gen G6PD theo hoạt động enzyme và kiểu gen.
- Mục tiêu 2: Phân tích đột biến gen G6PD ở một số gia đình bệnh nhi thiếu hụt của nhóm nghiên cứu.
  - + Nhận xét một số đặc điểm địa dư, dân tộc của các gia đình bệnh nhi thiếu hụt enzyme G6PD
  - + Xác định tỷ lệ thiếu enzyme G6PD và tỷ lệ đột biến gen G6PD ở các gia đình.
  - + Xác định tỷ lệ thiếu enzyme G6PD và tỷ lệ đột biến gen G6PD ở các thế hệ trong các gia đình.
  - + Phân tích đặc điểm loại đột biến gen G6PD với hoạt độ enzyme và kiểu di truyền ở các gia đình.
  - + Phân tích đặc điểm kiểu di truyền loại đột biến gen G6PD theo các thế hệ ở các gia đình.
  - + Xác định tỷ lệ từng loại đột biến của gen G6PD theo hoạt động enzyme và kiểu gen ở các gia đình.

## **2.4. Vật liệu và các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu**

### **2.4.1. Vật liệu**

- Bệnh phẩm: Lấy 2 ml máu tĩnh mạch chống đông bằng EDTA với hàm lượng 1,5 mg/mL các người thân trong gia đình có cháu bé được chẩn đoán thiếu enzyme G6PD. Quy trình lấy máu đảm bảo vô trùng tuyệt đối.

- Định lượng enzyme G6PD bằng máy hóa sinh tự động AU5800/AU680 và các hóa chất đi kèm

- Xét nghiệm tổng phân tích tế bào máu ngoại vi: Máy huyết học tự động: ADVIA 2120i của hãng Sieenzymes và các hóa chất đi kèm.

- Các kỹ thuật xét nghiệm sinh học phân tử: Dụng cụ và trang thiết bị cần thiết theo từng kỹ thuật.

### **2.4.2. Các kỹ thuật xét nghiệm trong nghiên cứu**

- Kỹ thuật định lượng hoạt độ G6PD.

Được tiến hành bằng phương pháp định lượng của máy hóa sinh tự động AU5800/AU680 hiện đại, tại khoa Sinh Hoá bệnh viện Nhi Trung ương chất lượng được kiểm soát theo tiêu chuẩn ISO 15189: 2012 đã được phê duyệt và chứng nhận..

- Kỹ thuật tổng phân tích các tế bào máu

Được tiến hành bằng phương pháp bằng máy ADVIA 2120i hiện đại, tại khoa Huyết học bệnh viện Nhi Trung ương chất lượng được kiểm soát theo tiêu chuẩn ISO 15189: 2012 đã được phê duyệt và chứng nhận..

- Các kỹ thuật xét nghiệm sinh học phân tử: Được thực hiện tại Trung tâm Gen – Protein trường Đại học Y Hà Nội với quy trình bao gồm:

+ Dụng cụ trang thiết bị và hóa chất

- **Dụng cụ, trang thiết bị**

- Máy ly tâm lạnh Eppendorf 5424R Centrifuge.

- Máy ly tâm E-Centrifuge WEALTEC

- Máy vortex (Eppendorf MixMate)

- Máy lắc ủ (Eppendorf Thermomixer 5437)
- Máy quang phổ vi định lượng NanoDrop 1000 Thermo Scientific (USA)
- Máy PCR Eppendorf Mastercycler® Pro (Đức)
- Máy điện di mini gel Thermo Scientific™ Owl™ EasyCast™ B2 (USA)
- Máy soi gel và chụp ảnh tự động (UVP Bio Chemi HP Darkroom)
- Cân điện tử (AB204)
- Lò vi sóng Saiko
- Máy đọc trình tự gen ABI 3500 Genetic Analyzer (USA)
- Tủ lạnh sâu -30°C ARCTIKO
- Tủ lạnh sâu -80°C Ultra low SANYO
- Tủ lạnh 4°C
- Tủ sấy, tủ ẩm
- Các phần mềm: NanoDrop 2000 và VisionWorks LS.
- Ống lấy máu chống đông EDTA
- Dụng cụ thủy tinh, cốc thủy tinh, ống đong
- Pipet, đầu côn các loại
- Ống Eppendorf 1,5ml, 0,5ml, 0,2ml.
- Giá ống nghiệm cho ống Eppendorf và ống lấy máu chống đông EDTA
- Găng tay, khẩu trang, giấy thấm vô trùng

- **Hóa chất**

- Hóa chất dùng để tách chiết DNA theo kit The Wizard Genomic DNA Purification của hãng Promega: Dung dịch Cell Lysis Solution, Nuclei Lysis Solution, RNase Solution, dung dịch Protein Precipitation Solution, Isopropanol, DNA Rehydration Solution; Dung dịch ethanol 70%

- Hoá chất để thực hiện kỹ thuật PCR: Nước cất đã khử ion; Go Taq Hot start Master Mix 2x gồm: 4 loại dNTP, Taq polymerase, MgCl<sub>2</sub>, buffer; Các cặp mồi (xuôi và ngược)

- Hoá chất để điện di sản phẩm PCR trên gel agarose: Agarose; Dung dịch TBE 1X (Tris; acid boric; EDTA); Ethidium bromide 10 mg/ml; DNA Gene ruler 1kb

- Hoá chất để đọc trình tự gen: Kit tinh sạch ExoSAP- IT<sup>TM</sup> PCR product cleanup Reagent; Buffer Big dye 5X (ABI); Big dye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit (ABI); Bigdye XTerminator Purification

+ *Các bước chính tiến hành xác định đột biến*

- 1) Tách chiết DNA từ máu bằng kit The Wizard Genomic DNA purification của hãng Promega. Kiểm tra độ tinh sạch bằng phương pháp đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 260/280 nm. Bảo quản ở nhiệt độ -20<sup>0</sup>C.
- 2) Thiết kế cặp mồi đặc hiệu cho các đoạn exon trên gen G6PD, sử dụng cho phản ứng PCR.
- 3) Thực hiện phản ứng PCR khuếch đại các đoạn exon đích chuẩn bị cho giải trình tự gen.
- 4) Kiểm tra sản phẩm PCR bằng phương pháp điện di trên gel Agarose 1,5%. Sản phẩm điện di được nhuộm với chất nhuộm Ethidium bromide và chụp ảnh bằng máy chụp ảnh gel Bio-Rad.
- 5) Sản phẩm PCR được sử dụng tiến hành giải trình tự trên máy giải trình tự ABI Prism 3500 Genetic Analyzer (USA)
- 6) Phân tích kết quả trình tự thu được bằng phần mềm CLC Mainworkbench, so sánh trình tự gen của bệnh nhân với trình tự gen chuẩn của gen Bank (NCBI) (NG\_009015).

- *Quy trình kỹ thuật*

### ***1) Tách chiết DNA từ máu ngoại vi***

2 ml máu tĩnh mạch chống đông EDTA được dùng để tách DNA càng sớm càng tốt. Một số chưa dùng ngay bảo quản ở 4°C- 8°C trong vòng 24-72 giờ hoặc tách hồng cầu bảo quản trong tủ lạnh âm sâu -80°C cho đến khi sử dụng.

Nghiên cứu sử dụng quy trình theo hướng dẫn của hãng sản xuất.

(PHỤ LỤC 1. Quy trình tách chiết DNA từ máu bằng kit The Wizard Genomic DNA purification)

### 2) Kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch của DNA

Sản phẩm đạt yêu cầu khi  $A260/A280 = 1,8 - 2,0$  và  $A260/A230 > 2$

*Chú ý:* Sản phẩm DNA tách chiết được bảo quản ở nhiệt độ 4°C trong thời gian ngắn hoặc ở nhiệt độ -20°C trong thời gian dài hơn.

DNA sau khi được tách chiết, kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch đạt yêu cầu sẽ được sử dụng làm khuôn để khuếch đại một đoạn gen G6PD bằng máy PCR Eppendorf. Các mẫu DNA tách chiết đều được pha loãng về nồng độ khoảng 50 ng/μl để thực hiện phản ứng PCR.

Quy trình được sử dụng theo hướng dẫn của hãng sản xuất.

(PHỤ LỤC 2. Quy trình kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch DNA)

### 3) Thiết kế môi

Sử dụng chương trình Primer – BLAST để thiết kế các đoạn môi cần thiết.

Quá trình thiết kế các đoạn môi sử dụng Primer – BLAST gồm 2 bước:

#### 1. Thu thập khuôn mẫu

Trình tự môi được thiết kế dựa trên trình tự gen G6PD được công bố trên ngân hàng gen (NCBI: <http://ncbi.nlm.nih.gov/>) mã gene bank: **NG\_009015**

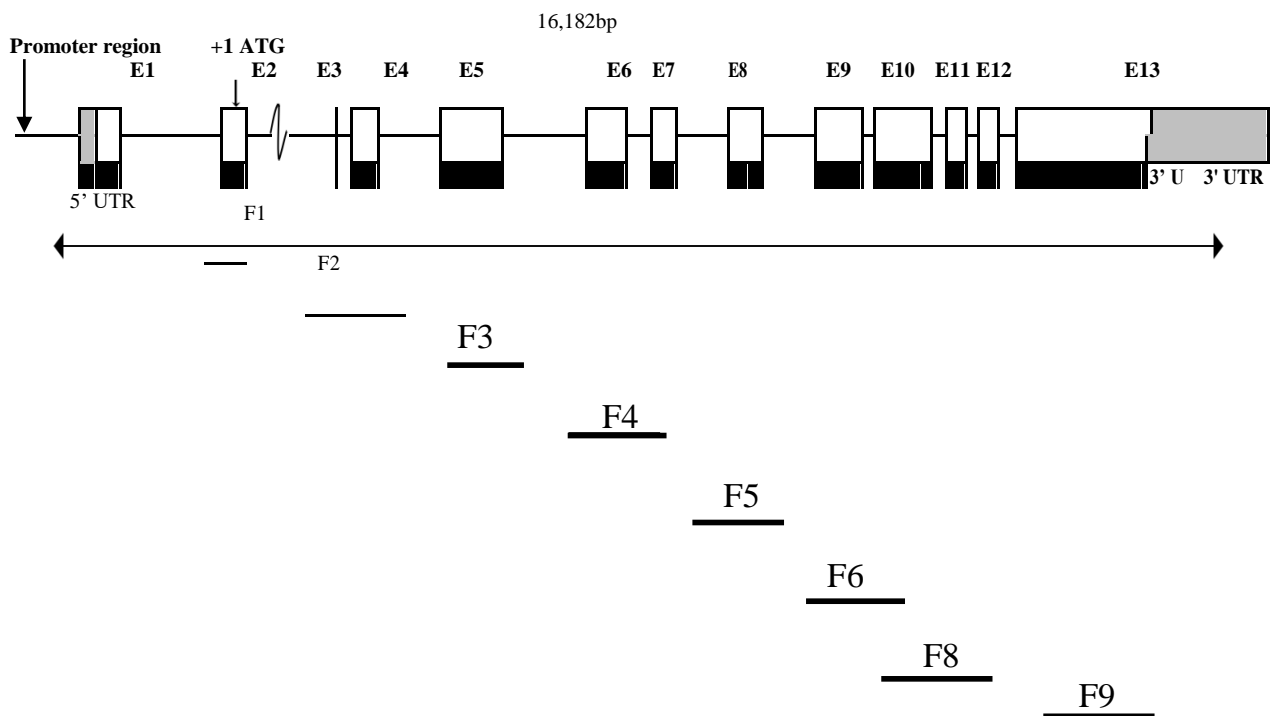
#### 2. Thiết kế các đoạn môi sử dụng phần mềm Primer – BLAST tại địa chỉ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.

Những môi đạt tiêu chuẩn phải có vị trí phù hợp để khuếch đại vùng gen đích như mong muốn và thỏa mãn các yêu cầu sau:

- Độ dài của môi nên nằm trong khoảng 18-28 base.
- Tm nên nằm trong khoảng 50-65°C. Nhiệt độ của hai môi không chênh lệch nhau quá xa (< 5°C)
- Tỷ lệ G, C nằm trong khoảng 30% <G+C<70%.

- Trình tự giữa môi xuôi và môi ngược không quá lớn (tốt nhất là dưới 1000)

Tránh sự hình thành cấu trúc bậc 2 của môi do các vùng của môi có khả năng liên kết bổ sung với nhau và không có sự bắt cặp giữa môi xuôi và môi ngược. Tránh cấu trúc kẹp tóc [Abd-Elsalam KA. Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *Afr J Biotechnol.* 2003;2(5):91-95. doi:10.4314/ajb.v2i5.14794]



**Hình 2.1. Sơ đồ thiết kế cặp môi cho các exon trên gen G6PD**

**Bảng 2.2. Các trình tự môi dùng để khuếch đại 13 exon**

<b>Tên môi</b>	<b>Trình tự môi (5'→3')</b>	<b>Exon</b>	<b>Tm (°C)</b>	<b>Kích thước(bp)</b>
F1F	5'-CTCAAGAAAGGGGCTAACTTCTCAA-3'	2	63.5	241
F1R	5'-GCACTTCCTGGCTTTTAAGATTGGG-3'		63.1	
F2F	5'-AGGTCGTGTCCCCAGCCACT-3'	3 và 4	62	641
F2R	5'-GCACAGACACTGCCCCAGGC-3'		63.1	
F3F	5'-GGGCACCCTCCCTGGACCTC-3'	5	61.5	491
F3R	5'-TCGTGGAGCAACGCTGCCAC-3'		60.7	
F4F	5'-ACTCCCCGAAGAGGGGTTC AAGG-3'	6 và 7	62.5	561
F4R	5'-GCTCTGCCACCCTGTGCCAG-3'		62.8	
F5F	5'-ACACAGCCAAGCACCCACG-3'	8	62.1	607
F5R	5'-CAGGGCCCCTCCCTGAGGAC-3'		63.1	
F6.2F	5'-GACTCGAGATGGACCAGGGTG-3'	9,10	61.9	977
F6.2R	5'-CTCGAAGGCATCACCTACCATCC-3'		62.7	
F8F	5'-GGCCGTGTACACCAAGATGAT-3'	11,12	60.4	566
F8R	5'-AGAGTGACGGGTGGAGGAGAG-3'		62.7	
F9F	5'-TATGGCAGGTGAGGAAAGGGT-3'	13	60.8	297
F9R	5'-AATGTGCAGCTGAGGTCAATG-3'		59.2	



#### 4) Kỹ thuật PCR

Chuẩn bị đầy đủ thành phần phản ứng PCR

**Bảng 2.3. Thành phần phản ứng PCR**

TT	Thành phần	Thể tích ( $\mu$ l)
1	Go taq Hot Start Master Mix (2X)	5
2	Môi xuôi (1,25 $\mu$ M / 2,5 $\mu$ M / 5 $\mu$ M)	0,5
3	Môi ngược (1,25 $\mu$ M / 2,5 $\mu$ M / 5 $\mu$ M)	0,5
4	DNA	1,0
5	Nước cất	3
	<b>Tổng thể tích</b>	<b>10</b>

##### + Tối ưu nồng độ môi

Chuẩn nồng độ môi nhằm tìm ra nồng độ thích hợp nhất đảm bảo cho môi gắn đặc hiệu và đảm bảo hiệu giá phản ứng.

##### Phương pháp:

Sử dụng mẫu DNA chuẩn để tiến hành phản ứng PCR với 3 cặp môi đã thiết kế.

Chuẩn bị đầy đủ thành phần phản ứng PCR. Với mỗi cặp môi sẽ thực hiện phản ứng PCR với 3 nồng độ môi khác nhau: 1,25  $\mu$ M – 2,5  $\mu$ M – 5  $\mu$ M. Nồng độ các thành phần khác không thay đổi trong tổng 10 $\mu$ l thể tích phản ứng. Dựa vào kết quả điện di chọn ra nồng độ môi tối ưu nhất.

##### + Tối ưu nhiệt độ gắn môi

Chuẩn nhiệt độ gắn môi nhằm tìm ra nhiệt độ thích hợp nhất đảm bảo cho môi gắn đặc hiệu và hạn chế tạo thành các sản phẩm không mong muốn.

##### Phương pháp:

Tối ưu hóa nhiệt độ gắn môi bằng cách chạy gradient nhiệt độ gắn môi.

Chuẩn bị đầy đủ thành phần phản ứng PCR. Sử dụng mẫu DNA chuẩn để tiến hành phản ứng với 3 cặp môi đã thiết kế. Mỗi cặp môi được thực hiện phản ứng PCR ở 3 điều kiện nhiệt độ gắn môi khác nhau là 55-58-60°C, với nồng độ

môi đã tối ưu hóa và các thành phần khác được giữ nguyên trong tổng 10 $\mu$ l thể tích phản ứng.

*Chu trình nhiệt của phản ứng*

Biến tính hoàn toàn : 94°C trong 2 phút

Biến tính: 94°C trong 30 giây

Gắn môi:  $\left. \begin{array}{l} 55^\circ\text{C} \\ 58^\circ\text{C} \\ 60^\circ\text{C} \end{array} \right\}$  trong 25 giây } x 35 chu kỳ

Kéo dài: 72°C trong 40 giây

Kéo dài hoàn toàn : 72°C trong 5 phút

Bảo quản: 15 °C

Dựa vào kết quả điện di sản phẩm PCR chọn ra nhiệt độ gắn môi tối ưu nhất.

### 5) Giải trình tự gen trực tiếp

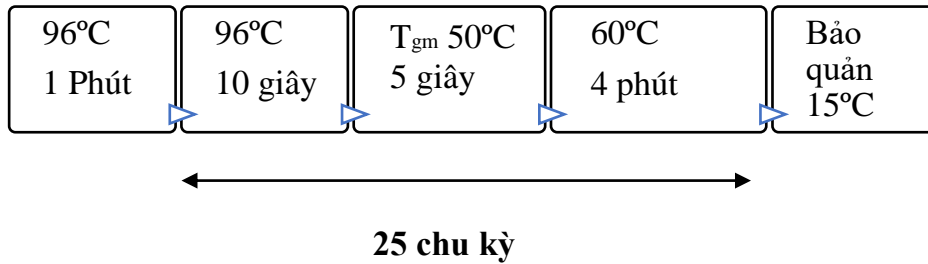
Bước 1. Tiến hành phản ứng PCR giải trình tự

- Tinh sạch sản phẩm PCR, loại bỏ primer thừa
- Lấy lọ ExoSAP ra khỏi tủ đông -20 °C và để lên khay giữ lạnh
- Cho 2 $\mu$ l ExoSAP vào tube PCR 0,2ml
- Thêm vào 5 $\mu$ l sản phẩm PCR
- Chạy PCR với chương trình nhiệt: 37 °C 15 phút, 80 °C 15 phút
- Chuẩn bị master mix cho phản ứng:

**Bảng 2.4. Thành phần phản ứng giải trình tự gen**

STT	Thành phần	Thể tích ( $\mu$ l)
1	Buffer Big dye 5X	2
2	Big dye Terminator v3.1	1
3	Môi xuôi hoặc môi ngược 5 $\mu$ M	0,5
4	Nước cất	6,0
5	DNA cần giải trình tự (sản phẩm PCR)	0,5
	<b>Tổng thể tích</b>	<b>10</b>

- Chu trình nhiệt:



Bước 2: Tinh sạch sản phẩm PCR giải trình tự

Tinh sạch sản phẩm PCR giải trình tự

- Vortex lọ Big Dye X Terminator™ beads khoảng 8-10 giây trước khi mix với SAM solution

- Chuẩn bị mix SAM/Bigdye X Terminator™ beads gồm:

+ 45μl SAM solution

+ 10 μl Bigdye X Terminator™ bead solution

- Chuyển 55μl dung dịch SAM/Bigdye X Terminator™ bead vào mỗi mẫu cần tinh sạch

- Vortex trên máy vortex plate 2000v trong 30 phút

- Ly tâm plate 1000g trong 2 phút

- Phân phối 15μl dịch nổi trong trên mỗi mẫu sau khi lắc lần lượt vào plate.

- Đậy nắp plate

- Cho vào máy giải trình tự.

Bước 3: Giải trình tự gen trên máy tự động

Bước 4: Phân tích kết quả giải trình tự

## 2.5. Phân tích và xử lý kết quả

- Các nucleotid trên gen sẽ được biểu hiện bằng các đỉnh (peak) với 4 màu tương đương với 4 loại nucleotid A, T, G, C. Phân tích kết quả trình tự thu được bằng phần mềm CLC Mainworkbench. So sánh trình tự gen của bệnh nhân với trình tự gen chuẩn của gen Bank (NCBI) (NG\_009015) xác định các đột biến.

- Số liệu được nhập thống kê và xử lý bằng phần mềm Excel và SPSS 16.0. Tất cả các số liệu và kết quả nghiên cứu được xử lý theo phương pháp thống kê y

học. Phân tích thống kê mô tả, so sánh, tính các giá trị trung bình, tỷ lệ phần trăm (%), tính p theo T- Test. Mô tả kết quả: Các biến định lượng được trình bày theo giá trị trung bình và độ lệch chuẩn ( $X \pm SD$ ); Các biến định tính được trình bày theo tỷ lệ %; Đánh giá sự khác biệt. Đối với biến định tính sử dụng test  $\chi^2$ . Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$  ở một bậc tự do khi  $\chi^2 > 3,84$ . Đối với biến định lượng sử dụng test T-Student. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$  khi  $t > 1,96$ .

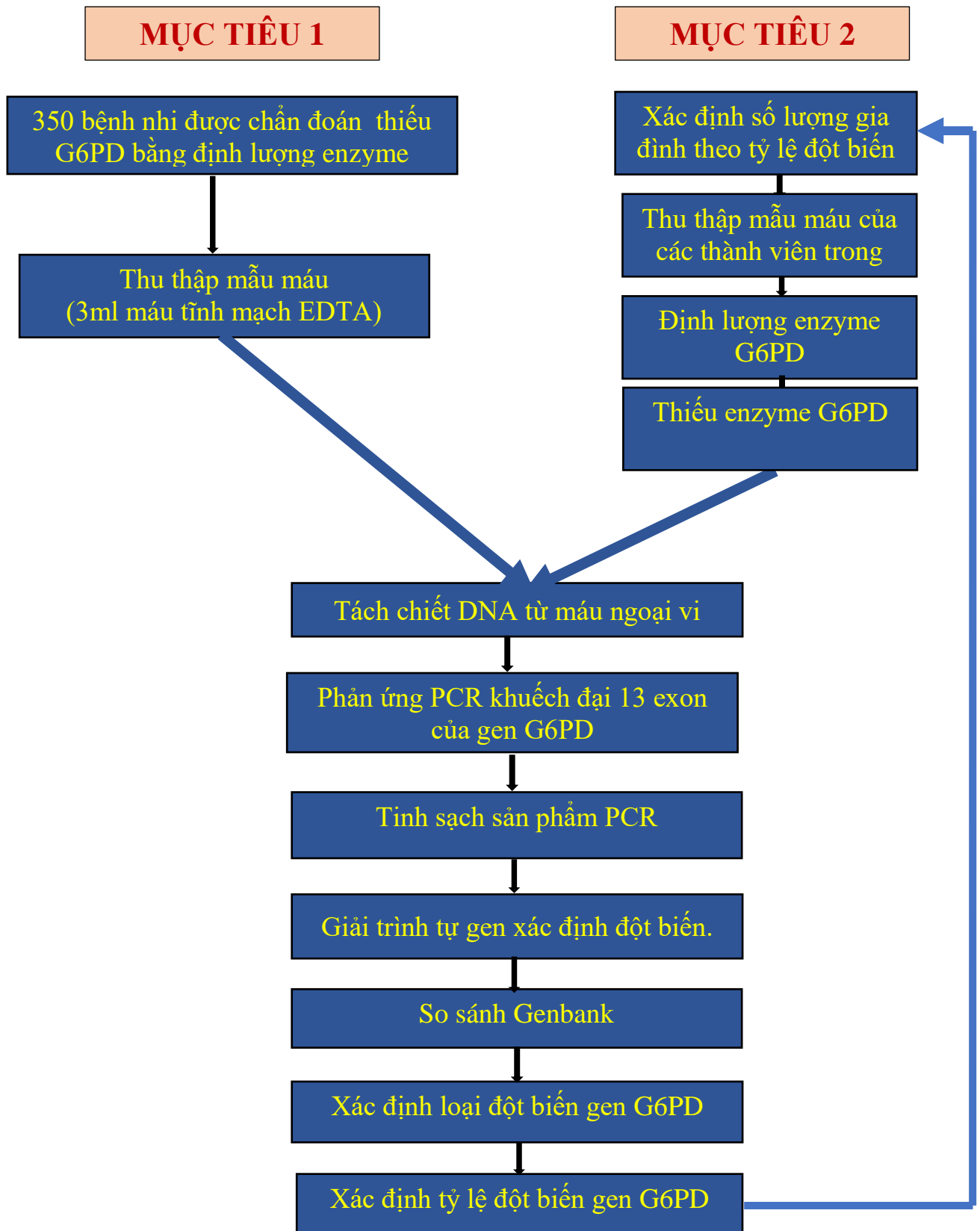
## **2.6. Các sai số và biện pháp khắc phục:**

- Chấp hành tốt tiêu chuẩn lựa chọn bệnh nhân để tránh sai số lựa chọn
- Thống nhất về điều kiện, cơ sở vật chất, nhân lực, trang thiết bị hoá chất, sinh phẩm vật tư theo tiêu chuẩn ISO 15189 để tránh sai số trong thu thập thông tin.
- Các số liệu được làm sạch, mã hóa đảm bảo tính riêng tư trước khi nhập vào máy tính.

## **2.7. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu**

- Nghiên cứu tuân thủ đạo đức nghiên cứu y học.
- Các đối tượng tham gia hoàn toàn tự nguyện. Các thành viên gia đình hoàn toàn tự nguyện tham gia vào nghiên cứu. Các gia đình và bệnh nhân có thể rút khỏi nghiên cứu khi không muốn tham gia. Các gia đình và bệnh nhân không phải trả bất kỳ kinh phí nào.
- Các thông tin về bệnh nhân, kết quả được hoàn toàn giữ bí mật.
- Các quy trình thực hiện trong nghiên cứu được tuân thủ đảm bảo.
- Nghiên cứu được tiến hành hoàn toàn vì mục đích khoa học, không vì bất kỳ mục đích nào khác.

## SƠ ĐỒ NGHIÊN CỨU



### CHƯƠNG 3 KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

#### 3.1. Một số đặc điểm chung của nhóm nghiên cứu

##### 3.1.1. Đặc điểm về tuổi và giới

*Bảng 3.1. Đặc điểm về tuổi và giới của nhóm nghiên cứu*

Tuổi, giới	Nam		Nữ		Tổng số	
	n	Tỷ lệ %	n	Tỷ lệ %	n	Tỷ lệ %
Dưới 1 tháng	247	70,57	26	7,43	273	78
1-6 tháng	56	16	9	2,57	65	18,6
> 6-12 tháng	5	1,43	1	0,29	6	1,71
> 12-24 tháng	2	0,57	1	0,29	3	0,86
> 24 tháng	2	0,57	1	0,29	3	0,86
<b>Tổng số</b>	<b>312</b>	<b>89,14</b>	<b>38</b>	<b>10,86</b>	<b>350</b>	<b>100</b>
<b>p</b>	<b>&lt;0,05</b>					

**Nhận xét:**

- Trong tổng số 350 trẻ thiếu hụt G6PD tỷ lệ ở trẻ nam chiếm 89,14% nhiều ở trẻ nữ: 10,86% có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$

- Trẻ đến khám tại viện Nhi chủ yếu khi dưới 2 tuổi (> 99%) trong đó trẻ được < 1 tháng tuổi chiếm 78%, 1-6 tháng: 18,6%, 6-12 tháng chiếm 1,71% và chỉ có 3 trẻ trên 2 tuổi chiếm 0,86%.

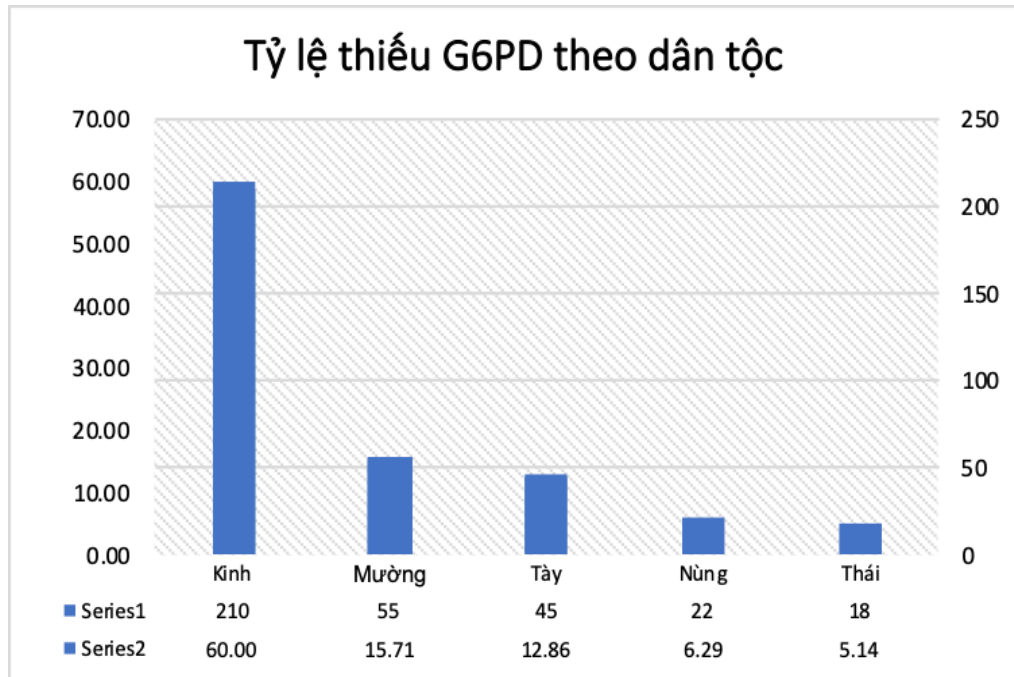
### 3.1.2. Đặc điểm về địa dư

**Bảng 3.2. Đặc điểm về địa dư của các đối tượng nghiên cứu**

Khu vực	TT theo KV	TT theo tỉnh	Tỉnh	TỔNG	
				n	Tỉ lệ %
Đồng bằng Sông Hồng (230 bệnh nhi, 65,7%)	1	1	Hà Nội	170	48,57
	2	4	Vĩnh Phúc	14	4,0
	3	7	Hải Dương	9	2,57
	4	10	Ninh Bình	7	2
	5	11	Bắc Ninh	7	2
	6	12	Nam Định	7	2
	7	18	Hưng Yên	5	1,43
	8	19	Hà Nam	4	1,14
	9	22	Thái Bình	4	1,14
	10	25	Hải Phòng	3	0,86
Đông Bắc Bộ (82 bệnh nhi, 23,4%)	1	2	Hà Giang	19	5,43
	2	3	Phú Thọ	17	4,86
	3	5	Thái Nguyên	14	4,0
	4	9	Bắc Giang	7	2
	5	15	Quảng Ninh	6	1,71
	6	16	Tuyên Quang	6	1,71
	7	17	Cao Bằng	5	1,43
	8	20	Bắc Kạn	4	1,14
	9	21	Lạng Sơn	4	1,14
Tây Bắc Bộ (38 bệnh nhi, 11,7%)	1	6	Sơn La	12	3,43
	2	8	Hoà Bình	7	2
	3	13	Yên Bái	7	2
	4	14	Lào Cai	6	1,71
	5	23	Điện Biên	3	0,86
	6	24	Lai Châu	3	0,86
			<b>Tổng: 25</b>	<b>350</b>	<b>100</b>

**Nhận xét:** Các trẻ thiếu G6PD nằm trong toàn bộ 25 tỉnh, thành Miền Bắc Việt Nam, gần một nửa (48,57%) trẻ thuộc thành phố Hà Nội. Chia theo 3 khu vực miền Bắc thì cao nhất là các tỉnh thuộc khu vực Đồng bằng Sông Hồng.

### 3.1.3. Đặc điểm về dân tộc



**Biểu đồ 3.1. Đặc điểm về dân tộc của các đối tượng nghiên cứu**

**Nhận xét:** Các trẻ thiếu G6PD thuộc 5 dân tộc, trong đó nhiều nhất là dân tộc Kinh chiếm 60% sau đó đến dân tộc Mường chiếm 15,71%, Tày chiếm 12,86%, Nùng chiếm 6,29% và cuối cùng là Thái chiếm 5.14%.

### 3.1.4. Đặc điểm về các chỉ số hồng cầu

**Bảng 3.3. Các chỉ số HC ở các trẻ thiếu hụt G6PD**

Chỉ số HC ( $\bar{X} \pm SD$ )	Nam (313)	Nữ (39)	p
RBC	3,89±1,56	3,76±0,69	>0,05
Hb	105,76±17,75	104,38±15,71	>0,05
Hct	30,85±4,61	30,91±3,51	>0,05
MCV	83,59±18,69	81,63±9,8	>0,05
MCH	28,08±4,42	27,85±3,85	>0,05
MCHC	340,663±17,34	340,54±13,67	>0,05

**Nhận xét:** Các trẻ thiếu G6PD đều có giá trị các chỉ số SLHC, Hb, Ht giảm còn MCV, MCH, MCH RDW đều bình thường. Các chỉ số này, không có sự khác biệt giữa nam và nữ.



### 3.2. Xác định các đột biến gen G6PD

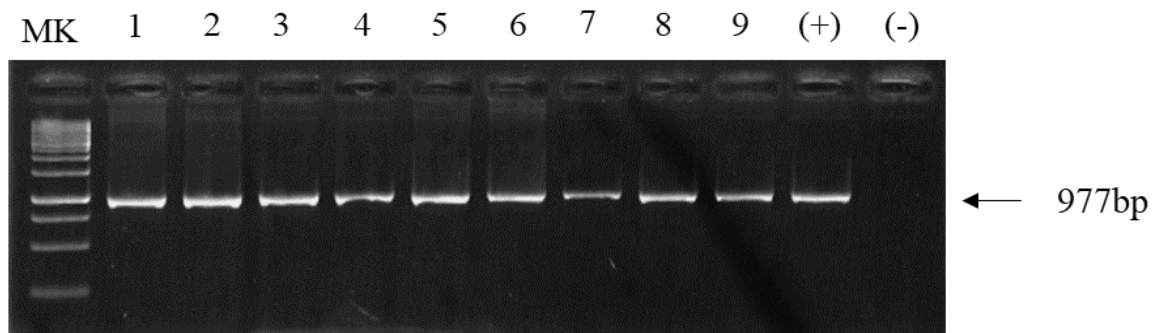
#### 3.2.1. Kết quả tách chiết DNA:

Tách chiết DNA từ máu ngoại vi bằng kit The Wizard Genomic DNA Purification của hãng Promega. DNA tách chiết sẽ được kiểm tra độ tinh sạch bằng phương pháp đo mật độ quang OD ở bước sóng 260/280 nm. Tất cả các mẫu DNA đều có độ tinh sạch cao dao động trong khoảng 30,6 ng/ $\mu$ l đến 283 ng/ $\mu$ l với tỷ số mật độ quang ở bước sóng 260/280 nm nằm trong khoảng 1,75÷ 2,29. Các mẫu DNA có nồng độ cao được pha về nồng độ 50 ng/ $\mu$ l để thực hiện phản ứng PCR. Sau đó các mẫu tách chiết này được bảo quản ở nhiệt độ -20<sup>o</sup>C.

#### 3.2.2. Kết quả chạy PCR khuếch đại các exon

Sử dụng phần mềm Primer – BLAST và các trình tự tham khảo NCBI, thiết kế 8 cặp mồi đặc hiệu cho toàn bộ các exon trên gen G6PD, sử dụng cho phản ứng PCR. Các đặc điểm về độ dài, nhiệt độ nóng chảy, %GC và kích thước trình tự nằm giữa hai mồi ngược và mồi xuôi thỏa mãn các yêu cầu thiết kế mồi.

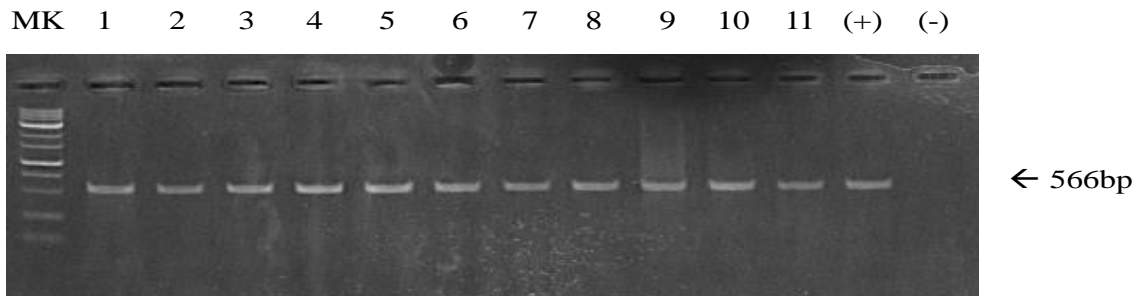
Kích thước của các sản phẩm PCR trong khoảng 241-882 bp. Sản phẩm khuếch đại được điện di trên gel agarose 1,5%. Sản phẩm điện di được nhuộm với chất nhuộm Ethidium bromide và chụp ảnh bằng máy chụp ảnh gel Bio-Rad. Các mẫu đều tạo băng duy nhất, sáng rõ nét, không có các băng phụ, kích thước phù hợp với kích thước của đoạn gen cần khuếch đại.



**Hình 3.1. Hình ảnh PCR đại diện khuếch đại exon 9, 10 của gen G6PD.**

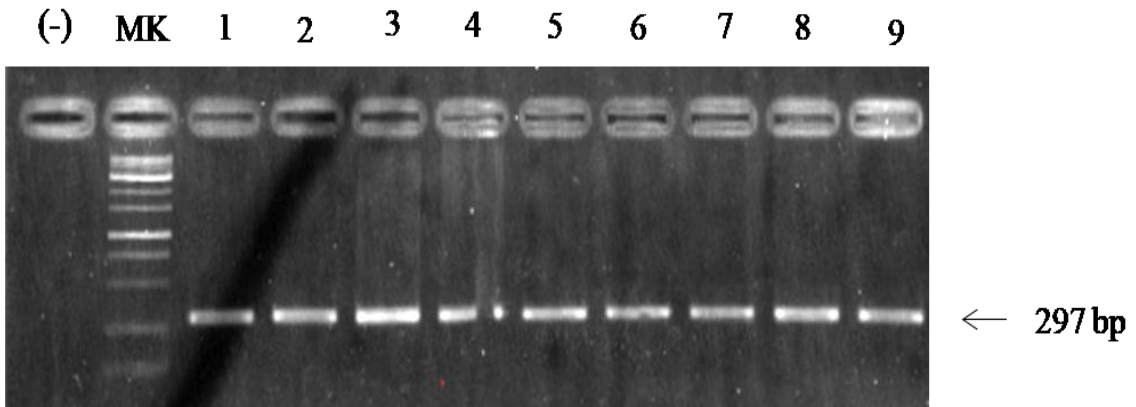
*MK: marker 1kb; (+): chứng dương (mẫu người bình thường); (-): chứng âm (mẫu nước); 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9: mẫu bệnh nhân*

**Nhận xét:** Trên gel điện di các mẫu tạo thành một băng duy nhất, sáng rõ nét, không có các băng phụ, kích thước phù hợp với kích thước của đoạn gen cần khuếch đại là 977 bp.



**Hình 3.2. Hình ảnh PCR đại diện khuếch đại exon 11, 12 của gen G6PD.**  
 MK: marker 1kb; (+): chứng dương (mẫu người bình thường), (-): chứng âm (mẫu nước); 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11: mẫu bệnh nhân

**Nhận xét:** Trên gel điện di các mẫu tạo thành một băng duy nhất, sáng rõ nét, không có các băng phụ, kích thước phù hợp với kích thước của đoạn gen cần khuếch đại là 566 bp.



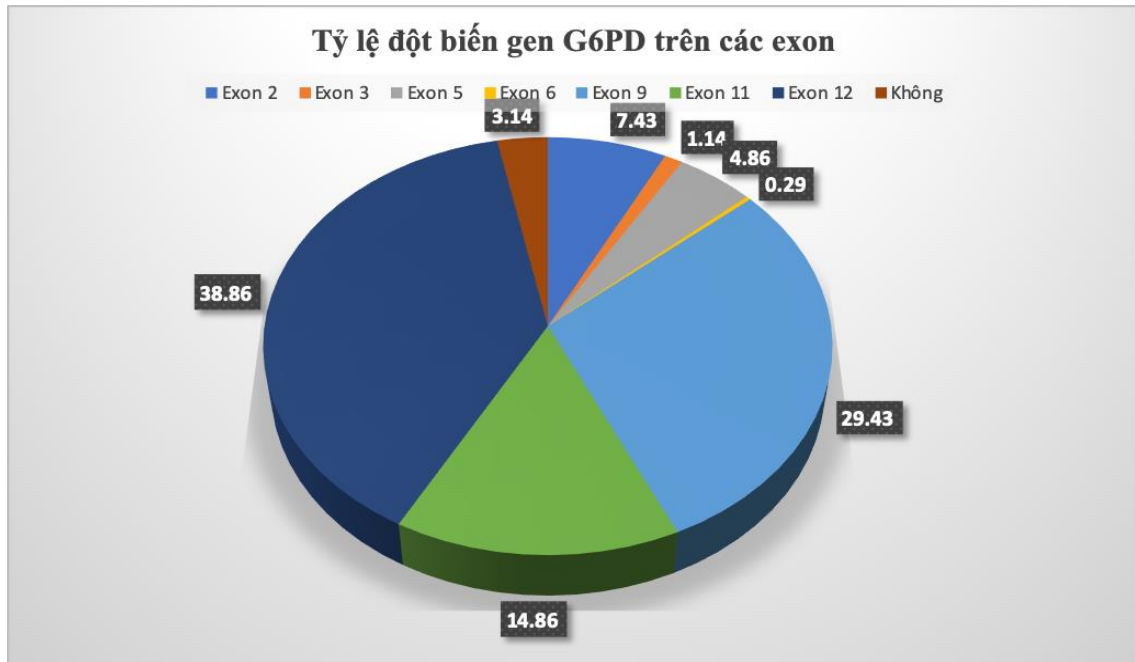
**Hình 3.3. Hình ảnh PCR đại diện khuếch đại cặp môi F9F-9R của gen G6PD.**  
 MK: marker 1kb; (-): chứng âm (mẫu nước); 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8: mẫu bệnh nhân, 9 : chứng dương (mẫu người bình thường);

**Nhận xét:** Trên gel điện di các mẫu tạo thành một băng duy nhất, rõ nét, không có băng phụ, kích thước phù hợp với kích thước của đoạn gen cần khuếch đại là 297bp.

### 3.2.3. Kết quả giải trình tự gen xác định đột biến

#### 3.2.3.1. Kết quả giải trình tự tỷ lệ các dạng đột biến trên các exon

Nghiên cứu xác định được của 339/350 trường hợp có đột biến gen chiếm 96,85%. Quan sát thấy có 13 dạng đột biến gây bệnh trên 7 exon.



**Biểu đồ 3.2. Tỷ lệ bệnh nhân có đột biến gen G6PD trên các exon**

**Nhận xét:** Các đột biến xảy ra nhiều nhất trên 3 exon thuộc điểm nóng về đột biến G6PD ở khu vực Đông Nam Á là: exon 12 chiếm tỷ lệ 38,85%, exon 9 chiếm 29,43%, exon 11 chiếm 14,86%. Không trường hợp nào có đột biến trên exon 4, 7, 10.

## 3.2.3.2. Kết quả tỷ lệ các dạng đột biến được phát hiện

**Bảng 3.4. Tỷ lệ các loại đột biến được phát hiện**

<b>TT</b>	<b>Tên đột biến</b>	<b>Vị trí đột biến</b>	<b>Biến đổi acid amin</b>	<b>Exon</b>	<b>Số lượng</b>	<b>Tỷ lệ (%)</b>
1	Viangchan*	c.871G>A	V291M	9	87	<b>24,86</b>
2	Kaipping*	c.1388G>A	R463H	12	73	<b>20,86</b>
3	Canton*	c.1376G>T	R459L	12	63	<b>18</b>
4	Union*	c.1360C>T	R454C	11	52	<b>14,86</b>
5	Gaohe	c.95A>G	H32A	2	26	7,43
6	Chinese-5	c.1024C>T	L342F	9	15	4,29
7	Quing Yan*	c. 392G>T	G131V	5	13	3,71
8	Orissa*	c.131C>G	A44G	3	4	1,14
9	Valladolid*	c. 406 C>T	A142C	5	2	0,57
10	NanKang	c.517 T>G	P173L	5	1	0,29
11	Địa Trung Hải*	c. 563 C>T	S188P	5	1	0,29
12	Comibra Shunde*	592 C>T	A198C	6	1	0,29
13	Taiwan2	c.1330G>A	V444I	11	1	0,29
	<b>Chưa xác định</b>				<b>11</b>	<b>3,14</b>
	<b>Tổng số</b>				<b>350</b>	<b>100</b>
14	Silent	c.1311C>T	T437T	11	89	25,43

**Nhận xét:**

- Phát hiện được 14 đột biến của gen G6PD, trong đó G6PD Viangchan chiếm tỷ lệ cao nhất (24,86%). Sau đó đến G6PD Kaipping (20,86%), G6PD Canton (18%) và G6PD Union (14,86%); G6PD Gaohe (7,43%), G6PD Chinese-5 (4,29%),

G6PD Qing Yan (3,71%), G6PD Orissa (1,14%) và G6PD Valladolid (0,57%). Bốn loại đột biến chỉ có 1 trường hợp đều chiếm 0,29% là G6PD NanKang, G6PD Địa Trung Hải, G6PD Comibra Shunde và G6PD Taiwan<sup>2</sup>. Có 5 dạng đột biến lần đầu tiên xuất hiện tại Việt Nam là **G6PD Orissa, G6PD Valladolid, G6PD NanKang, G6PD Comibra Shunde và G6PD Taiwan<sup>2</sup>**.

- Có 89 trường hợp dạng đột biến đa hình Silent và 98% là dưới dạng kết hợp với các đột biến khác (\*).

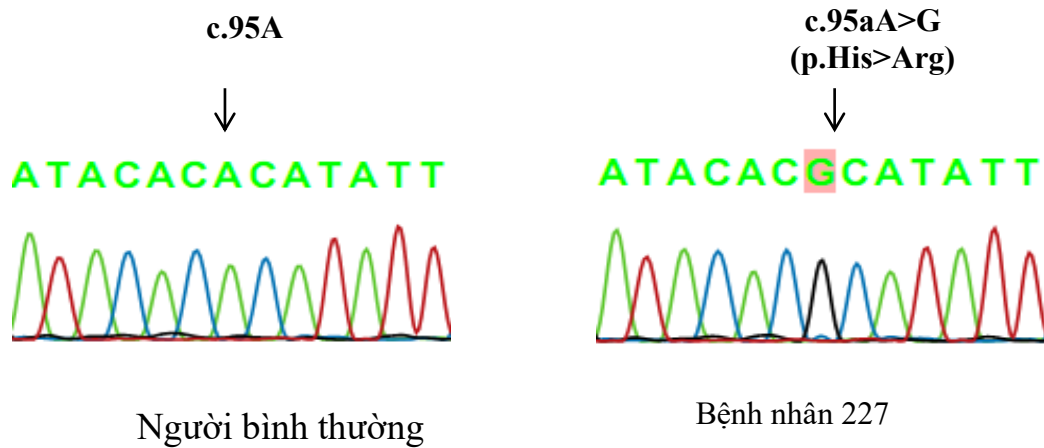
**Bảng 3.5. Xác định tỷ lệ sự kết hợp giữa các đột biến của gen G6PD**

TT	Đột biến kết hợp		n	Tỷ lệ %
	Loại đột biến	Loại kết hợp		
1	Silent	Viangchan	69	77,53
2		Union	8	8,99
3		Canton	1	1,12
4		Kaiping	3	3,37
5		Valladolid	2	2,25
6		Địa Trung Hải	1	1,12
7		Comibra Shunde	1	1,12
8		Qing Yan	1	1,12
9		Orissa	1	1,12
10		Không kết hợp	1	1,12
		<b>Tổng</b>	<b>89</b>	<b>100</b>
1	Kaiping	Canton	1	100

**Nhận xét:** Hầu hết các bệnh nhân có đột biến G6PD Silent đều kết hợp với các đột biến khác, trong đó nhiều nhất là kết hợp G6PD Viangchan (c.871G>A) 77,53%, còn lại kết hợp với 8 dạng khác. Phát hiện 1 bệnh nhân có kết hợp 2 đột biến G6PD Kaiping và Canton.

**Kết quả xác định các đột biến trên các exon 2 bằng giải trình tự**

Xác định được 01 đột biến Gaohe (c.95A>G)

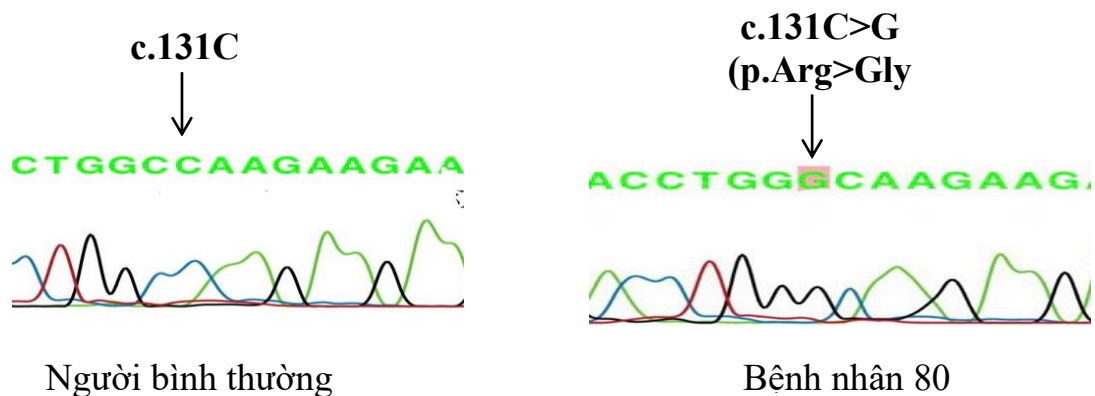


**Hình 3.4. Hình ảnh giải trình tự đột biến Gaohe trên exon 2 của gen G6PD**

**Nhận xét:** Vị trí nucleotide c.95 ở người bình thường trên gen G6PD là A, trong khi đó vị trí này ở bệnh nhân số 227 có trình tự là G. Sự thay đổi trên làm thay đổi bộ ba mã hóa acid amin tại codon 32 từ Histidine thành Arginine.

**Kết quả giải trình tự trên các exon 3**

Xác định được 01 đột biến Orissa (c.131 C>G)

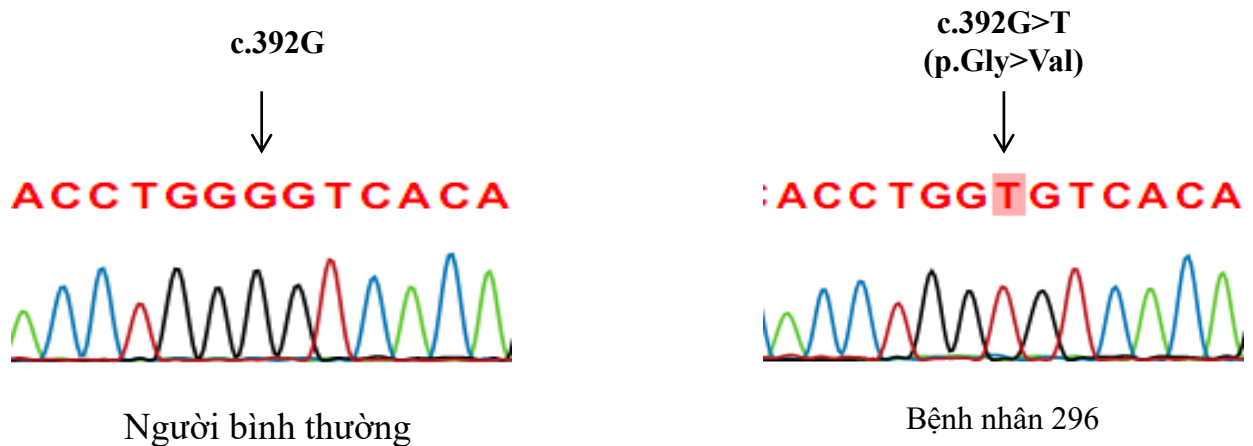


**Hình 3.5. Hình ảnh giải trình tự đột biến Orissa trên exon 2 của gen G6PD**

**Nhận xét:** Vị trí nucleotide c.131 ở người bình thường trên gen G6PD là C, trong khi đó vị trí này ở bệnh nhân số 80 có trình tự là G. Sự thay đổi trên làm thay đổi bộ ba mã hóa acid amin tại codon 44 từ Arginine thành Glycine.

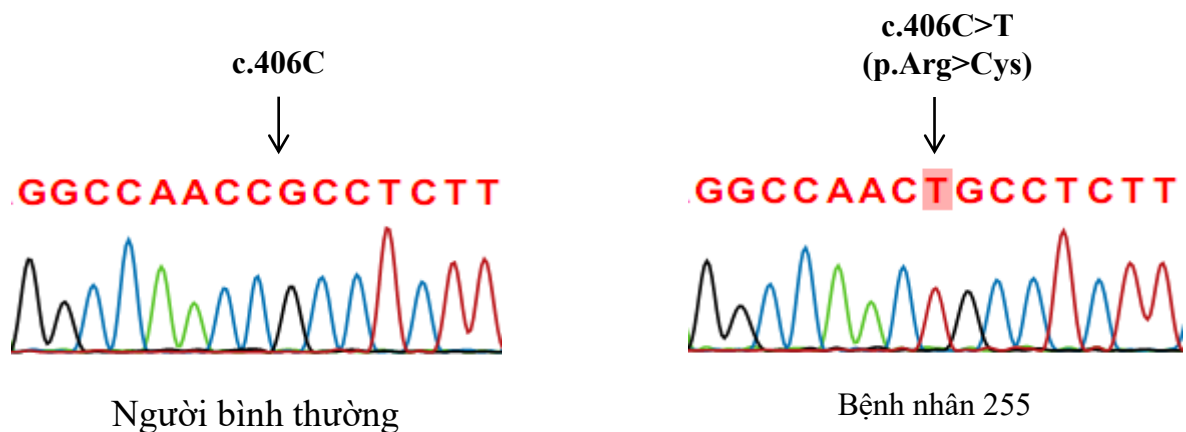
### ***Kết quả giải trình tự trên exon 5***

Xác định được 04 đột biến G6PD Qing Yan (c. 392 G>T), Valladolid (c.406 C>T), NanKang (c.517 T>C) và Địa Trung Hải (c.563C>T)



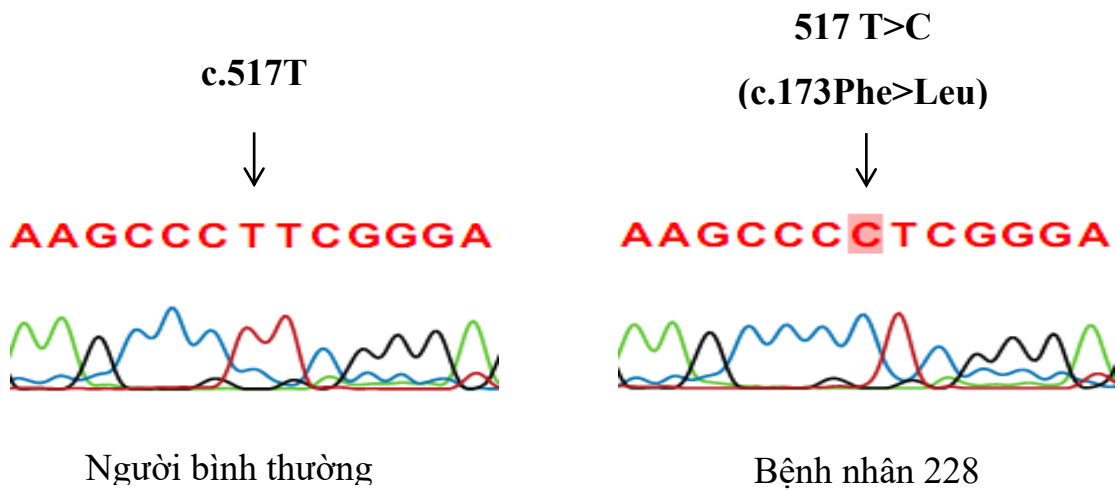
***Hình 3.6. Hình ảnh giải trình tự đột biến Qing Yan trên exon 5***

**Nhận xét:** Đột biến G6PD Qing Yan (c. 392 G>T) ở vị trí nucleotide c.392 ở người bình thường trên gen G6PD là G, trong khi đó vị trí này ở bệnh nhân số 296 có trình tự là T. Sự thay đổi trên làm thay đổi bộ ba mã hóa acid amin tại codon 131 từ Glycine thành Valine.



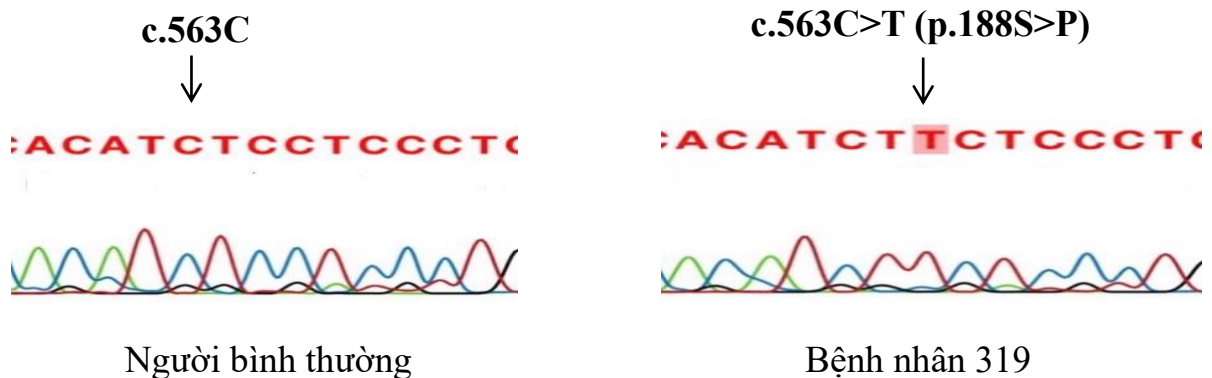
***Hình 3.7. Hình ảnh giải trình tự đột biến Valladolid trên exon 5***

**Nhận xét:** Đột biến G6PD Valladolid (c.406 C>T) ở vị trí nucleotide c.406 ở người bình thường trên gen G6PD là C, trong khi đó vị trí này ở bệnh nhân số 255 có trình tự là T. Sự thay đổi trên làm thay đổi bộ ba mã hóa acid amin tại codon 142 từ Arginine thành Cysteine.



**Hình 3.8. Hình ảnh giải trình tự đột biến G6PD NanKang trên exon 5**

**Nhận xét:** Đột biến NanKang (c.517 T>C) ở vị trí nucleotide c.517 ở người bình thường trên gen G6PD là T, trong khi đó vị trí này ở bệnh nhân số 228 có trình tự là C. Sự thay đổi trên làm thay đổi bộ ba mã hóa acid amin tại codon 173 từ Phelylanaline thành Leucine.



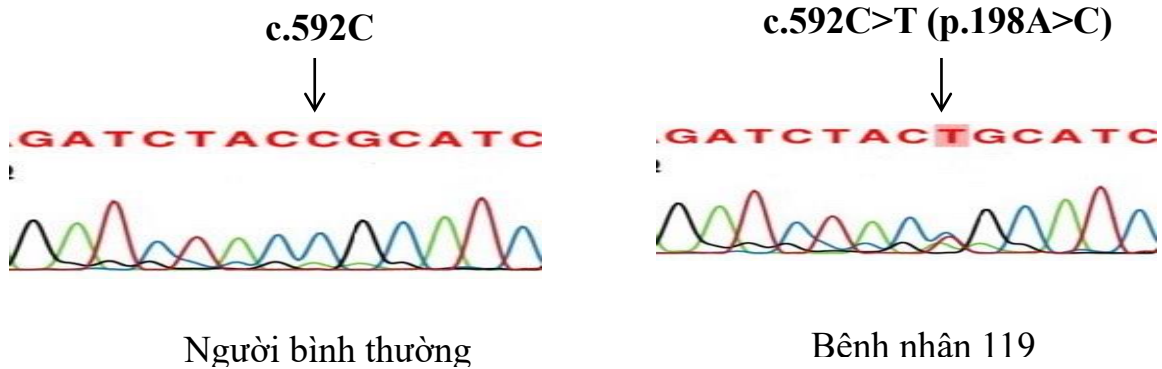
**Hình 3.9. Hình ảnh giải trình tự đột biến G6PD Địa Trung Hải trên exon 5**

**Nhận xét:** Đột biến G6PD Địa Trung Hải (c.563C>T) ở vị trí nucleotide c.563 ở người bình thường trên gen G6PD là C, trong khi đó vị trí này ở bệnh nhân số 319 có trình tự là T. Sự thay đổi trên làm thay đổi bộ ba mã hóa acid amin tại codon 188 trong G6PD từ Serine thành Phenylalanine.



### ***Kết quả giải trình tự trên exon 6***

Xác định được 1 đột biến G6PD Coimbra Shunde (c.592C>T)

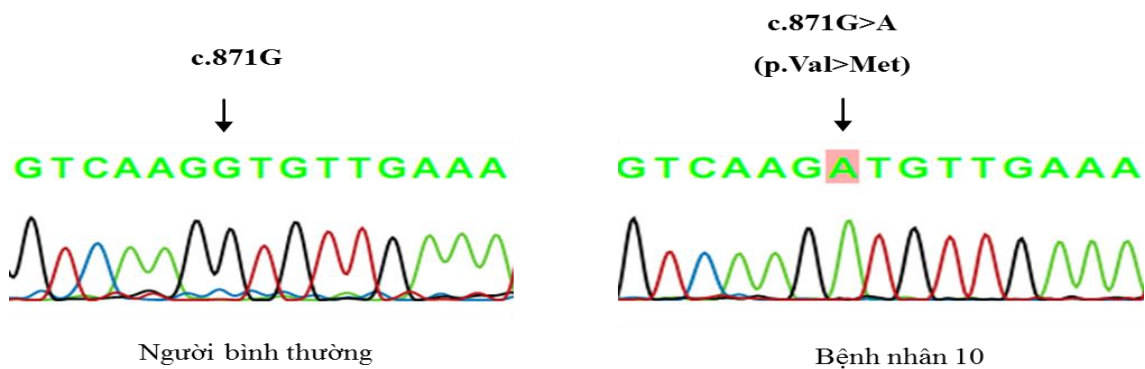


***Hình 3.10. Hình ảnh giải trình tự đột biến Coimbra Shunde trên exon 5***

**Nhận xét:** Đột biến G6PD Coimbra Shunde (c.592C>T) ở vị trí nucleotide c.592 ở người bình thường trên gen G6PD là T, trong khi đó vị trí này ở bệnh nhân số 255 có trình tự là C. Sự thay đổi trên làm thay đổi bộ ba mã hóa acid amin tại codon 173 từ Phelylanaline thành Leucine.

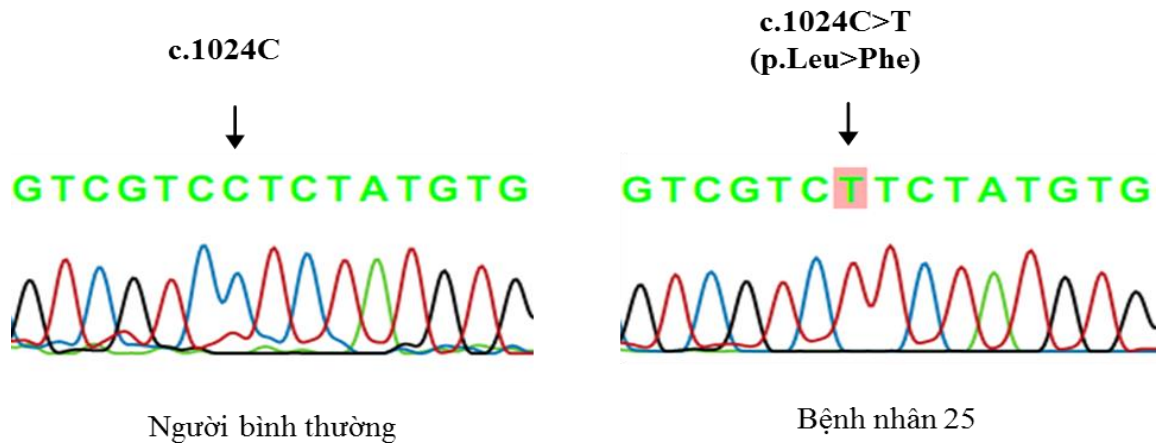
### ***Kết quả giải trình tự trên exon 9***

Xác định được 04 đột biến G6PD Viangchan (c.871G>A), Chinese-5 (c.1024C>T) và Taiwan 2 (c.1330 G>A)



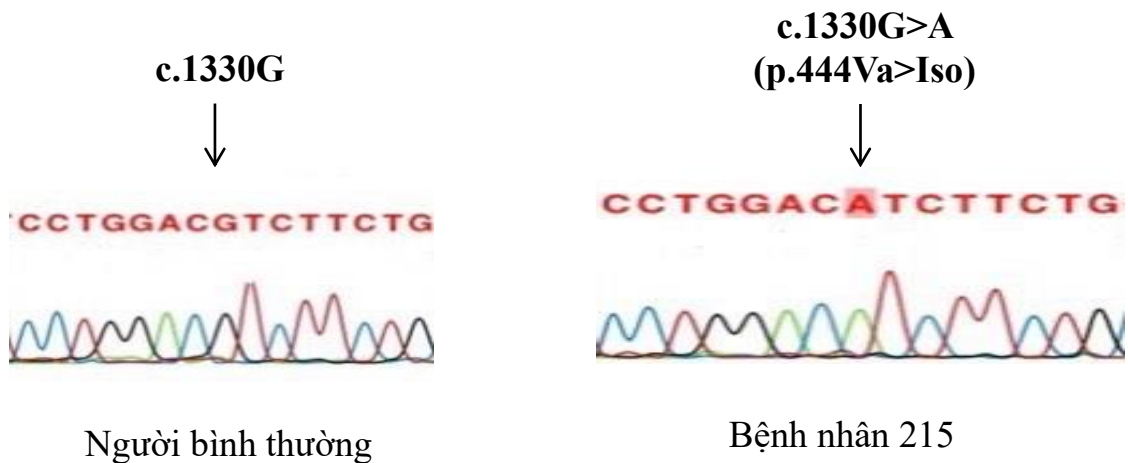
***Hình 3.11. Hình ảnh giải trình tự đột biến Viangchan trên exon 9***

**Nhận xét:** Vị trí nucleotide c.871 ở người bình thường trên gen G6PD là G, trong khi đó vị trí này ở bệnh nhân số 15 có trình tự là A. Sự thay đổi trên làm thay đổi bộ ba mã hóa acid amin tại codon 291 từ Valin thành Methionin.



**Hình 3.12. Hình ảnh giải trình tự đột biến Chinese-5 trên exon 9**

**Nhận xét:** Vị trí nucleotide c.1024 ở người bình thường trên gen G6PD là C, trong khi đó vị trí này ở bệnh nhân số 3 có trình tự là T. Sự thay đổi trên làm thay đổi bộ ba mã hóa acid amin tại codon 342 từ Leucin thành Phenylalanin.

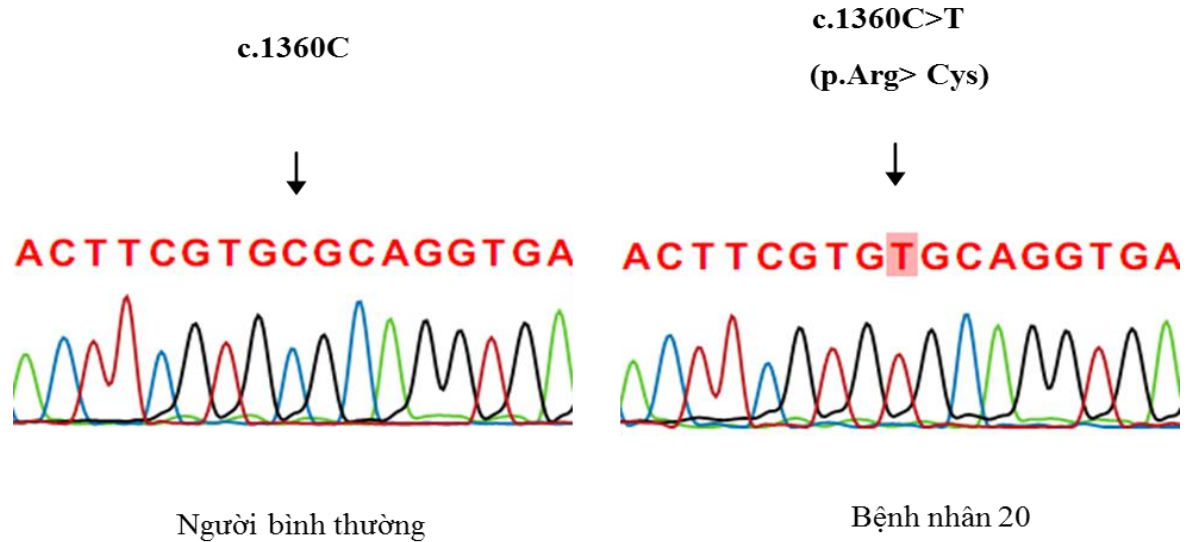


**Hình 3.13. Hình ảnh giải trình tự đột biến Taiwan exon 9 của gen G6PD**

**Nhận xét:** Vị trí c.1330 trình tự nucleotid của Genbank là G, trong khi đó vị trí này ở bệnh nhân số 215 có trình tự là A. Sự thay đổi trên làm thay đổi bộ ba mã hóa acid amin tại codon 444 từ Valin thành Isoleucin.

**Kết quả giải trình tự trên exon 11**

Xác định được 1 đột biến: G6PD Union (c.1360C>T)

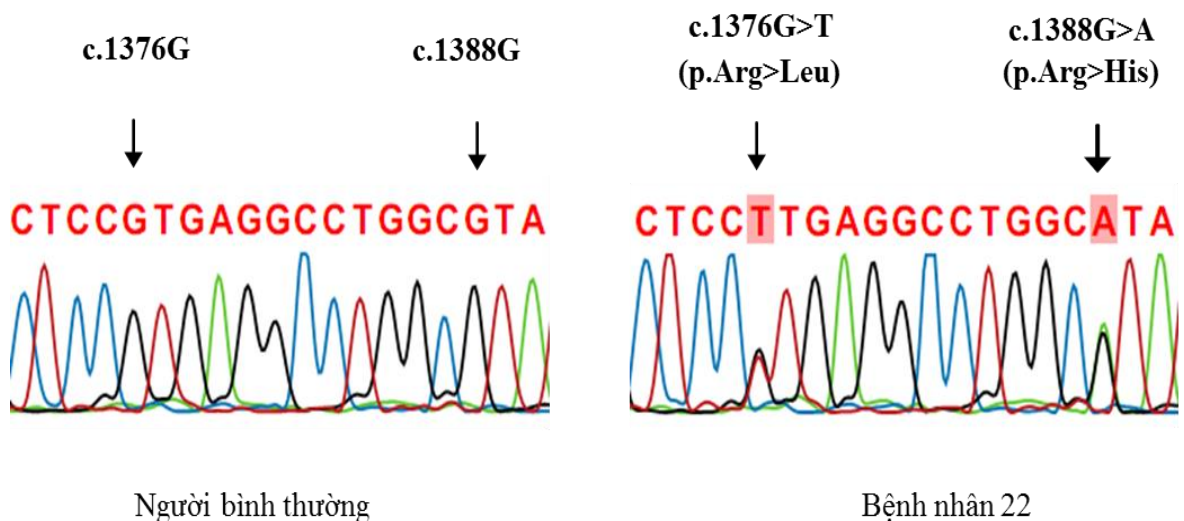


**Hình 3.14. Hình ảnh giải trình tự đột biến Union trên exon 11**

**Nhận xét:** Vị trí nucleotide c.1360 ở người bình thường trên gen G6PD là C, trong khi đó vị trí này ở bệnh nhân số 16 có trình tự là T. Sự thay đổi trên làm thay đổi bộ ba mã hóa acid amin tại codon 454 từ Arginin thành Cystein.

**Kết quả giải trình tự trên exon 12**

Xác định được 2 đột biến: G6PD Canton (c.1376G>T) và Kaipping (c.1388G>A)

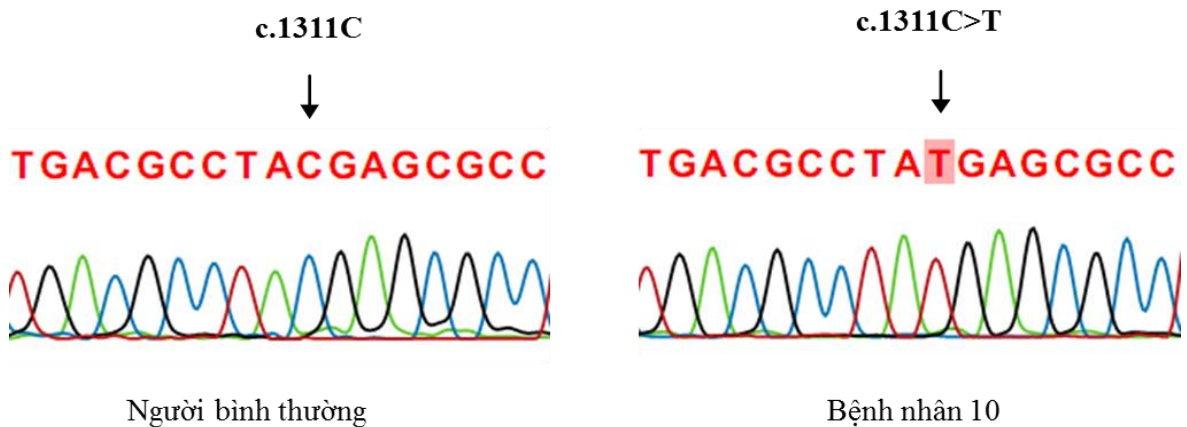


**Hình 3.15. Hình ảnh giải trình tự đột biến Canton và Kaipping trên exon 12 của gen G6PD**

**Nhận xét:** Vị trí nucleotide c.1376 và vị trí c.1388 ở người bình thường trên gen G6PD đều là G, ở bệnh nhân số 11 vị trí này có trình tự lần lượt là T và A. Sự thay đổi trên làm thay đổi bộ ba mã hóa acid amin Arginin tại codon 459 và codon 463 thành Leucin và Histidin.

***Kết quả giải trình tự của đột biến Silent exon 11***

Ngoài ra, ghi nhận 89 đối tượng có vị trí biến đổi nucleotide số c.1311C>T ở exon 11. Trong đó 87 trường hợp biến đổi này tồn tại song song cùng các đột biến G6PD khác, chỉ có 2 trường hợp mới chỉ ghi nhận biến đổi c.1311C>T.



***Hình 3.16. Hình ảnh giải trình tự đột biến c.1311C>T trên exon 11***

**Nhận xét:** Tại vị trí c.1311 trình tự nucleotid của Genbank đều là C, ở bệnh nhân số 10 vị trí này có trình tự lần lượt là T. Bộ ba TAC và TAT cùng mã hóa cho acid amin Tyrosine nên sự thay đổi này không làm thay đổi acid amin.

## 3.2.3.3. Kết quả xác định đột biến gen G6PD theo dân tộc

**Bảng 3.6. Tỷ lệ đột biến phân bố theo các dân tộc tại khu vực miền Bắc**

TT	Tên dạng đột biến	Exon	Kinh	Mường	Tày	Nùng	Thái	Tổng
1.	Gaoha	2	15	2	6	2	1	<b>26</b>
2	Orissa	3	3	-	-	1	-	<b>4</b>
3	Quing Yan	5	12	-	1	-	-	<b>13</b>
4	Valladolid	5	-	-	2	-	-	<b>2</b>
5.	NanKang	1	-	-	1	-	-	<b>1</b>
6.	Địa Trung Hải	1	-	1	-	-	-	<b>1</b>
7.	Comibra Shunde	1	-	1	-	-	-	<b>1</b>
8.	Viangchan	9	62	9	11	1	4	<b>87</b>
9.	Chinese-5	9	9	2	1	1	2	<b>15</b>
10	Taiwan 2	9	1	-	-	-	-	<b>1</b>
11	Union	11	24	21	1	1	2	<b>52</b>
12	Canton	12	35	14	8	4	2	<b>63</b>
13	Kaiping	12	40	5	13	8	7	<b>73</b>
<b>Tổng</b>			<b>201</b> (59,29%)	<b>55</b> (16,22%)	<b>44</b> (12,98)	<b>21</b> (6,19%)	<b>18</b> (5,31%)	<b>339</b>

**Nhận xét:** 13 dạng đột biến chính xuất hiện ở 5 dân tộc, nhiều nhất là người Kinh với 10 dạng đột biến chiếm tỷ lệ 59,29% và loại đột biến lần đầu tiên xuất hiện ở Việt Nam (G6PD Taiwan2) nằm trong nhóm người Kinh. Sau đó đến người Mường với 8 dạng đột biến chiếm 16,22% và cũng thấy có 2 loại chưa từng thấy xuất hiện ở người Việt Nam (G6PD Địa Trung Hải, G6PD Comibra Shunde) nằm trong nhóm người này, người Tày có 44/341 trường hợp (12,98%) với 9 dạng đột biến, trong đó 2 trường hợp dạng G6PD Valladolid lần đầu thấy ở Việt nam đều nằm ở nhóm người này. Cuối cùng người Nùng có 21 trường hợp chiếm 6,19% với 7 dạng đột biến đều đã từng tìm thấy ở Việt Nam.

## 3.2.3.3. Kết quả xác định đột biến gen G6PD theo phân lớp và hoạt độ enzyme

**Bảng 3.7. Phân loại mức độ thiếu hụt G6PD của nhóm nghiên cứu**

Mức độ thiếu G6PD	Nặng ( $<20 \text{ U}/10^{12}$ HC)			Vừa (20-120 $\text{U}/10^{12}\text{HC}$ )			Nhẹ (120-200 $\text{U}/10^{12}\text{HC}$ )			$\bar{X} \pm SD$		
	Nam	Nữ	Tổng	Nam	Nữ	Tổng	Nam	Nữ	Tổng	Nam (312)	Nữ (38)	Chung (350)
Số lượng	98	4	102	204	28	232	10	6	16	35,9±30,9	82,3±45,81	41,3±35,9
Tỉ lệ (%)	29,14			66,29			4,57			(0-186,1)	(2-167,5)	(0-186,1)
<b>p</b>	<b>&lt;0,05</b>									<b>&lt;0,05</b>		

**Nhận xét:** 66,29% bệnh nhân có nồng độ G6PD mức độ vừa, sau đó đến nhóm bệnh nhân mức độ nặng chiếm 29,14%. Hoạt động enzyme của 350 bệnh nhân nhi dao động từ 0-186,1  $\text{U}/10^{12}$  HC với mức trung bình là  $41,3 \pm 35,9 \text{ U}/10^{12}$  HC, trong đó thấp nhất ở 1 bệnh nhân nam có mức enzyme là 0 và cao nhất cũng là 1 bệnh nhân nam có nồng độ là 186,1  $\text{U}/10^{12}$  HC. Không có sự khác biệt có ý nghĩa về hoạt độ enzyme trung bình giữa các nam giới với  $38,3 \pm 32,6 \text{ U}/10^{12}$  HC và nữ giới là  $80,2 \pm 45,4 \text{ U}/10^{12}$  HC ( $p > 0,05$ ).

**Bảng 3.8. Kết quả xác định đột biến gen G6PD theo phân lớp và hoạt độ enzyme**

Lớp/Hoạt độ enzyme ( $\bar{X} \pm SD$ )	TT	Tên đột biến	Vị trí đột biến	Biến đổi acid amin	Số lượng	Tỷ lệ (%)	Hoạt độ enzyme (U/10 <sup>12</sup> HC) (min-max)
<b>Lớp II</b> (38,7±34,82)					<b>280</b>	<b>82,6%</b>	<b>0-186,1</b>
	1	Viangchan	c.871G>A	V291M	87	<b>31,1%</b>	1,01-159,1
	2	Kaipping	c.1388G>A	R463H	73	<b>26,1%</b>	0,3-186,1
	3	Canton	c.1376G>T	R459L	63	<b>22,5%</b>	1,7-173,3
	4	Union	c.1360C>T	R454C	52	<b>18,6%</b>	0-152
	5	Valladolid	c. 406 C>T	A142C	2	0,7%	43,1-53,1
	6	NanKang	c.517 T>G	P173L	1	0,3%	44,2
	7	Địa Trung Hải	c. 563 C>T	S188P	1	0,3%	15,5
	8	Comibra Shunde	592 C>T	A198C	1	0,3%	67,7
<b>Lớp III</b> (53,6±39,78)					<b>59</b>	<b>17,4%</b>	<b>10,1-167,5</b>
	1	Gaohe	c.95A>G	H32A	26		10,1-94,7
	2	Chinese-5	c.1024C>T	L342F	15	4,29	0,01-163,8
	3	Quing Yan	c. 392G>T	G131V	13	3,71	28,3-167,6
	4	Orissa	c.131C>G	A44G	4	1,14	27-78,9
	5	Taiwan2	c.1330G>A	V444I	1	0,29	123,4
<b><math>p &lt; 0,05</math></b>							

**Nhận xét:**

- Theo phân loại của WHO thiếu enzyme G6PD có 5 lớp (I-V). Tất cả các đột biến được phát hiện đều thuộc lớp II và lớp III theo phân loại của WHO, không có biến thể nào nằm trong lớp I và lớp IV, V. Lớp II có 8 loại đột biến với 280 bệnh nhân chiếm 82,6 %, lớp III có 5 loại với 59 bệnh nhân chiếm 17,4% (dạng Taiwan2 được dự đoán thuộc lớp này).

- Hoạt độ enzyme trung bình của lớp II là 38,7±34,82 U/10<sup>12</sup>HC và lớp III là 53,6±39,78 U/10<sup>12</sup>HC, có sự khác biệt với  $p < 0,05$ .

## 3.2.3.4. Kết quả xác định đột biến gen G6PD với hoạt độ enzyme và kiểu gen

**Bảng 3.9. Các dạng đột biến của gen G6PD với hoạt độ của enzyme theo kiểu gen**

TT	Dạng đột biến	n	Hoạt độ enzyme (U/10 <sup>12</sup> HC)	Nam giới (301)		Nữ giới (38)			
				Dị hợp tử	Hoạt độ enzyme (UI/10 <sup>12</sup> HC)	Dị hợp tử	Hoạt độ enzyme (UI/10 <sup>12</sup> HC)	Đồng hợp tử	Hoạt độ enzyme (UI/10 <sup>12</sup> HC)
<b>LỚP II: 280 (82,6%): 38,7±34,82</b>									
1	Viangchan	87	1,01-159,1	77	1,01-159,1	6	61,6-148	4	15,3-105,5
2	Kaiping	73	0,3-186,1	69	0,3-186,1	3	23,7-136	1	21,8
3	Canton	63	1,7-173,3	58	1,68-173,3	4	12,5-131	1	22,8
4	Union	52	0-152	42	0-152	9	20-115,6	1	2
5	Valladolid	2	43,1-53,1	2	43,1-53,1	0	-	0	-
6	NanKang	1	26,7	1	26,7	0	-	0	-
7	Địa Trung Hải	1	15,5	1	15,5	0	-	0	-
8	Comibra Shunde	1	67,7	0	-	1	67,7	0	-
<b>LỚP III: 59 (17,4%): 53,6±39,78</b>									
1	Gaohe	26	10,1-94,7	24	10,1-94,7	2	78,8-84,8	0	-
2	Chinese-5	15	0,01-163,8	12	0,01-171	2	111,04-163,8	1	116,2
3	Quing Yan	13	28,3-167,6	11	28,3-122	2	117-167,6	0	-
4	Orissa	4	27-78,9	3	27-28,3	0	-	1	78,9
5	Taiwan 2	1	123,4	1	123,4	0	-	0	-
	<b>TỔNG</b>	<b>339</b>	<b>41,3±35,9 (0-186,1)</b>	<b>301</b>	<b>35,9 ±30,9 (0-186,1)</b>	<b>29</b>	<b>89,6±44,6 (20 -167,5)</b>	<b>9</b>	<b>56,1± 42,1 (2-116,3)</b>
	p				P1 <0.05, P2<0.05, P3<0.05				

Ghi chú: P1: Nhóm nam dị hợp tử và nữ dị hợp tử; P2: Nhóm nam dị hợp tử và nữ đồng hợp tử; P3: : Nhóm nữ dị hợp tử và nữ đồng hợp tử



**Nhận xét:**

- Xét về dạng đột biến theo kiểu gen: Tổng 301 nam giới có đột biến đều là dạng dị hợp tử (Hemozygous) với nồng độ enzyme là  $35,9 \pm 30,9 \text{ U}/10^{12} \text{ HC}$ , ở nữ giới có 38 bệnh nhân với 2 dạng kiểu hình: đồng hợp tử có 9 bệnh nhân với hoạt động enzyme  $56,1 \pm 42,1 \text{ U}/10^{12} \text{ HC}$  và dị hợp tử có 29 bệnh nhân với hoạt động enzyme  $89,6 \pm 44,6 \text{ U}/10^{12} \text{ HC}$ .

**3.3. Phân tích đột biến gen G6PD ở một số gia đình bệnh nhi**

Từ 341 trẻ thiếu G6PD, chúng tôi tiến hành lấy 25 trẻ thiếu với 25 hộ gia đình tương ứng 12 loại đột biến theo tỷ lệ từ mục tiêu 1. Qua nghiên cứu chúng tôi thu được kết quả như sau:

**3.3.1. Một số đặc điểm địa dư, dân tộc của các gia đình****Bảng 3.10. Đặc điểm địa dư, dân tộc của các gia đình**

TT	Địa dư	Số gia đình	Dân tộc
1	Hà Nội	4	Kinh: 10
2	Hải Dương	3	Mường: 9
3	Hung Yên, Cao Bằng, Hải Phòng, Bắc Giang, Điện Biên, Lào Cai Ninh Bình	2/1 tỉnh thành	Tày, Nùng, Thái: 3 gia đình/1 dân tộc
4	Hoà Bình, Bắc Ninh, Lạng Sơn, Yên Bái	1/1 tỉnh	
<b>Tổng</b>	<b>14 tỉnh/thành phố</b>	<b>25</b>	<b>25</b>

**Nhận xét:** Trẻ được lấy từ 25 hộ gia đình nằm trong 14/25 tỉnh, thành khu vực miền Bắc Việt Nam (Hà Nội: 4 trẻ, Hải Dương: 3 trẻ, Hưng Yên, Cao Bằng, Hải Phòng, Bắc Giang, Điện Biên, Lào Cai Ninh Bình: 2 trẻ/1 tỉnh, Hoà Bình, Bắc Ninh, Lạng Sơn, Yên Bái: 1 trẻ/1 tỉnh), phân bố đều ở 5 dân tộc từ cao xuống thấp: Kinh: 10 trẻ, Mường: 9 trẻ và Tày, Nùng, Thái: 3 trẻ/1 dân tộc

### 3.3.2. Tỷ lệ thiếu enzyme và đột biến gen G6PD các gia đình

**Bảng 3.11. Tỷ lệ phát hiện thiếu enzyme và đột biến gen G6PD của các gia đình**

Thế hệ/Giới			Nam	Nữ	Tổng
Trẻ đến khám			25	5	25
Các thế hệ của gia đình trẻ			61	66	127
I	Anh chị em (19)	<b>n</b>	7	12	19
		Thiếu enzyme	5	7	12
		ĐBG	5	7	12
II	Bố mẹ (50)	<b>n</b>	25	25	50
		Thiếu enzyme	6	23	29
		ĐBG	1	24	25
III	Ông bà (58)	<b>n</b>	29	29	58
		Thiếu enzyme	14	16	30
		ĐBG	12	14	26
Tổng (127)	Thiếu enzyme	Không	36	20	56
		<b>Có</b>	<b>25</b>	<b>46</b>	<b>71</b>
	ĐBG	Không	43	21	64
		<b>Có</b>	<b>18</b>	<b>45</b>	<b>63</b>

**Nhận xét:** Từ 25 trẻ thiếu G6PD (20 nam và 5 nữ) tiến hành lấy được 127 người thuộc các gia đình này, bao gồm 19 anh chị em, 50 bố mẹ và 58 ông bà nội ngoại. Phát hiện 71 trường hợp thiếu enzyme G6PD chiếm 55,9% với 25 nam giới và 46 nữ giới. Đồng thời trong đó tìm thấy 63 trường hợp có đột biến gen chiếm 88,73%, có 18 nam giới và 45 nữ giới.

**Bảng 3.12. Tỷ lệ phát hiện thiếu enzyme G6PD và đột biến của thể hệ ông bà**

Ông/bà	Ông					Bà				
	Tổng	Thiếu enzyme	Không thiếu	ĐB gen	Không ĐB	Tổng	Thiếu enzyme	Không thiếu	ĐB gen	Không ĐB
<b>Nội</b>	6	1	5	0	6	5	0	5	0	5
<b>Ngoại</b>	23	13	10	12	11	24	16	8	14	10
<b>Tổng</b>	<b>29</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>12</b>	<b>17</b>	<b>29</b>	<b>16</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>

**Nhận xét:** 29 cặp ông bà nội ngoại có 6 cặp ông bà nội và 24 cặp ông bà ngoại. Trong đó không có ông bà nội nào có đột biến gen, trừ 1 trường hợp đã được gia đình kê lại bà nội mất do thiếu enzyme G6PD.

**3.3.3. Đặc điểm các loại đột biến với nồng độ enzyme và kiểu di truyền gen G6PD trong các gia đình:**

**Bảng 3.13. Bảng tổng hợp về các loại đột biến theo kiểu di truyền gen**

TT	Loại đột biến	Số gia đình	Kiểu gen									Hoạt độ enzyme (UI/10 <sup>12</sup> HC)	
			Trẻ khám		Anh/chị/em		Bố/mẹ			Ông/bà			Tổng
			Nam DHT	Nữ DHT	Nam DHT	Nữ DHT	Nam DHT	Nữ DHT	Nữ ĐHT	Nam DHT	Nữ DHT		
												93,5 ± 65,8 (1-182,8)	
1	Gaohe (c.95A>G)	2 (8%)	2	-	-	-	-	2	-	2	-	6 (6,8%)	13,3-132
2	Orissa (c.131 C>G)	1 (4%)	1	-	-	-	-	1	-	-	1	3 (3,4%)	26,3-134,4
3	Quing Yan (c. 392G>T)	1 (4%)	1	-	-	1	-	1	-	-	1	4 (4,5%)	24,13- 137,2
4	Valladolid (c.406 C>T)	1 (4%)	1	-	1	-	-	1	-	1	-	4 (4,5%)	37,36- 107,4
5	NanKang (c.517 T>G)	1 (4%)	1	-	-	-	-	1	-	-	1	3 (3,4%)	44,2-109,2

6	Địa Trung Hải (c. 563 C>T)	1 (4%)	1	-	-	-	-	1	-	1	-	3 (3,3%)	15,5-98,7
7	Comibra Shunde (592 C>T)	1 (4%)	-	1	-	1	-	1	-	1	-	4 (4,5%)	28,1-67,7
8	Viangchang (c.871G>A)	5 (20%)	4	1	1	1	1	4	-	3	2	16 (18,2%)	1,7-156,8
9	Chinese-5 (c.1024C>T)	1 (4%)	1	-	-	1	-	-	1	1	1	5 (5,7%)	1-165,1
10	Union (c.1360C>T)	3 (12%)	2	1	2	-	-	2	1	1	3	12 (13,6%)	1,44-182,1
11	Canton (c.1376G>T)	4 (16%)	2	2	-	3	-	4	-		4	15 (17%)	17,09-159
12	Kaiping (c.1388G>A)	4 (16%)	4	-	1	-	-	4	-	2	2	13 (14,8%)	8,24-180.2
<b>Tổng số</b>		<b>25</b>	<b>20</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>22</b>	<b>2</b>	<b>12</b>	<b>14</b>	<b>88</b>	
		<b>Nam: 18, Nữ: 45</b>											
		<i>Nữ DHT: 43 (68,23%), Nữ ĐHT: 2(3,17%) Nam DHTs: 18 (28,6%)</i>											

**Nhận xét:** 25 gia đình với 12 dạng đột biến, trừ các trường hợp bệnh nhi được phát hiện từ mục tiêu 1, phát hiện tiếp tổng 63 trường hợp trong đó 45 trường hợp là nữ (43 dị hợp tử chiếm 68,23% và 2 đồng hợp tử chiếm 3,17%), 18 nam đều là dạng dị hợp tử chiếm 28,6%. Hoạt độ enzyme của các thành viên trong gia đình dao động:  $93,5 \pm 65,8$  UI/10<sup>12</sup> HC, trong đó thấp nhất là 1 UI/10<sup>12</sup> HC và cao nhất là 182,8 UI/10<sup>12</sup> HC

**Bảng 3.14. Bảng phân bố các kiểu di truyền theo các thế hệ**

TT	Loại di truyền		Số gia đình
3	Bà ngoại (12: 48%)	1 cháu trai	8
4		2 cháu trai	1
5		cháu trai, cháu gái	2
6		2 cháu gái	1
1	Ông ngoại (10:40%)	cháu trai	7
2		cháu trai, cháu gái	3
7	Ông bà ngoại (2: 8%)	cháu trai, cháu gái	2
8	Bà nội (1: 4%)	cháu trai, cháu gái	1
<b>Tổng số gia đình</b>			<b>25</b>

**Nhận xét:** 88% là di truyền từ ông bà ngoại cho mẹ rồi tiếp tục truyền cho cháu của họ. Trong đó nhiều nhất là bà ngoại di truyền bệnh, song đến ông ngoại.

**Một số hình ảnh di truyền sơ đồ di truyền của các loại đột biến**

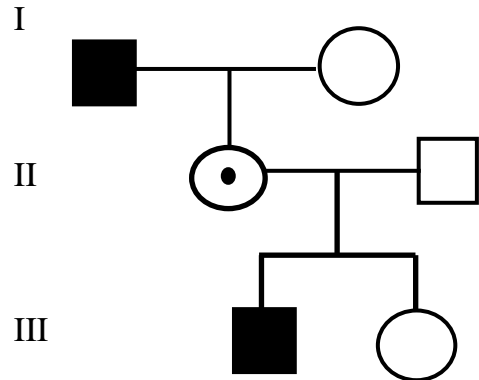
Chú thích:

□ Nam bình thường

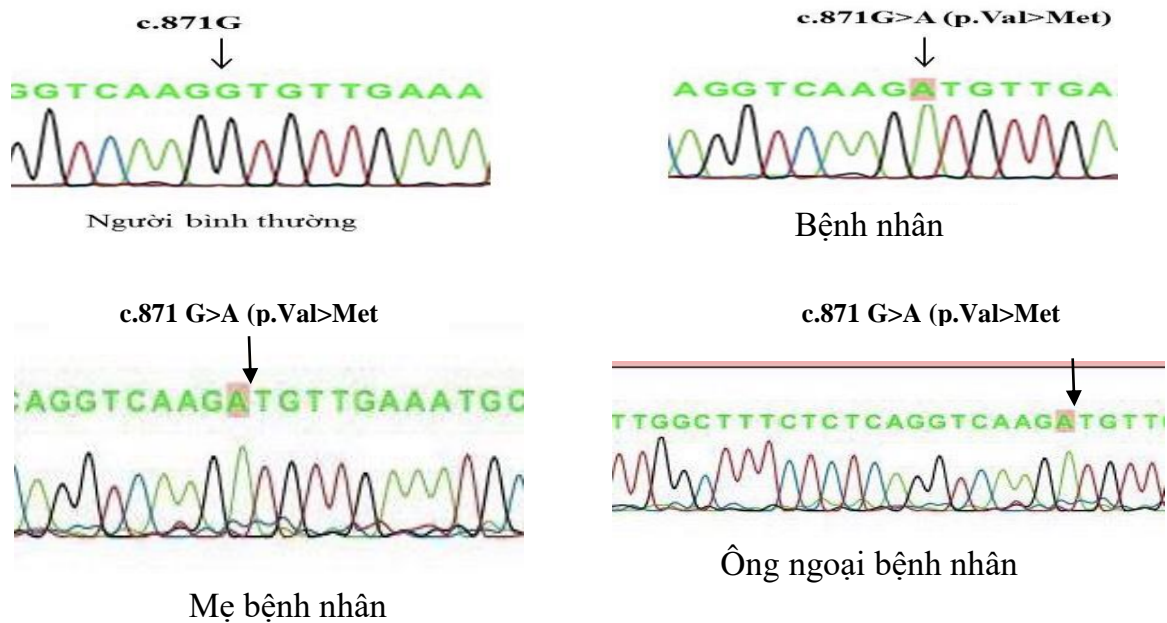
○ Nữ bình thường

■ Nam thiếu G6PD

● Nữ G6PD dị hợp tử



**Hình 3.17. Sơ đồ phả hệ gia đình bệnh nhân với lại đột biến Viangchang (c.871G>A) ông ngoại (Hemo) truyền cho mẹ (Hete), mẹ truyền cho con trai (Hemo).**



**Hình 3.18. Hình ảnh giải trình tự đột biến Viangchan trên exon 9 của gen G6PD ở gia đình bệnh nhân số 5**

**Nhận xét:** Vị trí c.871 trình tự nucleotid của Genbank là G, trong khi đó vị trí này ở bệnh nhân thuộc gia đình số 3 có trình tự là A. Sự thay đổi trên làm thay đổi bộ ba mã hóa acid amin tại codon 291 từ Valin thành Methionin.

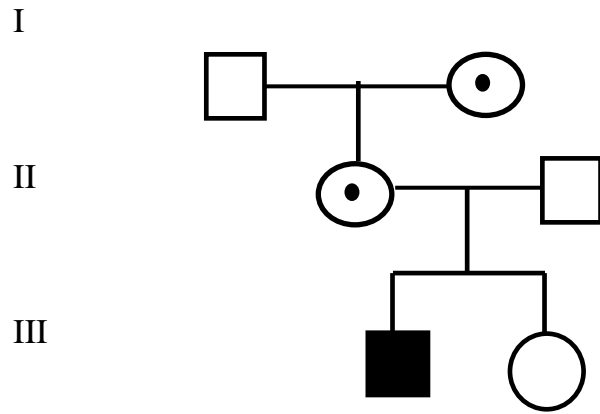
Chú thích:

□ Nam bình thường

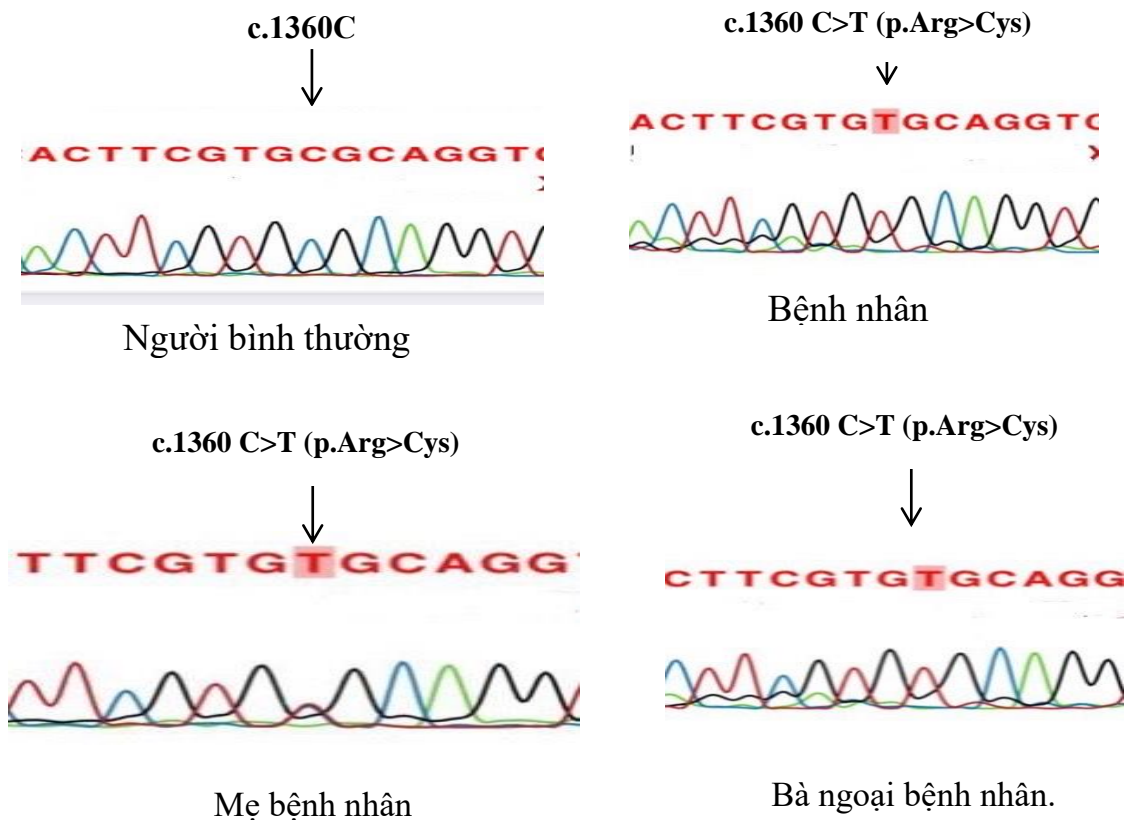
○ Nữ bình thường

■ Nam thiếu G6PD

○● Nữ G6PD dị hợp tử



**Hình 3.19. Sơ đồ phả hệ gia đình bệnh nhân 11 với lại đột biến dạng Kaiping (c.1388G>A) bà ngoại DHT (Hete) truyền cho mẹ DHT, mẹ truyền cho con trai (Hemo)**



**Hình 3.20. Hình ảnh giải trình tự đột biến Kaiping trên exon 9 của gen G6PD ở gia đình bệnh nhân số 35**

**Nhận xét:** Vị trí c.871 trình tự nucleotid của Genbank là G, trong khi đó vị trí này ở bệnh nhân thuộc gia đình số 3 có trình tự là A. Sự thay đổi trên làm thay đổi bộ ba mã hóa acid amin tại codon 291 từ Valin thành Methionin.



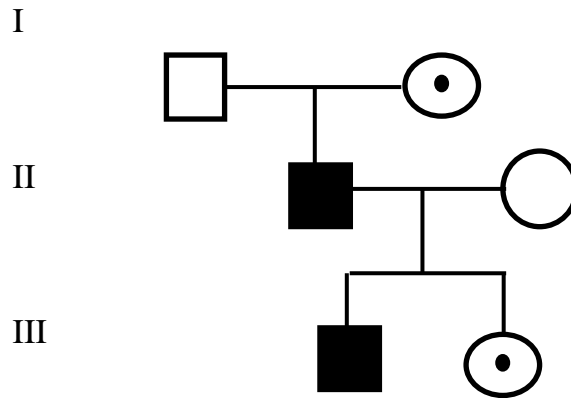
Chú thích:

□ Nam bình thường

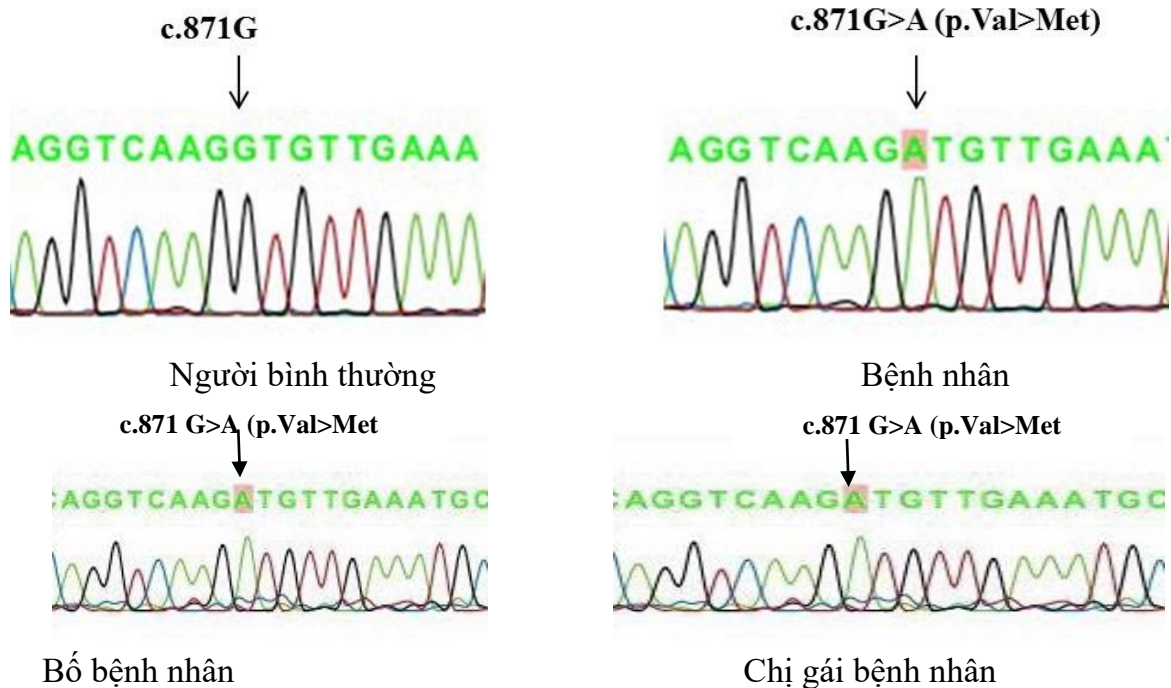
○ Nữ bình thường

■ Nam thiếu G6PD

○● Nữ G6PD dị hợp tử



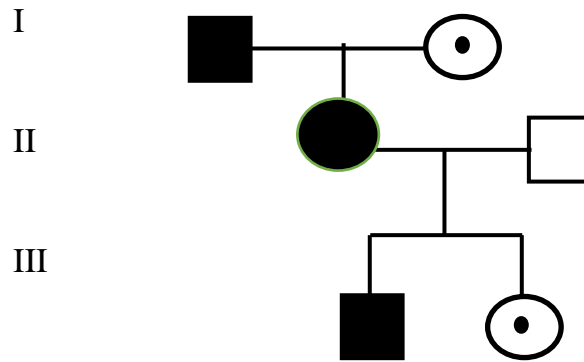
**Hình 3.21. Sơ đồ phả hệ gia đình bệnh nhân với lại đột biến dạng Viangchan (c.871G>A) bà nội (Đã mất) truyền cho bố (Hemi), bố truyền cho con gái (Hete) và cả con trai (Hemi).**



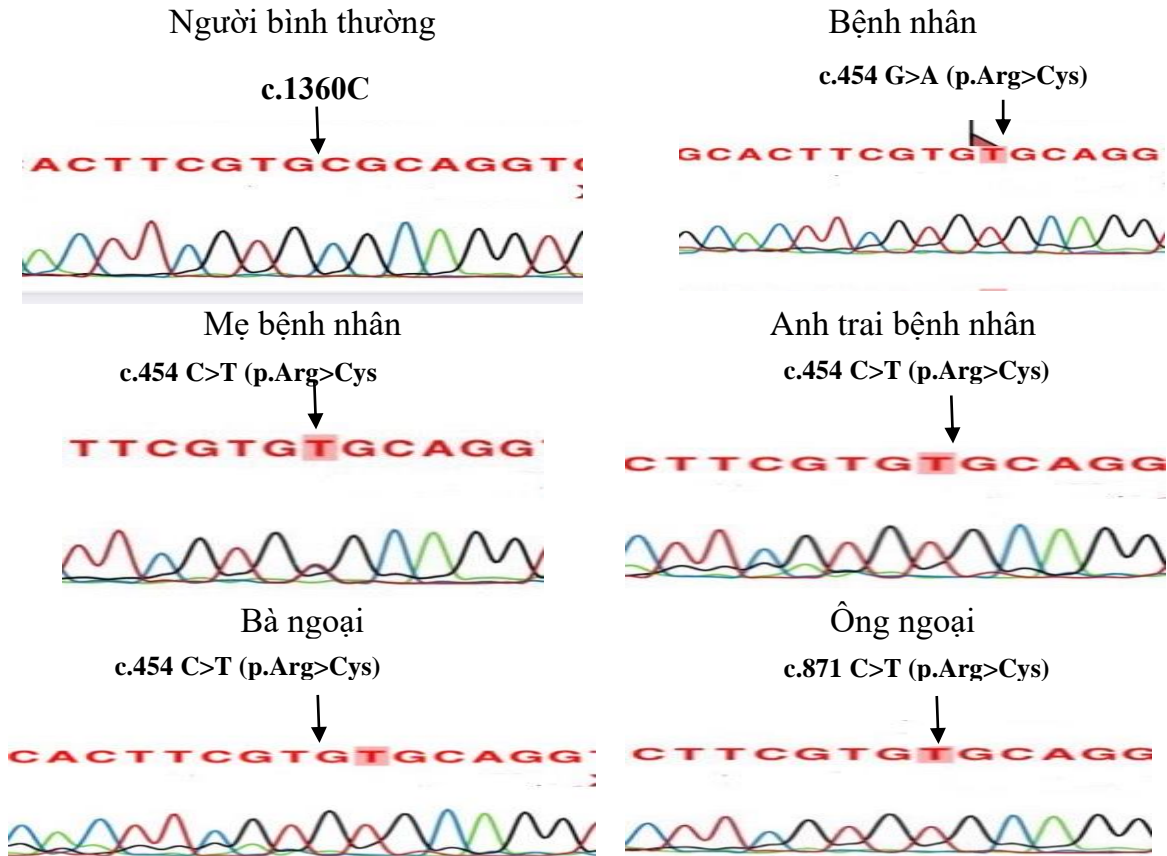
**Hình 3.22. Hình ảnh giải trình tự đột biến Viangchan trên exon 9 của gen G6PD ở gia đình bệnh nhân số 24**

**Nhận xét:** Vị trí c.871 trình tự nucleotid của Genbank là G, trong khi đó vị trí này ở bệnh nhân thuộc gia đình số 3 có trình tự là A. Sự thay đổi trên làm thay đổi bộ ba mã hóa acid amin tại codon 291 từ Valin thành Methionin.

- Chú thích:**
- Nam bình thường
  - Nữ bình thường
  - Nam thiếu G6PD
  - Nữ thiếu G6PD DHT
  - Nữ thiếu G6PD ĐHT



**Hình 3.23. Sơ đồ phả hệ gia đình bệnh nhân với lại đột biến dạng Union (c. 1360 C>T) cả ông ngoại (Hemi) và bà ngoại (Hete) truyền cho con gái (Homo), mẹ truyền cho cả con gái (Hete) và cả con trai (Hemi)**



**Hình 3.24. Hình ảnh giải trình tự đột biến Union trên exon 11 của gen G6PD ở gia đình bệnh nhân số 239**

**Nhận xét:** Vị trí c.1360 trình tự nucleotid của Genbank là C, trong khi đó vị trí này ở bệnh nhân thuộc gia đình số 239 có trình tự là T. Sự thay đổi trên làm thay đổi bộ ba mã hóa acid amin tại codon 454 từ Arginin thành Cystein.

## Chương 4 BÀN LUẬN

### 4.1. Một số đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu

#### 4.1.1. Đặc điểm về tuổi, giới, địa dư và dân tộc

Thiếu hụt G6PD là một bệnh di truyền liên kết trên NST giới tính X và không có alen tương ứng trên NST Y nên nam giới thường bị ảnh hưởng thường xuyên hơn nữ giới và có thể tất cả nam giới đều có biểu hiện thiếu hụt enzyme khi mang bất kỳ loại biến thể G6PD nào. Ở nam giới chỉ có một NST X sẽ xảy ra như một kiểu gen dị hợp tử bình thường (Gd +) hoặc thiếu (Gd-). Nhưng ở nữ giới, do có hai bản sao của gen G6PD trên mỗi NST X nên xảy ra có thể như một kiểu gen đồng hợp tử bình thường (Gd +/Gd +), đồng hợp tử thiếu (Gd-/Gd-) hoặc dị hợp tử (Gd-/Gd +)<sup>2</sup>. Tuy nhiên, đồng hợp tử ở nữ giới hiếm gặp mà chủ yếu gặp dị hợp tử khi mang 1 alen X thiếu hụt với hoạt động của enzyme G6PD dao động từ mức độ thiếu hụt nghiêm trọng đến mức độ thiếu nhẹ và bình thường. Sở dĩ có điều này là do đặc điểm nữ giới với một alen X, sự biểu hiện của sự thiếu hụt G6PD theo thuyết sự bất hoạt ngẫu nhiên của một trong hai NST X sớm trong đời sống phôi thai (Lyonization) nên có thể tìm thấy hỗn hợp tế bào bình thường và thiếu enzyme nên thể hiện sự biến đổi tùy thuộc vào mức độ khảm tế bào soma<sup>93,94</sup>.

#### *Về tuổi và giới tính*

Nghiên cứu này của chúng tôi trên 350 trường hợp trẻ thiếu hụt G6PD đến khám và được chẩn đoán thiếu G6PD, bảng 3.1 cho thấy, 78% là trẻ em dưới 1 tháng tuổi và gần 2% trẻ trên một tuổi. Đồng thời nam giới: 312 trẻ với tỷ lệ 89,14%, còn lại trẻ nữ chỉ có 38 cháu chiếm 10,86%. Kết quả này phù hợp mô hình di truyền của bệnh và tương tự với các nghiên cứu về G6PD ở dân số Việt Nam hay các nghiên cứu khác của quốc tế. Theo tác giả Đinh Thị My xét nghiệm thiếu G6PD tại khoa sơ sinh Bệnh viện Nhi Trung Ương<sup>95</sup> cho biết sàng lọc 700 bệnh nhân, trong đó có 377 trẻ nam chiếm 54% và 323 trẻ nữ chiếm 46%. **Và gần đây nhất năm 2021, 2022 các nghiên cứu của một số tác giả khu vực miền Nam Việt Nam tại bệnh viện Phụ Sản thành phố Cần Thơ trong chương trình SLSS cho kết quả tỷ lệ thiếu**

G6PD: giai đoạn 2017-2020 là 1,02%, nam mắc bệnh gấp 4,8 lần nữ, năm 2021-2022 tỷ lệ thiếu là 1,67% trong đó nam là 2,55%, nữ là 0,7%<sup>67,96</sup>. Cũng trong chương trình SLSS này tại bệnh viện Đại học Y Dược TP HCM thì tỷ lệ thiếu lên đến 3,09% trong đó nam giới chiếm 2/3<sup>14</sup>. Ở khu vực miền Bắc một nghiên cứu mới đây của nhóm tác giả tại bệnh viện đa khoa Quốc tế Hải Phòng ở 46 bệnh nhân với độ tuổi từ 6,6-26,6 thì cũng cho tỷ lệ thiếu G6PD ở nam giới là 65,2%<sup>23</sup>. Như vậy dù ở trẻ sơ sinh hay ở đối tượng trẻ em lớn hơn tỷ lệ ở nam giới luôn cao hơn nữ. Các nghiên cứu trước đây, từ tác giả Lucio Luzzatto<sup>20</sup> khi nói đến hội chứng tan máu cấp do ăn đậu Fava hoặc trong chương trình phòng chống SR toàn cầu cho đến các nghiên cứu gần đây về các đối tượng thiếu G6PD ở trẻ em<sup>97-99</sup> hoặc người lớn ở các khu vực SR lưu hành<sup>100-102</sup> và gần đây nhất là nghiên cứu về các đột biến G6PD tại các nước tiểu vùng sông Mê Kông mở rộng trong đó có Việt Nam<sup>10</sup> đều cho kết quả tương tự.

Chính với đặc điểm này, từ năm 1989, WHO đã đưa ra khuyến cáo cần tiến hành sàng lọc tình trạng thiếu enzyme G6PD ở trẻ sơ sinh tại những vùng có tỷ lệ mắc bệnh 3-5% ở nam giới, trong đó có Việt Nam<sup>11,86</sup>. Mục tiêu của các khuyến nghị sàng lọc của WHO là nhanh chóng phát hiện trẻ sơ sinh có nguy cơ cao bị vàng da, tăng bilirubin trong máu để kịp thời điều trị nhằm ngăn ngừa các kết quả bất lợi về nhiễm độc thần kinh. Các quốc gia đã thực hiện các chương trình sàng lọc sơ sinh về tình trạng thiếu hụt G6PD có hoặc không kèm theo kết hợp chương trình giáo dục của cha mẹ, trong đó có Việt Nam cũng nằm trong chương trình này nhưng chưa thực sự hiệu quả. Năm 2006, nhận thức thấy tầm quan trọng của việc nâng cao chất lượng dân số, Bộ Y tế đã triển khai Đề án nâng cao chất lượng dân số thông qua xây dựng và mở rộng hệ thống sàng lọc trước sinh và sàng lọc sơ sinh. Chương trình tầm soát, chẩn đoán trước sinh và sơ sinh được bắt đầu triển khai thí điểm từ năm 2007 trên địa bàn của 20 tỉnh, thành phố sau đó mở rộng triển khai ở 63/63 tỉnh/thành phố trên cả nước. Các Trung tâm sàng lọc tại các khu vực đã triển khai thí điểm việc tầm soát, chẩn đoán một số bệnh trước sinh và sơ sinh, trong đó có 2 bệnh là thiếu G6PD và suy giáp trạng bẩm sinh được tiến hành sàng lọc rất hiệu

quả, khiến cho việc các trẻ em được chẩn đoán sớm tại các tỉnh. Sàng lọc bệnh thiếu G6PD rất dễ thực hiện qua kỹ thuật lấy 1 giọt máu khô gót chân của trẻ sơ sinh bằng phương pháp định tính, phân tích, xét nghiệm nhanh dựa trên nguyên lý đo điểm huỳnh quang bán định lượng tại các cơ sở y tế vì vậy trẻ được phát hiện sớm hơn mặc dù chưa có biểu hiện lâm sàng. Tất cả các trường hợp có nghi ngờ dương tính đều được giới thiệu đến các cơ sở xét nghiệm uy tín để tiến hành các xét nghiệm định lượng có độ tin cậy cao. Đa phần trẻ sơ sinh khu vực quanh Hà Nội và khu vực Miền Bắc đã được sàng lọc sơ sinh nên hầu như sau sàng lọc gia đình nhanh chóng đưa trẻ đến khám và chẩn đoán xác định thiếu G6PD tại bệnh viện Nhi Trung ương là tuyến cuối cùng trong khám chữa bệnh cho trẻ em. Vì vậy, về độ tuổi của trẻ đến khám và phát hiện thiếu hụt G6PD trong nghiên cứu của chúng tôi, 99% nằm trong khoảng trẻ dưới 2 tuổi trong đó gần 98% là trẻ dưới 1 tuổi.

#### *Về đặc điểm về địa dư, dân tộc*

Miền Bắc Việt Nam hiện nay bao gồm 25 tỉnh thành chia thành 3 vùng lãnh thổ nhỏ: Khu vực Tây Bắc Bộ bao gồm 6 tỉnh: Lào Cai, Yên Bái, Điện Biên, Hoà Bình, Lai Châu, Sơn La. Vùng này chủ yếu nằm ở hữu ngạn sông Hồng. Riêng Lào Cai, Yên Bái đôi khi vẫn được xếp vào tiểu vùng đông bắc. Khu vực Đông Bắc Bộ bao gồm 9 tỉnh: Hà Giang, Cao Bằng, Bắc Kạn, Lạng Sơn, Tuyên Quang, Thái Nguyên, Phú Thọ, Bắc Giang, Quảng Ninh. Khu vực Đồng bằng sông Hồng bao gồm 10 tỉnh thành: Bắc Ninh, Hà Nam, Hà Nội, Hải Dương, Hải Phòng, Hưng Yên, Nam Định, Ninh Bình, Thái Bình, Vĩnh Phúc (<https://vi.wikipedia.org/wiki>).

Trong nghiên cứu của chúng tôi, tại bảng 3.2, kết quả là tất cả các tỉnh thành thuộc các khu vực đều có trẻ đến khám do thiếu G6PD, đặc biệt các tỉnh thuộc khu vực đồng bằng sông Hồng trong đó có thủ đô Hà Nội. Cụ thể: Hà Nội: 170 trẻ, Hà Giang: 19 trẻ, Phú Thọ: 17 trẻ, Vĩnh Phúc và Thái Nguyên đều 14 trẻ, Sơn La: 12 trẻ, Hải Dương: 9 trẻ, Hoà Bình, Bắc Giang, Ninh Bình, Bắc Ninh, Nam Định, Yên Bái bằng nhau: 7 trẻ, Lào Cai, Quảng Ninh, Tuyên Quang đều 6 trẻ, Hưng Yên và Cao Bằng đều 5 trẻ, Hà Nam, Bắc Kạn, Lạng Sơn, Thái Bình đều 4 trẻ, Điện Biên và ít nhất là 3 tỉnh Lai Châu, Hải Phòng đều 3 trẻ. Và nếu chia theo khu vực thì khu

vực Đồng bằng Sông Hồng chiếm số lượng bệnh nhi và tỷ lệ cao nhất: 230 bệnh nhi (65,7%), sau đó đến khu vực Đông Bắc Bộ có 82 bệnh nhi (chiếm 23,4%) và ít nhất là khu vực Tây Bắc Bộ có 38 bệnh nhi (chiếm 11,7%). Điều này hoàn toàn dễ giải thích vì khu vực này bao gồm nhiều tỉnh nhất trong khu vực (10 tỉnh) và các tỉnh thuộc khu vực này nói về trình độ dân trí và phát triển kinh tế thì cao hơn khu vực Đông Bắc và Tây Bắc. Đây là vùng trung tâm giao lưu giữa các khu vực khác trong miền Bắc đồng thời cũng là đầu mối giao thông, giao lưu dịch vụ, thương mại, du lịch của các tỉnh phía Bắc. Vì vậy, so với các khu vực khác thì Đồng bằng Sông Hồng có điều kiện tự nhiên thuận lợi hơn cho phát triển kinh tế, nên nhân dân sống tại vùng này cũng quan tâm đến sức khỏe bệnh tật hơn. Khu vực Tây Bắc và Đông Bắc có địa hình phức tạp, việc đi lại và giao lưu kinh tế giữa các địa phương trong vùng đặc biệt là vùng cao, vùng xa gặp nhiều khó khăn. Đây cũng là khu vực tập trung nhiều dân tộc khác nhau: Tày, Nùng, Dao,... có khoảng trên 30 dân tộc trong vùng (<https://vi.wikipedia.org/wiki>).

Về dân tộc, Việt Nam bao gồm hơn 54 dân tộc anh em trải từ Bắc vào Nam. Trong đó, dân tộc Kinh là nhiều nhất 85,7% dân số Việt Nam, sau đó đến Tày, Thái, Mường, H'mông, Khmer, Nùng. ([https://vi.wikipedia.org/wiki/Danh\\_s%C3%A1ch\\_c%C3%A1c\\_d%C3%A2n\\_t%E1%BB%99c\\_Vi%E1%BB%87t\\_Nam\\_theo\\_s%E1%BB%91\\_d%C3%A2n](https://vi.wikipedia.org/wiki/Danh_s%C3%A1ch_c%C3%A1c_d%C3%A2n_t%E1%BB%99c_Vi%E1%BB%87t_Nam_theo_s%E1%BB%91_d%C3%A2n)). Các dân tộc này cũng chủ yếu nằm ở các tỉnh phía Bắc Việt Nam. Vì vậy, trong nghiên cứu ở trẻ em thiếu G6PD thuộc khu vực miền Bắc cũng là số trẻ chiếm tỷ lệ cao nhất nằm trong 5 nhóm dân tộc Kinh, Mường và Tày, Thái, Nùng. Cụ thể tại Biểu đồ 3.1 cho thấy, nhóm dân tộc Kinh chiếm tỷ lệ nhiều nhất 210/350 (đến 60%), sau đó đến dân tộc Mường 55/350 (15,71%), và Tày 45/350 (12,86%), Nùng 22/350 (6,29%), ít nhất là người Thái 18/350 trường hợp (5,14%). Điều này hoàn toàn phù hợp bởi vì bệnh viện Nhi Trung Ương là tuyến cuối cùng trong điều trị cho trẻ em nên phần lớn các tỉnh miền Bắc đều về khám tại đây, đặc biệt khu vực Hà Nội là nơi thuận lợi về mặt địa lý và với dân cư chủ yếu người Kinh, sau đó mới đến các các tỉnh lân cận và các tỉnh thuộc khu vực miền Bắc với các dân tộc khác. Trước khi về viện Nhi Trung Ương

khám, thông qua chương trình sàng lọc sơ sinh về bệnh thiếu G6PD được diễn ra trên cả nước từ nhiều năm trước đây, trẻ đã được sàng lọc máu bằng gót chân để định hướng đến bệnh này, sau đó dưới sự tư vấn của nhân viên y tế hoặc gia đình tự nguyện đưa trẻ đến khám. Tuy nhiên nhược điểm của nghiên cứu này chưa lấy được toàn bộ số trẻ sơ sinh đã qua sàng lọc từ các tỉnh nên nghiên cứu cũng chưa đủ để phản ánh được đúng tỉ lệ mắc bệnh từ các tỉnh cũng như các dân tộc khác nhau. Vì vậy, chúng tôi coi đây là nghiên cứu bước đầu để phản ánh tỷ lệ mắc bệnh thiếu enzyme G6PD ở các tỉnh cũng như các dân tộc trong khu vực miền Bắc Việt Nam. Trong thời gian tới, đây là tiền đề để thực hiện các nghiên cứu với cỡ mẫu mở rộng hơn, đánh giá đầy đủ và để phản ánh được đúng tỉ lệ mắc bệnh từ các tỉnh cũng như các dân tộc khác nhau thuộc khu vực này. Liên hệ với các nghiên cứu trước đây cho thấy, hầu hết các nghiên cứu đã chỉ ra rằng sự phân bố các mức độ phổ biến và các biến thể thiếu enzyme G6PD khác nhau đều có liên quan đến các vùng địa lý và các nhóm dân tộc trên toàn thế giới cũng như ở Việt Nam. Điều này sẽ được chúng tôi bàn luận kỹ hơn khi nói về các biến thể của G6PD. Về tỷ lệ bị bệnh của các dân tộc tại Việt Nam, cũng đã có nhiều nghiên cứu chia theo khu vực. Một số nghiên cứu điển hình như năm 2000, tác giả P.Verlé, Đoàn Hạnh Nhân, Tạ Thị Tĩnh và cộng sự<sup>87</sup> nghiên cứu trên 2 huyện thuộc 4 tỉnh miền Bắc ở các đối tượng trẻ em từ 5 đến 15 tuổi (trung bình 11 năm) thuộc 6 dân tộc (người Dao, người Kinh, người Mông, người Mường, người Thái và người Thổ) cho thấy tỷ lệ thiếu G6PD ở 6 dân tộc này dao động từ 0,3% đến 31% và ở nam là 39,5%, ở nữ là 13,7%, cao nhất là người Mường, không thấy có ở người Kinh. Có thể do đặc thù đối tượng lựa chọn trong nghiên cứu thuộc các tỉnh miền núi, nơi có ít người Kinh sinh sống. Hoặc trong nghiên cứu của tác giả Phạm Mai Hương Trang<sup>103</sup> cũng cho biết số lượng trẻ bị thiếu G6PD thuộc dân tộc Kinh chiếm cao nhất (18/43), các dân tộc khác: Tày, Dao, Sán Cháy, Sán Dìu, Mường, Nùng với các tỉ lệ tương ứng là 11/43, 6/43, 4/43, 2/43, 1/43, 1/43. Và đồng thời với nghiên cứu của tác giả Hoàng Thu Trang<sup>104</sup> tại bệnh viện phụ sản Trung ương trong chương trình sàng lọc trước sinh xác định tỷ lệ thiếu G6PD ở trẻ sơ sinh tại một số tỉnh phía Bắc cho biết qua 12955 mẫu thu thập tại 3

tỉnh Thái Nguyên, Thanh Hóa, Hải Phòng thì tỷ lệ thiếu G6PD chung là 3.4% và tỷ lệ thiếu của 3 tỉnh Hải Phòng, Thanh Hóa, Thái Nguyên lần lượt là 2,5%, 3,9%. Hoặc một nghiên cứu gần đây tại các tỉnh đồng bằng sông Cửu Long đến khám và sàng lọc tại bệnh viện phụ sản thành phố Cần Thơ thấy bệnh phân bố rộng ở cả 12 tỉnh trong đó cao nhất là Trà Vinh và Sóc Trăng và với 5 nhóm dân tộc thì cũng tập trung vào phần nhiều là Khmer và Hoa, là 2 dân tộc chiếm tỷ lệ cao các tỉnh này<sup>67</sup>. Cũng với nghiên cứu của nhóm tác giả với 1 cỡ mẫu nhỏ ở 8/14 dân tộc tại vùng lưu hành SR của tỉnh Đắk Nông cũng thấy tỷ lệ thiếu G6PD 2,31% nam nhiều hơn nữ, sự phân bố các biến thể G6PD Viangchan, Mahidol, Canton, của 8 dân tộc này cũng khác nhau<sup>105</sup>.

So sánh kết quả này với các nghiên cứu trên thế giới thì hầu hết các tác giả đều có nhận xét về tỷ lệ hiện mắc thiếu G6PD mức độ phổ biến hơn ở nam và có sự khác biệt giữa các nhóm dân tộc và các vùng miền. Cụ thể tại các nước khu vực Đông Nam Á: Ở Thái Lan khi chia ra theo 3 khu vực như ở Việt Nam cho thấy: khu vực miền Bắc Thái Lan tỉ lệ quan sát được: 16,6% ở nam và 15,2% ở nữ hoặc 14,28% ở nam và 12,82% ở nữ tại dân tộc Lue<sup>102</sup>, nhóm dân cư ở miền Trung Thái Lan là 11,10% ở nam và 5,80% ở nữ<sup>106</sup> và miền Nam Thái Lan 9,75% ở nam và 10,36% ở nữ<sup>107</sup>. Ở Myanmar: 11,60% ở nam và 9,60% ở nữ, Lào: 8,80% ở nam và 4,50% ở nữ, Campuchia: 26,10% ở nam và 3,10% ở nữ; Malaysia: 5,30% ở nam và 1,05% ở nữ<sup>70,108,109</sup>. Đồng thời cũng có sự phù hợp về khác biệt giữa các biến thể của G6PD theo nhóm, vùng, dân tộc so với các nghiên cứu trước đây, điều này sẽ được phân tích kỹ ở phần sau.

#### **4.1.2. Đặc điểm các chỉ số hồng cầu**

Theo bảng 3.3 cho thấy, các chỉ số số lượng hồng cầu, Hemoglobin, Hematocrit có xu hướng bình thường giới hạn dưới và không có sự khác biệt ở cả trẻ nam và nữ, đặc biệt lượng Hb trung bình của trẻ nam 105,76 g/l và 104.38 g/l của trẻ nữ đều thấp hơn trung bình so với giá trị của bình thường ở cả nam và nữ thuộc các lứa tuổi từ sơ sinh đến dưới 6 tuổi là 111,25 g/l<sup>110,111</sup>. Nhưng khi so sánh giới hạn nồng độ Hb của cả trẻ nam và trẻ nữ với giá trị bình thường này thì đều



không có sự khác biệt với  $p > 0,05$ . Điều này cho thấy trẻ thiếu G6PD hầu như không có biểu hiện lâm sàng, cụ thể là thiếu máu do tan máu nếu như không có sự tiếp xúc với các chất nguy cơ gây tan máu. Nhóm trẻ trong nghiên cứu này hầu hết đều đến viện khám qua sàng lọc ở các bệnh viện tuyến tỉnh chứ không phải do xuất hiện các triệu chứng lâm sàng của bệnh. Còn các chỉ số MCV, MCH, MCHC, RDW đều và cũng đều không có sự khác biệt giữa nam và nữ với  $p < 0,05$  và trong giới hạn bình thường khi so với giá trị bình thường của trẻ giai đoạn này. Điều này cũng hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu của tác giả Quách Xuân Hình tiến hành khảo sát xem có mối liên quan giữa giá trị các chỉ số số lượng hồng cầu và nồng độ Hb trong máu ngoại vi ở 2 nhóm đối tượng có thiếu hụt và không thiếu hụt G6PD cho thấy không có sự khác biệt giữa 2 nhóm đối tượng<sup>112</sup>. **So sánh với các nghiên cứu chỉ số hồng cầu ở bệnh nhân thiếu G6PD có nhóm tác giả của bệnh viện đa khoa Quốc tế Hải Phòng cũng cho kết quả tương tự về nồng độ Hb và Hematorit<sup>23</sup>**

## **4.2. Xác định các đột biến gen G6PD**

### **4.2.1. Kết quả tách chiết DNA**

Để tiến hành xác định đột biến trên gen G6PD, tách chiết DNA là bước đầu tiên quan trọng và có ảnh hưởng trực tiếp đến kết quả của các kỹ thuật sinh học phân tử tiếp theo. DNA tách chiết được phải đảm bảo không bị đứt gãy, không nhiễm tạp chất đồng thời phải đạt đủ nồng độ để thực hiện các kỹ thuật tiếp theo. Mục đích cuối cùng của nghiên cứu là giải trình tự gen xác định đột biến nên việc tách chiết DNA thu được sản phẩm có nồng độ và độ tinh sạch cao sẽ giúp cho hình ảnh kết quả giải trình tự được rõ nét, không bị nhiễu và có tính tin cậy cao. Hiện nay có rất nhiều phương pháp tách chiết DNA, tùy thuộc mục đích nghiên cứu mà lựa chọn phương pháp phù hợp. Trong nghiên cứu này, kỹ thuật tách chiết DNA được tiến hành sử dụng kit The Wizard Genomic DNA purification của hãng Promega. Quá trình tách chiết tuân theo nguyên lý chung gồm các bước theo thứ tự: phá vỡ màng tế bào và màng nhân, loại bỏ các tạp chất và thu được DNA hoà tan, cuối cùng là tủa DNA. Ưu điểm khi tách chiết sử dụng kit của hãng Promega là hoá chất được sản xuất theo kit nên dễ dàng sử dụng, tốn ít thời gian do không cần pha

ché vì vậy thao tác tuân thủ đúng quy trình chuẩn thì sản phẩm DNA thu được thường có nồng độ và độ tinh sạch cao. Tất cả các mẫu DNA của bệnh nhân trong nghiên cứu sau khi tách chiết đều được kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch bằng phương pháp đo độ hấp thụ quang trên máy Nanodrop 2000c tại các bước sóng 260 nm (A260) và 280 nm (A280). Giá trị đo OD ở bước sóng 260 nm của các mẫu DNA cho phép xác định nồng độ DNA trong dung dịch. Tỷ số A260/A280 cho biết độ tinh sạch của mẫu DNA tách chiết được. Kết quả này cho thấy nồng độ DNA tổng số trong các mẫu dao động trong khoảng từ 30,6 ng/μl đến 283 ng/μl. Tất cả các mẫu đều có độ tinh sạch cao, A260/A280 nằm trong khoảng 1,75÷2,29 đảm bảo yêu cầu để thực hiện phản ứng PCR ở bước tiếp theo.

Những mẫu DNA có nồng độ cao được pha về nồng độ dao động trong khoảng 50 ng/μl để thực hiện phản ứng PCR. Nồng độ DNA khuôn trong phản ứng quá cao thì các khả năng xuất hiện các sản phẩm phụ trong sản phẩm PCR càng lớn vì vậy đối với những mẫu nồng độ DNA cao thì nên pha loãng để giảm sự khuếch đại các sản phẩm phụ.

#### ***4.2.2. Kết quả phản ứng PCR khuếch đại các exon***

Thiết kế môi và tối ưu cho phản ứng là bước vô cùng quan trọng trong quá trình tiến hành phản ứng PCR. Môi là điểm khởi đầu để các polymerase có thể thực hiện tổng hợp mạch bổ sung mới cũng như xác định đoạn DNA được khuếch đại. Do đó việc thiết kế môi sẽ quyết định mức độ đặc hiệu và năng suất của phản ứng. Bằng phương pháp thủ công khó có thể thực hiện thiết kế môi do nhiều thông số cần tính toán tương đối phức tạp. Primer-BLAST là một công cụ được phát triển bởi NCBI (The National Center for Biotechnology Information) giúp người dùng thiết kế môi đặc hiệu cho một phản ứng PCR cụ thể. Primer-BLAST sử dụng mã nguồn mở Primer3 để thiết kế môi, sau đó dùng công cụ BLAST và thuật toán định tuyến tổng quát (global alignenzymet) để kiểm tra trong cơ sở dữ liệu của NCBI nhằm tránh các sai sót kết cặp, tương đồng chéo là nguyên nhân dẫn đến phản ứng PCR không hiệu quả. Ưu điểm khi sử dụng Primer – BLAST là người dùng có thể tận dụng tối đa nguồn cơ sở dữ liệu từ NCBI. Phần mềm trực tuyến này đã hỗ trợ hiệu quả cho nhiều nghiên cứu trong các lĩnh vực Y học, Sinh học cho kết quả tốt thể hiện qua thành công của các nghiên cứu và

nhận được sự đánh giá cao và tin tưởng từ người dùng. Nghiên cứu của chúng tôi sử dụng Primer-BLAST để thiết kế mồi cho phản ứng PCR, với 3 mồi được thiết kế qua đánh giá ban đầu về chất lượng đạt các yêu cầu thiết kế mồi<sup>113</sup>. Độ dài của các mồi nằm trong khoảng từ 18-22 base, đủ dài để có thể đảm bảo gắn đặc hiệu và đủ ngắn để có thể gắn dễ dàng vào khuôn tại nhiệt độ gắn mồi. Nhiệt độ nóng chảy của các mồi (Tm) đều nằm trong khoảng 50-60°C. Nhiệt độ nóng chảy của mồi trên 65 độ dễ dẫn đến xu hướng mồi gắn không chính xác. Nhiệt độ Tm của hai mồi ngược và mồi xuôi không quá chênh lệch. Tỷ lệ G, C của cả 3 cặp mồi đều nằm trong khoảng 30% <math><G+C<70\%</math>. Kích thước sản phẩm khuếch đại không quá dài, dưới 1000bp. Đảm bảo có ít nhất một G hoặc C ở đầu 3' của mồi để giúp cho đầu 3' của mồi liên kết mạnh hơn. Kết quả thiết kế mồi thu được 8 cặp mồi có vị trí phù hợp đảm bảo khuếch đại 13 exon trên gen G6PD và đảm bảo các yêu cầu thiết kế mồi.

Sau khi đã tối ưu hóa quy trình, tiến hành phản ứng PCR khuếch đại các exon mục tiêu sử dụng các cặp mồi đã được thiết kế tương ứng. Chu trình nhiệt trên đã được chứng minh hiệu quả ở tất cả các mẫu DNA cần khuếch đại. Hình 3.3 là kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại exon 9, 10 sử dụng cặp mồi F6F-6R. Trên gel điện di các mẫu tạo thành một băng duy nhất, sáng, rõ nét, không có các băng phụ, kích thước phù hợp với kích thước của đoạn gen cần khuếch đại là 977 bp. Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy cặp mồi được sử dụng là đặc hiệu, chu trình nhiệt đã được chuẩn hóa tối ưu. Tương tự đối với cặp mồi F8F-8R và F9F-9R, khi tiến hành trong điều kiện đã tối ưu trên, cũng thu được kết quả cho thấy phản ứng PCR khuếch đại các exon đích đạt nồng độ và độ đặc hiệu cao. Điều này chứng tỏ cặp mồi được sử dụng bắt cặp đặc hiệu, chu trình nhiệt và các điều kiện khác là tối ưu, giúp phản ứng PCR được thực hiện thành công. Sản phẩm PCR có thể dùng để tiến hành kỹ thuật giải trình tự gen phục vụ cho mục tiêu xác định đột biến.

Sản phẩm điện di được nhuộm với chất nhuộm Ethidium bromide và chụp ảnh bằng máy chụp ảnh gel Bio-Rad. Các mẫu đều tạo băng duy nhất, sáng rõ nét, không có các băng phụ, kích thước phù hợp với kích thước của đoạn gen cần khuếch đại. (Hình 3.1, 3.2, 3.3)

### 4.2.3. Kết quả giải trình tự gen xác định đột biến

#### 4.2.3.1. Kết quả phát hiện tỷ lệ các dạng đột biến trên các exon

Cho đến nay, đã xác định được hơn 200 đột biến có liên quan đến sự thiếu hụt G6PD và hầu hết các đột biến (85%) là các biến thể sai lệch làm giảm hoạt động và ổn định của enzyme G6PD<sup>65</sup>.

Phân bố và các dạng đột biến và biến thể G6PD chủ yếu được phát hiện có liên quan đến các vị trí địa lý cụ thể và liên quan đến các nhóm dân tộc khác nhau. Trong vài thập kỷ qua, khoảng hơn 200 dạng đột biến gây bệnh gây ra thiếu enzyme G6PD trên lâm sàng đã được xác định (dữ liệu từ Cơ sở dữ liệu đột biến gen người (*Human Gene Mutation database: HGMD*)). Phân tích phân tử cũng đã chứng minh rằng mặc dù có sự không đồng nhất của các đột biến gen G6PD trên toàn thế giới nhưng một số lượng giới hạn các alen cụ thể chiếm ưu thế ở mỗi khu vực địa lý, mỗi dân tộc có một cấu hình đặc trưng của các biến thể thiếu hụt<sup>9</sup>. Sự phân bố tần số của các alen bị thiếu hụt này tương quan chặt chẽ với các quần thể đã từng tiếp xúc với bệnh SR lưu hành trong lịch sử. Bởi vì họ cho rằng, sự thiếu hụt G6PD mang lại lợi thế chọn lọc chống lại nhiễm trùng bởi SR và sự phân bố của sự thiếu hụt G6PD có liên quan chặt chẽ với tỷ lệ phổ biến của bệnh SR. Điều này có thể giải thích cho tần suất của sự thiếu hụt G6PD ở các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới cao hơn những nơi khác<sup>114</sup>. Ở Đông Nam Á, do bệnh SR được coi là bệnh điển hình ở khu vực này, là nguyên nhân gây tỷ lệ thiếu enzyme G6PD cao, đặc biệt được chứng minh ở các nhóm dân cư sống dọc theo Tiểu vùng sông Mê Kông mở rộng (GMS), bao gồm tỉnh Vân Nam của Trung Quốc, các khu vực ở Campuchia, Việt Nam, Lào, Myanmar và Thái Lan<sup>5,6,10,12,53,78,106,108</sup>. Sự khác biệt về tính đặc hiệu của các dạng đột biến G6PD đối với một số nhóm dân tộc khác nhau ở các nước khác nhau do đặc điểm mắc các loài ký sinh trùng SR khác nhau và sự cách biệt về địa lý đã gây ra<sup>115</sup>. Hiện tại, hơn 36 loại đột biến do thiếu G6PD đã được tìm thấy ở các nhóm dân tộc khác nhau ở Đông Á và Đông Nam Á<sup>10,116</sup>. G6PD Mahidol (487G> A) được coi là biến thể chủ yếu của các nhóm dân tộc Miến Điện<sup>52</sup> và Kachin<sup>117</sup>, trong khi G6PD Viangchan (871G> A) phổ biến nhất ở các nhóm dân tộc Thái, Lào và Campuchia và Việt Nam<sup>10,115,118</sup>. Hoặc theo thống kê gần đây

nhất tại các nước tiểu vùng sông Mê Kông mở rộng (GMS), các biến thể G6PD Viangchan và G6PD Mahidol được quan sát thấy ở mức độ phổ biến cao nhất khu vực. Đặc biệt, đột biến G6PD Viangchan được tìm thấy phân bố rộng rãi ở tất cả các điểm nóng khu vực Đông Nam Á và giới hạn rõ ràng về phía Tây ở biên giới Thái Lan - Myanmar. Đối với đột biến G6PD Union, mặc dù xuất hiện với 1 tần xuất ít hơn nhưng cũng có sự phân bố tương tự. Đột biến Mahidol cho thấy sự phân bố rộng rãi hơn, nhưng cũng cho thấy tần suất gặp nhiều ở Myanmar và giảm mạnh từ Myanmar, Thái Lan đến các địa điểm khác <sup>10</sup>.

Theo các nghiên cứu gần đây, có 10/15 biến thể chủ yếu hay gặp ở các nước khu vực Đông Á và Đông Nam Á bao gồm G6PD Gaohe, Chinesse 4, Mahidol, Coimbra, Viangchan, Chinesse 5, Union, Canton, Kaiping và đột biến im lặng Silent T1311C. Tại Trung Quốc với thống kê nghiên cứu ở 16 dân tộc khác nhau nhưng cũng đều thấy gặp 10 loại đột biến mà hay gặp ở Châu Á. Đối với các nước khu vực Đông Nam Á cũng thấy các đột biến xuất hiện thường xuyên như khu vực Châu Á nhưng bên cạnh đó mỗi quốc gia cũng có tỷ lệ từng đột biến theo đặc thù riêng. Ví dụ Thái Lan, Myanmar chủ yếu G6PD Mahidol và G6PD Viangchan, còn Lào, Việt Nam, Campuchia hầu hết là dạng G6PD Viangchan, Malaysia và Indonesia thì lại là G6PD Kaiping, Canton và các đột biến khác (Bảng 4.1).

*Bảng 4.1. So sánh sự phân bố các dạng đột biến G6PD phổ biến ở các các Đông Á và Đông Nam Á theo khu vực sinh sống trong những nghiên cứu gần đây<sup>53</sup>*

Dân tộc/ Quốc Gia	Khu vực	n	Phân bố tần suất của các biến thể G6PD										
			Gaohe	Chinesse- 4	Mahidol	Coimbra	Viangchan	Chinesse- 5	T1311C	Union	Canton	Kaiping	Khác
<b>Việt Nam</b>													
Stieng	Bình Phước,	123					119			4			
Kinh	Lâm Đồng	19	1	1			6			2	5	3	
K'Ho	Lâm Đồng	5					5						
<b>CHDCND Lào</b>	Sekong, Salavan	148		6	4		124			9	1	4	
<b>Campuchia</b>	64 tỉnh	406			4	3	383	2			4		
<b>Thái Lan</b>	Tak, Chantaburi	62			31		31						
<b>Myanmar</b>													
Không rõ	Bang Karen	559		5	533		5				14	2	
	Miến Điện	16			14					1	1		
<b>Indonesia</b>	Nusa Tenggara	99			2	12	16	2				28	39
<b>Malaysia</b>													
Mã Lai	Kuala Lumpur	86			13	3	32			2	4	2	30
Trung Quốc	Kuala Lumpur	128	9	1	2		1	2		1	54	50	8

<b>Trung Quốc</b>													
Zhuang	Quảng Tây	154	27				7	9	19		40	51	1
Dai	Vân Nam	76	6	9	1	2	4	2	13	6	19	14	
Yi	Vân Nam	34	4		1		1	6	8		2	7	5
Miao	Vân Nam	8	2	2				1	2			2	
Bai	Vân Nam	7	1					1			2	3	
Jingpo	Vân Nam	31	3	2				2	2		9	9	4
Hani	Vân Nam	36	3	3				3	3		10	11	3
Jino	Vân Nam	46	5	2	2				2		12	18	31
Buyi	Quý Châu	15	3				1	1	1		4	5	
She	Phúc kiến	108	8								52	28	20
Li	Hải nam	346	15	3			15	4		2	221	84	2
Hui	Ninh Hạ	11	1	1				2	4		2	1	
Tây Tạng	Tây Tạng	1						1					
<b>Mông Cổ</b>	Nội Mông	0											
Yao	Quảng Đông	54	6	1				2	3		15	20	7
Han	Quảng Đông	61	5				2		5	1	26	22	1
Han	Quảng Đông	48	8	1				3	5		17	14	
Han	Giang Tây	82	6					4	9	2	34	30	

*Ghi chú: Các số liệu của Việt Nam được báo cáo từ <sup>12,18,90</sup>số liệu về Lào được báo cáo từ và Campuchia được báo cáo từ <sup>12,18</sup>. Số liệu của Thái Lan được báo cáo từ <sup>12,119</sup> số liệu của Myanmar được báo cáo từ <sup>12,109,119</sup> Dữ liệu của Malaysia và Indonesia được báo cáo từ <sup>12,119</sup> số liệu của Trung Quốc và Mông Cổ được báo cáo từ <sup>53,116,117,120-125</sup>*

Bên cạnh đó, tại Việt Nam các nghiên cứu từ trước đến nay cũng cho thấy đã tìm thấy sự xuất hiện của 20 loại đột biến khác nhau, trong đó 5 loại đột biến chưa từng thấy xuất hiện ở Việt Nam đã được phát hiện tại nghiên cứu này<sup>10,15-18,88,89,112</sup> (Bảng 4.2)

Qua nghiên cứu này của chúng tôi, với các kết quả giải trình tự của các mẫu bệnh nhân thu được hình ảnh có tín hiệu rõ ràng, không bị nhiễu, tín hiệu nền thấp, trình tự đoạn gen được khuếch đại trùng khớp với trình tự đoạn gen G6PD trên Gene Bank, đủ độ tin cậy để nhận định kết quả. Với 8 môi được thiết kế đặc hiệu cho các exon trên gen G6PD (từ exon 1 đến exon 13), bằng phản ứng PCR và giải trình tự Sanger nghiên cứu đã xác định được đột biến của 339/350 trường hợp tương đương với 96,9% đối tượng tham gia đã phát hiện 14 đột biến, đều là các đột biến điểm do thay đổi 1 nucleotid sai lệch ảnh hưởng đến vùng mã hóa của gen G6PD, không có trường hợp nào mất một hoặc vài nucleotide hoặc loại khác.

Chia các loại đột biến theo các exon qua biểu đồ 3.2 cho thấy, hầu hết các đột biến đều tập trung tại exon 12, 2, 9, 11, 5 và tỷ lệ nhiều nhất là trên exon 9, 11,12. Không có đột biến nào được tìm thấy trên exon 4, 6, 10, 13. Kết quả này tương đồng với các nghiên cứu trước đây, cho thấy exon 9, 11, 12 là những exon trọng điểm chứa nhiều dạng đột biến G6PD hay gặp ở khu vực Đông Nam Á cũng như ở Việt Nam<sup>16,89,91,126</sup>.

#### 4.2.3.2. Kết quả phát hiện tỷ lệ các dạng đột biến

Chia 14 dạng đột biến phát hiện trong nghiên cứu này theo tỷ lệ từng loại đột biến tại bảng 3.4 thành các nhóm: Nhóm bốn đột biến phổ biến và chiếm tỷ lệ cao nhất là: G6PD Viangchan chiếm tỷ lệ cao nhất (24,86%), G6PD Kaipping (20,86%), G6PD Canton (18%) và G6PD Union (14,86%). Tiếp tục đến nhóm 4 đột biến tiếp theo G6PD Gaohe (7,43%), G6PD Chinese-5 (4,29%), G6PD Quing Yan (3,71%) và G6PD Orissa (1,14%). Cuối cùng nhóm bốn loại đột biến chỉ có 1-2 trường hợp là G6PD Valladolid (0,57%), G6PD NanKang, G6PD Địa Trung Hải, G6PD Comibra Shunde và G6PD Taiwan2 đều chiếm 0,29%. Ngoài ra còn 1 dạng đột biến được coi là đột biến câm (Silent), không làm ảnh hưởng đến nồng độ của enzyme. Trong các dạng đột biến trên, có 5 dạng đột biến lần đầu tiên xuất hiện tại Việt Nam là G6PD Orissa, G6PD Valladolid, G6PD NanKang, G6PD Comibra Shunde và G6PD Taiwan2. Theo phân loại của WHO có 8 loại đột biến được xếp vào lớp II (chiếm 82,6% tổng các loại) và 5 loại được xếp vào lớp III (chiếm 17,4% tổng các loại) trong đó dạng G6PD Taiwan2 mới được phát hiện lần đầu tiên năm 2019 được dự đoán thuộc lớp này.



**Bảng 4.2. So sánh các loại đột biến ở nghiên cứu của chúng tôi với các nghiên cứu trước đây**

TT	Tên đột biến	Exon	Năm phát hiện tại Việt Nam	Nghiên cứu này
1	Gaohe (c.95A>G)	2	Nguyễn Thị Huệ, (2013) TP HCM	Có
2	Việt Nam 1 (c.7G>A)	2		Không
3	Việt Nam 2 (c.197T>G)	2		Không
4	Bảo Lộc (c.352Y>H)	2	Hiroyuki Matsuoka (2007), Lâm Đồng	Không
<b>5</b>	<b>Orissa (c.131C&gt;G)</b>	<b>3</b>	<b>Chưa từng thấy ở Việt Nam</b>	<b>Có</b>
6	Việt Nam 3 (219 C>T)	3	Nguyễn Thị Huệ, (2013) TP HCM	Không
7	Quing Yan (c. 392G>T)	5	Hiroyuki Matsuoka, (2007), Lâm Đồng	Có
<b>8</b>	<b>Valladolid (c. 406 C&gt;T)</b>	<b>5</b>	<b>Chưa từng thấy ở Việt Nam</b>	<b>Có</b>
9	G6PD Mahidol (c. 487 G>A)	5	Nguyễn Minh Hùng (2015), TP HCM	Không
<b>10</b>	<b>NanKang (c.517 T&gt;G)</b>	<b>6</b>	<b>Chưa từng thấy ở Việt Nam</b>	<b>Có</b>
<b>11</b>	<b>Địa Trung Hải (c. 563 C&gt;T)</b>	<b>6</b>		<b>Có</b>
12	Comibra Shunde (592 C>T)	6	Nguyễn Thị Huệ, (2013) TP HCM	Có
13	Viangchan (c.871G>A)	9	Hiroyuki Matsuoka, (2007), Lâm Đồng	Có
14	Chatham (c.1003G>A)	9	Trần Thị Chính (2003), miền Bắc Việt Nam	Không
15	Chinese-5 (c.1024C>T)	11		Có
<b>16</b>	<b>Taiwan2 (c.1330G&gt;A)</b>	<b>11</b>	<b>Chưa từng thấy ở Việt nam</b>	<b>Có</b>
17	Union (c.1360C>T)	11	Trần Thị Chính (2003), miền Bắc Việt Nam	Có
18	Canton (c.1376G>T)	12		Có
19	Kaipping (c.1388G>A)	12		Có
20	Silent1 (c.1311C>T)	T437T		Có
21	Ho Chi Minh (173 A>G)		Hiroyuki Matsuoko (2017), TPHCM	Không

Trong nghiên cứu này, nhóm thứ nhất với bốn biến dạng gặp nhiều nhất là G6PD Viangchan (24,86%), G6PD Kaiping (20,86%), G6PD Canton (18%) và G6PD Union (14,86%). Kết quả này rất phù hợp với các nghiên cứu đã công bố

trước đây vì trong hầu hết các nghiên cứu cho thấy đây đều là các dạng đột biến G6PD đã được công bố và gặp nhiều ở các nước châu Á và Đông Nam Á như Trung Quốc, Lào, Thái Lan, Campuchia, Malaysia, Philipin, Papua New Guinea<sup>12,52</sup>. Cụ thể, ở Đông Nam Á: G6PD Viangchan là đột biến phổ biến nhất được xác định ở quần thể người Campuchia (97,9%), người Lào (100%) và người Malaysia (37,2%)<sup>10,99,127</sup>, còn G6PD Canton và G6PD Kaiping là hai đột biến phổ biến nhất ở người Trung Quốc<sup>10,66,98,116</sup> nhưng cũng chiếm tỷ lệ lớn ở các nước Đông Nam Á<sup>10</sup>. Kết quả này cũng phù hợp đối với các nhóm nghiên cứu tại Việt Nam. Ở khu vực miền Bắc nhóm tác giả Trần Thị Chính và cộng sự<sup>15</sup> hay của tác giả Quách Xuân Hinh<sup>112</sup>, Mai Hương Trang<sup>103</sup> đều cho thấy các đột biến trên phổ biến ở khu vực này. Tại khu vực miền Nam Việt Nam, nhóm nghiên cứu Đặng Thị Lan Anh và cộng sự<sup>16,89,91,126</sup>, Nguyễn Thị Huệ và cộng sự<sup>16,89,91,126</sup>, Kawamoto và cộng sự<sup>91</sup> đều tiến hành ở dân tộc Kinh tại thành phố Hồ Chí Minh hay nghiên cứu của Matsuoka và cộng sự tại Lâm Đồng<sup>16,89,91,126</sup> cũng cho thấy G6PD Viangchan và G6PD Canton, G6PD Kaiping và G6PD Union là các đột biến phổ biến nhất trong nhóm dân tộc Kinh tại Việt Nam. Gần đây nhất **tại các tỉnh Tây Nam Bộ: có hai nhóm tác giả cũng phát hiện một số dạng đột biến điển hình ở Việt Nam: Nghiên cứu của Đặng Thị Hồng Xuân Thủy năm 2021 trên 120 mẫu tại huyện Krông Năng - Đắk Lắk<sup>128</sup> cho thấy đây là hai biến thể chiếm ưu thế và cao nhất trong danh sách các biến thể đã được ghi nhận tại vùng Đông Nam Á là Mahidol và Vianchang có mặt ở dân tộc các dân tộc khác nhau. Sau đó, biến thể Canton với tỷ lệ 9,2% và có 1 ca có biến thể Kaiping (0,8%). Năm 2022, nhóm tác giả khác nghiên cứu tại ba xã có SRLH gồm Quảng Trục, Đắk Ngo và Đắk Buk So, huyện Tuy Đức, tỉnh Đắk Nông từ năm 2018-2020<sup>105</sup> cho kết quả loại biến thể thiếu G6PD chiếm cao nhất cũng là biến thể Viangchan với 89,23% (58/65), kể đến biến thể Mahidol với 6,15% (4/65) và biến thể G6PD mới Canton với 4,62% (3/65).**

Dạng đột biến chiếm cao nhất đầu tiên là G6PD Viangchan, được mô tả lần đầu tiên vào năm 1988 trên một bệnh nhân người Lào thiếu G6PD định cư tại Canada. Ở bệnh nhân này nhận thấy có sự thay thế nucleotid số 871 trên gen G6PD

từ G thành A<sup>129</sup>. Sự thay đổi trên làm thay đổi bộ ba mã hóa acid amin tại codon 291 từ Valin thành Methionin dẫn đến kiểu hình thiếu hụt G6PD nghiêm trọng và được xếp vào phân lớp II theo phân loại của WHO. Đây cũng là đột biến gặp với tỷ lệ cao nhất ở một số nước khu vực Đông Nam Á như Lào, Thái Lan, Campuchia<sup>6,106,130,131</sup>. Tại Việt Nam, G6PD Viangchan chiếm đa số trong các biến thể, nghiên cứu của Matsuoka triển khai tại Lâm Đồng năm 2007 cũng gặp 6/19 trường hợp có đột biến Viangchan<sup>90</sup>, trong nghiên cứu của Nguyễn Minh Hùng và cộng sự năm 2009 tại miền Trung và Bắc Việt Nam gặp ở 11/25 trường hợp người Kinh (44%), 8/9 trường hợp người Raglai và 16/16 trường hợp người Pako<sup>18</sup>, cũng năm này tác giả Quách Xuân Hinh cũng cho kết quả tương tự ở nhóm các dân tộc Kinh, Thái và Raglai<sup>112</sup>. Và trong nghiên cứu của Nguyễn Thị Huế và cộng sự năm 2013 đột biến này cũng được xác định chiếm 44,3%<sup>16</sup>. Cũng tác giả Nguyễn Minh Hùng và cộng sự, hai nghiên cứu: năm 2015<sup>126</sup> lại khẳng định G6PD Viangchan là đột biến gặp tỷ lệ cao nhất với tỷ lệ 12/40 của nhóm trẻ thiếu G6PD tại bệnh viện Phụ sản Quốc tế Sài Gòn. Năm 2017 cũng cho kết quả đột biến loại này là 32% ở 90 trẻ sơ sinh tại bệnh viện Từ Dũ<sup>91</sup>. Gần đây nhất năm 2021, 2022, với nghiên cứu của nhóm tác giả tại tỉnh Đắk Lắk và Đắk Nông đều cho kết quả sự phân bố các biến thể G6PD Viangchan, là nhiều nhất<sup>105,128</sup>. Tỷ lệ lưu hành cao của G6PD Viangchan ở người Việt Nam có lẽ cho thấy nguồn gốc tổ tiên chung của người Việt Nam và các nhóm dân cư Đông Nam Á khác (Lào, Thái Lan, Campuchia).

Đột biến đứng thứ 2 và 3 trong nghiên cứu này là G6PD Kaiping (c.1388G>A) với và G6PD Canton (c.1376 G>T) đều nằm trên exon 12 với tỷ lệ lần lượt là 20,86% và 18%. Với đột biến Kaiping do vị trí nucleotid 1388 G thay A làm acid amin 463 Arg thành His. Với G6PD Canton do vị trí nucleotide c.1376 ở người bình thường trên gen G6PD là G, ở bệnh nhân có đột biến G6PD Canton vị trí này có trình tự là T, làm thay đổi bộ ba mã hóa acid amin Arginin tại codon 459 thành Leucin. Đây là 2 đột biến được phát hiện lần đầu tiên tại Trung Quốc vào năm 1991<sup>132</sup> và cũng được thấy rất phổ biến ở Trung Quốc với tỷ lệ trên 70%<sup>53</sup>. Đồng thời các biến thể này cũng được ghi nhận ở các nước Đông Nam Á như Thái Lan,

Indonesia, Malaysia, Lào, Campuchia, Myanmar với tần suất cao 10,70,78,99,101,115,119,133. Trước đây, các đột biến này được coi chưa từng xuất hiện tại Ấn Độ và các nước Châu Á khác<sup>9</sup> nhưng trong 1 nghiên cứu gần đây tác giả tìm thấy biến thể Kaiping xuất hiện ngay tại Ấn Độ<sup>134</sup>. Tại Việt Nam, các nghiên cứu cũng cho thấy 2 dạng đột biến này cũng đã được ghi nhận trong nhóm người Kinh vào năm 2013, năm 2015, 2017, 2021, 2022 đều thuộc các tỉnh khu vực miền Nam Việt Nam<sup>16,91,105,126,128</sup> và ở miền Bắc Việt Nam, tác giả Nguyễn Thị Ngọc Giao, Phạm Mai Hương Trang<sup>15,103</sup> cũng cho kết quả tương tự.

G6PD Union (c.1360C>T) hay còn được gọi là G6PD Chinese 2, nằm trong 4 đột biến gặp tỷ lệ cao trong nghiên cứu này với tỷ lệ là 14,86%. G6PD Union được báo cáo đầu tiên bởi Yoshida năm 1970 trên một bệnh nhân nam người Philipin, bệnh nhân mang đột biến này có sự thay thế một nucleotide C ở vị trí 1360 thành T, dẫn đến thay đổi bộ ba mã hóa acid amin tại codon 454 Arginin thành Cystein và được đặt tên theo tên địa danh tìm ra đột biến là Union<sup>85,135,136</sup>. Sự thay đổi trên gen G6PD này tiếp tục được báo cáo sau đó tại Nhật Bản, các nước Hy Lạp, Tây Ban Nha, Ý và còn được gọi với một số tên khác là G6PD Maewo hay G6PD Chinese-2. Tuy nhiên qua nghiên cứu hoạt độ enzyme, tính chất điện di và các đặc tính sinh hóa như hằng số Km cho G6P, tính ổn định với nhiệt, pH tối ưu của những đột biến này các nhà nghiên cứu đã nhận thấy có sự tương đồng hoàn toàn với G6PD Union<sup>137</sup>. Điều này cho thấy sự phân bố đa dạng về địa lý của kiểu đột biến thuộc phân lớp II này. Biến thể c.1360 C>T này cũng đã thấy xuất hiện ở Đông Á, trong đó có Trung Quốc, các nước khu vực tiểu Sông Mê Kông nhưng tỷ lệ ít hơn so với các biến thể trên, dưới 1% (Lào, Việt Nam, Campuchia, Malaysia)<sup>10,53,138,139</sup>. Tại Việt Nam, biến thể này cũng xuất hiện với tần suất thấp hơn như 2/25 năm 2007, 1/50 năm 2015, 5/90 năm 2017 ở dân tộc Kinh<sup>16,90,91</sup> 2/30 ở dân tộc Thái<sup>112</sup> và 7/7 ở dân tộc Khơmu<sup>126</sup> và tác giả này còn đưa ra giả thuyết dân tộc này có tổ tiên khác với dân tộc Kinh. Trong nghiên cứu này, ghi nhận bệnh nhân có hoạt độ enzyme thấp nhất thuộc dạng đột biến G6PD Union. Với G6PD Union, đột biến về cấu trúc gây ra sự thay đổi tính đặc hiệu của cơ chất của enzyme, hoạt độ enzyme chỉ khoảng 10% so với người bình thường<sup>85</sup>.

Nhóm có tỷ lệ nhiều thứ 2 của nghiên cứu là đột biến G6PD Gaohe (c.95A>G), G6PD Chinese-5 (c.1024C>T) và G6PD Qing Yan (c. 392G>T) (Chinese 4) và G6PD Orissa (c.131C>G) với tỷ lệ lần lượt là 7,43%, 4,29%, 3,71% và 1,14%. Theo phân loại của WHO Cả 3 G6PD Gaohe, G6PD Chinese-5 và G6PD Qing Yan đều thuộc lớp III. Với G6PD Gaohe xảy ra ở exon 2, do nucleotid 95 A được thay bằng G làm acid amin 32 His thành Arg; G6PD Chinese-5, xảy ra ở exon 9 do nucleotide ở vị trí 1024 thuộc exon 9 thay đổi từ C thành T, điều này làm acid amin số 342 Leucin trở thành Phenylalanin và G6PD Qing Yan xảy ra ở exon 5 do nucleotid 392 G được thay bằng T làm acid amin 131 Gly thành Arg. Cả 3 loại này đều được ghi nhận lần đầu tiên ở quần thể người Trung Quốc<sup>47,140</sup> và cho đến nay các đột biến này vẫn gặp tỷ lệ lớn ở người Trung Quốc<sup>66</sup> thay vì hầu như không tìm thấy ở quần thể người Đông Nam Á (Lào, Campuchia, Myanmar, Indonesia)<sup>10,131,138,139,141,142</sup> ngoại trừ ở một nghiên cứu được công bố vào đầu năm 2021 ở miền Trung Thái Lan với tỷ lệ rất thấp<sup>99</sup>. So sánh với các nghiên cứu trước đây của Việt Nam cho thấy rất phù hợp, các đột biến này cũng đã xuất hiện nhưng với một tỷ lệ thấp hơn. Matsuoka năm 2007 có 1 trường hợp Gaohe, 1 trường hợp Qing Yan, không có trường hợp nào Chinese 5 và năm 2009, 2013, 2017 các tác giả khác cũng gặp các dạng đột biến này xuất hiện trong quần thể người Việt Nam với tần suất thấp<sup>16,91,112</sup>. **Nguyễn Thị Huệ và CS (2013) nghiên cứu một số nước GMS tìm thấy 7 biến thể là Gaohe Ghaozou, Chinese-4 Qing Yuan, Viangchan, Union Chinese- 2, Canton, Kaipping và đột biến thầm lặng chưa thể hiện kiểu hình rõ ràng<sup>16</sup>.** Sự xuất hiện phổ biến của các đột biến có nguồn gốc từ Trung Quốc như Kaiping, Canton, Chinese-5, Gaohe, Qing Yan, Chinese 4 tại Việt Nam được cho là do Việt Nam là thuộc địa của Trung Quốc trong hàng nghìn năm trước đây và sự tiếp giáp về ranh giới địa lý, mối quan hệ giao lưu lâu dài giữa dân cư hai nước khiến sự giao thoa về các gen bệnh này.. Còn với G6PD Orissa (c.131C>G) là biến thể lần đầu được tìm thấy lần đầu ở Việt Nam, chúng tôi sẽ phân tích về biến thể này cùng với các dạng biến thể khác lần đầu xuất hiện tại Việt Nam ở dưới đây.

Còn lại 5 loại đột biến chiếm tỷ lệ thấp mỗi dạng chỉ chiếm 1- 2 trường hợp, cụ thể: G6PD Valladolid (c. 406 C>T) 2 trường hợp (0,57%) và G6PD NanKang (c.517 T>G), G6PD Địa Trung Hải (c. 563 C>T), G6PD Coimbra Shunde (592

C>T), G6PD Taiwan2 (c.1330G>A) mỗi biến thể đều chỉ có 1 trường hợp (0,29%). Trong các dạng đột biến trên, G6PD Comibra Shunde (592 C>T) đã được tìm thấy ở người Việt Nam duy nhất 1 lần qua nghiên cứu của Nguyễn Thị Huệ năm 2009 ở 2 người đàn ông dân tộc Kinh<sup>17</sup>. Còn ở nghiên cứu này G6PD Comibra Shunde (592 C>T) xuất hiện ở 1 trẻ em dân tộc Mường thuộc tỉnh Hà Tây cũ, thành phố Hà Nội ngày nay. Theo phân loại của WHO, biến thể này thuộc lớp II và là đột biến duy nhất trên exon 6 được phát hiện ở người Việt Nam cho đến nay. G6PD Comibra Shunde được tìm thấy lần đầu<sup>47,143</sup> từ một cậu bé người Bò Đào Nha có tiền sử gia đình có hội chứng Favism, do sự chuyển đổi C thành T ở nucleotide 592 làm thay đổi vị trí 198 Arginine thành Cysteine. Tương tự G6PD Địa Trung Hải, G6PD Comibra Shunde cũng đã thấy xuất hiện từ sớm ở các nước Trung Quốc sau đó được cho là di chuyển sang Tây Indonesia<sup>124,142,144</sup> Malaysia, Myanmar, Thái Lan, Campuchia nhưng với một tỷ lệ rất thấp: 1-2 trường hợp<sup>10,52,99,101</sup>. G6PD Coimbra, một trong những biến thể lâu đời nhất được phát hiện với tần suất cao trong Orang Asli, hiện sinh sống ở bán đảo Malaysia và một nghiên cứu gần đây đã tiết lộ bằng chứng về dòng gen giữa Orang Asli nói tiếng Austroasiatic và các quần thể từ Đông Nam Á và Nam Trung Quốc cho thấy sự hiện diện rộng rãi của những người này ở Đông Nam Á và Nam Trung Quốc<sup>145</sup>. Chúng ta cũng biết rằng Nam Trung Quốc, giáp với các phần phía bắc của Việt Nam, Myanmar, Lào và Thái Lan, là “đất mẹ” của tất cả các nhóm dân tộc ở Đông Nam Á, từ đó, tất cả các bộ lạc này được cho là cùng nhau di cư xuống phía nam để giải thích cho sự xuất hiện dạng đột biến này tại đây Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, như trong bảng 3.7, dạng đột biến này không được phát hiện ở tất cả các nhóm dân tộc, chỉ thấy ở dân tộc Mường thuộc các tỉnh miền núi phía Bắc, nơi giáp với các tỉnh phía Nam Trung Quốc, điều đó được giải thích do vấn đề mối quan hệ văn hoá lâu đời của 2 nước láng giềng gây nên. Và ở nghiên cứu này với 1 trường hợp xuất hiện dạng đột biến này nên cần cũng là hạn chế để khẳng định điều này, cần có một nghiên cứu sâu về riêng dạng đột biến này cũng như sự xuất hiện ở các dân tộc khác nhau.

Sau đây xin được bàn luận về các dạng đột biến mà lần đầu tiên được phát hiện ở Việt Nam qua nghiên cứu này. Mặc dù trong nghiên cứu của chúng tôi không thấy xuất hiện đột biến mới nào lần đầu phát hiện trên thế giới như một số các

nghiên cứu, nhưng chúng tôi đã phát hiện được 5 dạng đột biến chưa từng xuất hiện trong dân số người Việt Nam từ trước đến nay bao gồm: ***G6PD Orissa (c.131C>G)***, ***G6PD Valladolid (c. 406 C>T)***, ***G6PD NanKang (c.517 T>G)***, ***G6PD Địa Trung Hải (c. 563 C>T)***, ***G6PD Taiwan2 (c.1330G>A)***.

Đầu tiên là dạng G6PD Orissa (c.131C>G) ở exon 3 do vị trí c.131 C>G làm thay đổi bộ ba mã hóa acid amin tại codon 44 từ Alanine thành Glycine, được tìm thấy ở 4 trẻ em (3 Kinh, 1 Nùng). Đột biến này lần đầu tiên được tìm thấy ở các bộ tộc da đỏ tại Ấn Độ năm 1995<sup>146</sup>, cũng là đột biến điển hình của các dân tộc ở quốc gia này và rất hiếm khi thấy xuất hiện ở khu vực Đông Nam Á<sup>134,141,147</sup>. Việc phát hiện ra biến thể Ấn Độ này ở Việt Nam có thể cho thấy có hậu duệ của những người nhập cư Ấn Độ trong dân số Việt Nam hiện nay.

Tiếp theo là đột biến G6PD Valladolid (c. 406 C>T) liên quan đến thay đổi C → T ở nucleotide 406 ở exon 5, dẫn đến sự thay thế Arginine (Arg) sang Cysteine (Cys) ở acidamin 136 trong protein. Đột biến này lần đầu tiên được xác định ở hai nam giới Tây Ban Nha vào năm 1997<sup>148</sup> và gây ra bệnh thiếu máu huyết tán nhẹ. Ở nghiên cứu này đột biến G6PD Valladolid được phát hiện trên 2 trẻ nam đều thuộc dân tộc Tày. Trong các nghiên cứu ở các nước Đông Á, đột biến này cũng được tìm thấy lần đầu tiên ở Myanmar năm 2008<sup>109</sup>, Trung Quốc vào năm 2010<sup>149</sup> trong ba gia đình người Hoa, năm 2011 ở 1 trẻ em người Campuchia<sup>4</sup> và gần đây nó cũng được xác định lần đầu trong dân số miền Trung Thái Lan được công bố vào tháng 4 năm 2021<sup>99</sup>. Đột biến này xuất hiện trong dân số ở Myanmar, Trung Quốc, Campuchia và Thái Lan cụ thể như thế nào các tác giả đều chưa chỉ ra được nhưng các tác giả đề xuất rằng đột biến G6PD Valladolid có thể đã tiến hóa, phát sinh một cách độc lập hơn là từ dòng gen bởi vì không có mối liên hệ lịch sử nào được tìm thấy giữa Tây Ban Nha và các nước này. Điều này chúng tôi cũng thấy phù hợp để nói về sự xuất hiện của đột biến G6PD Valladolid tại Việt Nam. Một điều thú vị là cả hai bệnh nhân mang biến thể G6PD Valladolid đều thuộc dân tộc Tày, nên cần có nghiên cứu sâu hơn về biến thể G6PD Valladolid này ở các dân tộc để có thể có tỷ lệ nhiễm ở khu vực địa lý này.

Đột biến thứ 3 lần đầu xuất hiện tại Việt Nam là G6PD NanKang (c.517 T>G) cũng xảy ra trên exon 5, do sự thay đổi T thành C ở vị trí nucleotide 517, tạo

ra sự thay thế Phe 173 Leu trong protein G6PD của người. Đột biến này lần đầu được phát hiện và đặt tên ở một trẻ sơ sinh Trung Quốc bị vàng da sơ sinh vào năm 1996<sup>150</sup>. Tuy nhiên các nghiên cứu sau này cho thấy biến thể này xuất hiện với tần số thấp ở người dân Trung Quốc<sup>53,116,124</sup>. Tại các nước Đông Nam Á, chỉ duy nhất thấy sự xuất hiện G6PD NanKang ở trẻ sơ sinh Malaysia gốc Hoa vào năm 2004 mà chưa từng xảy ra ở các nước khác trong khu vực<sup>151</sup>. Sự xuất hiện G6PD NanKang có nguồn gốc Trung Quốc tại Việt Nam hoàn toàn phù hợp với mối quan hệ văn hoá lâu đời của 2 nước láng giềng. Một lần nữa khẳng định về sự xuất hiện các dạng đột biến và biến thể được phát hiện lần đầu và có lịch sử lâu đời ở Trung Quốc nay thấy sự xuất hiện của chúng tại Việt Nam.

Dạng đột biến thứ 4 lần đầu xuất hiện tại Việt Nam trong nghiên cứu này là G6PD Địa Trung Hải (c. 563 C>T), chúng cùng nằm trên exon 5. G6PD Địa Trung Hải là do đột biến điểm (C → T) ở nucleotide 563, dẫn đến sự thay thế Serine thành Phenylalanine ở axit amin 188 trong G6PD. Đột biến G6PD Địa Trung Hải 563 C → T lần đầu tiên được phát hiện ở một đối tượng đến từ miền Nam nước Ý<sup>152</sup> và đã được chứng minh là 1 biến thể phổ biến nhất đặc trưng bởi sự thiếu hụt enzyme nghiêm trọng và khả năng di chuyển điện di giống B. Nó được gọi là "G6PD-Địa Trung Hải" vì nó được phân bố rộng rãi trong các quần thể khác nhau xung quanh Biển Địa Trung Hải trong vòng 1.600 đến 6.640 năm qua. Sau đó, nó lan sang Trung Đông như Iran và Bắc Phi, phía đông như Ấn Độ bằng các con đường thương mại và thuộc địa của Hy Lạp và bởi đội quân của Alexander Đại đế, người đã chinh phục Trung Đông và Bắc Phi<sup>29,52,153</sup>. G6PD Địa Trung Hải 563 C> T đã được tìm thấy trong bối cảnh của hai dạng đơn bội, một dạng có đột biến Silent 1311T, phổ biến ở người châu Âu, Trung Đông và loại khác là 1311C phổ biến ở người dân Punjab ở Ấn Độ<sup>153,154</sup>. Hiện nay G6PD Địa Trung Hải phổ biến ở Ấn Độ, còn ở các nước khác thuộc khu vực Đông Á và Đông Nam Á, duy nhất một nghiên cứu tại Malaysia đã thấy sự hiện diện của biến thể Địa Trung Hải với tần suất cao ở người Mã Lai được coi là khá bất ngờ với 27% (23/85), cả hai loại haplotype đều tồn tại đơn bội 1311T và 1311C<sup>155</sup>. Sự hiện diện của đột biến này được giải thích có thể là do sự đồng hóa sắc tộc với những người Ả Rập đến quần đảo Mã Lai vào đầu thế kỷ thứ 9 với tư cách là thương nhân và đồng thời truyền bá đạo Hồi và tác động của sự



hòa nhập sắc tộc với những người da đỏ đến bán đảo Malaysia làm công nhân nhập cư trong các đồn điền cao su vào đầu thế kỷ 19. G6PD Địa Trung Hải (c. 563 C>T) cũng đã thấy xuất hiện từ sớm ở các nước Indonesia<sup>142,144</sup> Thái Lan, Myanmar, Campuchia nhưng với một tỷ lệ rất thấp chỉ 1-2 trường hợp<sup>10,52,99,101</sup>. Trong nghiên cứu này, G6PD Địa Trung Hải (c. 563 C>T) được tìm thấy ở 1 bệnh nhân nam người Mường dưới dạng kết hợp Silent 1311T, có thể được giải thích do sự hoà nhập sắc tộc của các nước trong khu vực và trên thế giới vào Việt Nam trong thế kỷ mới này.

Dạng đột biến cuối cùng lần đầu xuất hiện tại Việt Nam được nói đến trong nghiên cứu này là G6PD đột biến Taiwan2 (c.1330G>A) nằm trên exon 11. Nó được phát hiện ở 1 trẻ em dân tộc Kinh tỉnh Vĩnh Phúc có mẹ là người Việt nhưng đang lao động tại Đài Loan. Thật trùng hợp, dạng đột biến này được mô tả lần đầu tiên vào năm 2019 ở 1 bệnh nhân Đài Loan khiến thay đổi bộ ba mã hóa acid amin tại codon 444 từ Valin thành Isoleucin<sup>156</sup>. Tác giả này dựa trên nồng độ enzyme tại thời điểm phát hiện dự đoán biến thể này thuộc lớp III theo phân loại của WHO và cho đến hiện tại biến thể này cũng đang tạm được xếp vào lớp III. Sự xuất hiện của dạng đột biến này tại Việt Nam cho thấy sự đa dạng hoá về bệnh cảnh di truyền dưới ảnh hưởng của sự hội nhập nền kinh tế cũng như nền văn hoá. Chúng tôi hi vọng các nghiên cứu về sự xuất hiện các đột biến gen G6PD sẽ được tiếp tục thực hiện trong thời gian tới để một lần nữa khẳng định đang có sự đa dạng về bệnh cảnh di truyền với sự mở cửa nền kinh tế và văn hoá hội nhập của Việt Nam với các nước trên thế giới.

Ngoài ra, trong nghiên cứu này cần nói đến một đột biến được gọi là đa hình (SNP) do biến đổi nucleotide số c.1311C>T ở exon 11 tạo bộ ba TAC thay TAT, nhưng cả hai cùng mã hoá cho acid amin Tyrosine nên biến đổi này được coi là không ảnh hưởng đến sự mã hoá acid amin trong cấu trúc G6PD được gọi đột biến vô nghĩa (đột biến Silent - đột biến câm)<sup>157</sup> nhưng nó gây hoạt động G6PD thấp hơn bởi một cơ chế chưa rõ ràng. G6PD 1311C>T lần đầu tiên được nhận thấy khi mẫu DNA của các đối tượng có đột biến G6PD Địa Trung Hải (Gd-Med) được giải trình tự bởi De Vita *et al*<sup>158</sup>. Cho đến nay các nghiên cứu đều cho thấy sự tồn tại của c.1311C>T cùng hầu hết các đột biến khác đã được quan sát và xuất hiện trong

các quần thể trên toàn thế giới với tần số alen thay đổi từ 0 đến 0,45<sup>159</sup>. Ở Châu Á, nó được báo cáo lần đầu tiên ở Philippin và sau đó nó được phát hiện xuất hiện nhiều ở quần thể người Java<sup>144</sup> ở Indonesia, rồi đến Trung Quốc<sup>122</sup> miền Nam Thái Lan<sup>130</sup>, người Mã Lai, người Orang Asli – thổ dân Malaysia thuộc Malaysia<sup>160</sup> và dân tộc Kachin – một dân tộc thiểu số ở Myanmar. Người Mã Lai và Orang Asli – được biết đến như 1 dân tộc cổ thuộc Malaysia và khu vực Đông Nam Á, điều này cho thấy biến thể này đã tồn tại từ thời cổ đại cùng với G6PD Viangchan. Trong khi ở tiểu lục địa Ấn Độ G6PD Viangchan luôn đi kèm với các đột biến ở 1311C> T ở exon 11 và IVS 11 nt93T> C ở intron 11, trong khi G6PD Jammu (871G> A; thuộc lớp II theo phân loại của WHO), có trình tự kiểu hoang dã tại 1311C với IVS11 nt93T. Cần lưu ý rằng G6PD Địa Trung Hải (563C> T; thuộc lớp II theo phân loại của WHO) cũng có hai kiểu phụ ở đa hình 1311 và IVS 11 nt93: Kiểu phụ Địa Trung Hải đi kèm với “1311C> T với IVS11 nt93T> C” và kiểu phụ Ấn Độ-Pakistan với trình tự kiểu hoang dã “1311C với IVS11 nt93. Do đó, đột biến này thường được sử dụng như một dấu hiệu đa hình trong các nghiên cứu di truyền học dân số và nhân chủng học<sup>115,154</sup>. Ở Trung Quốc và các quần thể Đông Nam Á, đột biến 1311C> T kết hợp với IVS11 nt93T> C trong intron 11 đã được báo cáo và nó có liên quan đến các nhóm dân tộc khác nhau<sup>115,154</sup>.

Trong nghiên cứu của chúng tôi có 89 trường hợp có đột biến G6PD 1311C>T Silent chiếm 25,43%. Trong 13 đột biến được phát hiện ở nghiên cứu này theo bảng 3.5 thì G6PD 1311C>T Silent kết hợp 9 đột biến: nhiều nhất kết hợp G6PD Viangchan (c.871G>A): 70/86 trường hợp chiếm 78,7%, 5 trường hợp kết hợp G6PD Union (c.1360C>T), G6PD Kaiping (c.1388G>A) và G6PD Canton (c.1376 G>T) đều có 3 trường hợp kết hợp, 1 kết hợp G6PD Qing Yan. Đối với các trường hợp đột biến lần đầu xuất hiện tại Việt Nam thì cả 2 trường hợp đột biến G6PD Valladolid (c. 406 C>T), 1 trường hợp G6PD Orissa (c.131C>G), Địa Trung Hải (c. 563 C>T) là có kết hợp. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Hiyoruki Matsuoka và cộng sự đã chỉ ra rằng đột biến G6PD Viangchan là nguyên nhân gây ra 97,9% thiếu hụt enzyme G6PD trong quần thể dân cư Campuchia và tất cả alen này đều có liên kết với hai đột biến khác trên vùng intron của gen G6PD là c.1311C>T và c.93T>C đồng thời cũng ghi nhận 1 trường hợp kết hợp giữa đột biến

G6PD Union và c.1311C>T<sup>161</sup>. Mối liên kết giữa G6PD Viangchan và c.1311C>T cũng đã được ghi nhận trong nhiều nghiên cứu tại các quốc gia khác như khu vực Đông Nam Á Lào, Thái Lan, Malaysia<sup>12,99,106,138,157</sup>. Trong nghiên cứu tỷ lệ mắc bệnh thiếu enzyme G6PD ở khu vực Đông Quan Trung Quốc năm 2015 cho kết quả tỷ lệ đa hình C1311T/IVS ở 469 cá nhân bị thiếu enzyme G6PD là 13,9% và tất cả 22 bệnh nhân nam bị G6PD Viangchan đều có đa hình C1311T/IVS<sup>97</sup>. Trong khi đó, tại một số nước như Ấn Độ hay vùng tiếp giáp Trung Quốc – Myanmar, c.1311C>T thường liên kết với G6PD Med (c.563C>T) hay nói cách khác là G6PD Med xảy ra trên gen G6PD đã có tính đa hình 1311T (cytosine thay thế bởi thymine ở nucleotide 1311) vì vậy đột biến im lặng này thường được sử dụng như một dấu hiệu đa hình trong các nghiên cứu di truyền học quần thể và nhân chủng học. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả của sự kết hợp đột biến đa hình này trong các nghiên cứu trước đây ở Việt Nam. Trong nghiên cứu tác giả Nguyễn Thị Huệ<sup>16</sup> G6PD 1311C> T xuất hiện liên kết với các đột biến khác nhau như G6PD Viangchan, Canton, Kaiping, Union, Gaohe và QuingYuang đặc biệt với G6PD Viangchan và Canton khiến tác giả này cũng đưa giả thuyết có thể được sử dụng làm dấu hiệu chẩn đoán đối tượng dân tộc Kinh Việt Nam. Hoặc tác giả Matsuoko cho rằng: Kể từ khi đột biến im lặng của 1311 T / 93 C luôn luôn có sự kết hợp tạo hai biến thể hình thành nên các G6PD “mới” có thể tương tự G6PD Viangchan (871 G> A, 1311 C> T, nt 93T> C) hoặc G6PD Địa Trung Hải (kiểu phụ Mediter-ranean; 563 C> T, 1311 C> T, nt 93 T> C) với tỷ lệ lưu hành cao 1311 T / 93 C trong các dân tộc để đánh giá cổ đại xung quanh Nam Trung Quốc có thể liên quan chặt chẽ với sự xuất hiện và lây lan của G6PD Viangchan vào nhiều nhóm dân tộc ở Đông Nam Á, chẳng hạn như Orang Asli, Kinh, K’Ho, Stieng, Khmer, Lào, Thái và Mã Lai,..., ví dụ, trong nhiều nhóm dân tộc ở Myanmar, G6PD Mahidol là biến thể phổ biến nhất nhưng chỉ có nhóm Kachin sở hữu G6PD 1311T / 93C (95/198) tạo G6PD Mahidol “mới” (487 G> A, 1311 C> T, nt 93 T> C)<sup>145</sup>, một trường hợp của G6PD Mahidol /1311 T/93 C cũng được báo cáo tại một đối tượng người Trung Quốc ở tỉnh Vân Nam, Nam Trung Quốc về sự xuất hiện của những đột biến “mới” này. Tuy nhiên, chức năng và mối liên quan giữa các đột biến này với bệnh là chưa rõ ràng, cần phải được làm rõ ở các nghiên cứu sâu hơn nữa.

Nói đến sự kết hợp các đột biến trong nghiên cứu này còn có 1 trường hợp nữ có hai đột biến dị hợp tử Canton và Kaiping. Hai đột biến này có vị trí tương đối gần nhau trên exon 12. Đột biến Canton làm thay đổi bộ ba mã hóa cho acid amin Arginine ở vị trí 459 thành bộ ba mã hóa cho acid amin Leucine và đột biến Kaiping làm thay đổi acid amin mã hóa cho Arginine ở vị trí 463 thành bộ ba mã hóa cho Histidine. Hiệu quả của G6PD trên hoạt tính xúc tác của enzyme thay đổi theo khả năng tích điện, tính phân cực của protein này<sup>24,25</sup>. Arginine có một nhóm guanidinium ở vị trí delta và thuộc nhóm acid amin có gốc R tích điện dương. Leucine là một acid amin có gốc R không phân cực. Việc thay thế này có nghĩa là gốc R tích điện dương và phân cực không còn nữa. Điều đó đã làm giảm hơn 95% hoạt tính của enzyme. Histidine là một acid amin được xếp cùng nhóm với Arginine nhưng công thức cấu tạo có dị vòng imidazol ở vị trí beta, không giống với Arginine. Việc thay thế arginin thành histidine tại codon 463 trong đột biến Kaiping (c.1388G>A) làm giảm 70 – 90% hoạt tính của enzyme G6PD<sup>162</sup>. Cụ thể với trường hợp có chứa hai đột biến này trong nghiên cứu của chúng tôi hoạt độ enzyme đo được là 32,7 IU/10<sup>12</sup>HC. Đây là hai biến thể phổ biến nhất ở khu vực miền Nam Trung Quốc, nghiên cứu của Chiu D.T.Y và cộng sự năm 1993 cũng cho kết quả tương tự khi chỉ ra rằng đột biến Canton có hoạt độ enzyme 4,9% và đột biến Kaiping có hoạt độ enzyme 8% so với người bình thường<sup>47,115</sup>. Một nghiên cứu khác của Ainoon O và cộng sự tại Malaysia năm 2002 cũng cho thấy, hoạt độ enzyme G6PD ở những người có đột biến Canton và Kaiping chỉ bằng 10% hoạt độ ở những người không thiếu hụt enzyme G6PD<sup>155</sup>.

Qua kết quả của nghiên cứu này, một đặc điểm thú vị về đặc điểm phân bố các biến thể khu vực Đông Nam Á cũng cần được đề cập là sự vắng mặt của G6PD Mahidol trong cộng đồng các dân tộc người Việt Nam trong các nghiên cứu trước đây ở khu vực miền Bắc Việt Nam mà chỉ được tìm thấy tại các tỉnh phía Nam nhưng với một tỷ lệ không nhiều tại Đắk Lắk và Đắk Nông tỷ lệ lần lượt là Mahidol với 6,15% (4/65) và 4,62%<sup>105,128</sup>. G6PD Mahidol là biến thể chủ yếu của các Myanmar và Thái Lan<sup>10,109</sup>. Sự vắng mặt của G6PD Mahidol tại khu vực miền Bắc có thể là kết quả của việc không có quan hệ gần gũi với các bộ tộc Myanmar với Việt Nam từ trước cho đến nay, vì lãnh thổ của họ là tương đối xa xôi<sup>91</sup>. Tuy nhiên

sự xuất hiện của nó ở khu vực miền Tây Nguyên, nơi có địa lý gần gũi giao thương với Thái Lan và Myanmar hơn. Đồng thời nghiên cứu này cũng không thấy sự xuất hiện của 5 biến thể mới được phát hiện gần đây ở khu vực Bảo Lộc, tỉnh Lâm Đồng và thành phố Hồ Chí Minh thuộc miền Nam Việt Nam như G6PD Hồ Chí Minh<sup>91</sup> tiếp theo là G6PD Bảo Lộc<sup>90</sup> và G6PD Việt Nam 1,2,3<sup>17</sup> được phát hiện từ người Kinh ở miền Nam Việt Nam hoặc cũng không gặp 2 biến thể mới được tìm thấy từ các nước Đông Nam Á: G6PD Songklanag me (196T> A) từ miền nam Dân số Thái<sup>130</sup>, và một đột biến mới, 94 C> G, từ quần thể Mon ở Myanmar<sup>109</sup>. Các đột biến trên đều được phát hiện ở các nghiên cứu với 1 cỡ mẫu rất nhỏ là 1 trường hợp.

#### 4.2.3.2. Kết quả xác định đột biến gen G6PD theo dân tộc

Phân tích về sự xuất hiện của 14 dạng đột biến theo các dân tộc tại bảng 3.6 cho thấy trong 5 dân tộc được nghiên cứu, nhiều nhất là người Kinh với 201 trẻ (chiếm 59,29%), gặp nhiều loại đột biến nhất. Cụ thể với 10 dạng đột biến, điển hình là các đột biến có nguồn gốc từ Đông Nam Á và Trung Quốc bao gồm G6PD Viangchan, Kaiping, Canton, Union, Gaohe, Quing Yan, Chinese 5, trong đó G6PD Viangchan chiếm tỷ lệ cao nhất 61/203. Với các đột biến ít gặp và lần đầu ở Việt Nam duy chỉ có G6PD Taiwan2 chỉ gặp ở dân tộc Kinh. Tuy nhiên như chúng tôi cũng đã nhận thấy một điểm yếu trong nghiên cứu này còn chưa lấy được toàn bộ số trẻ sơ sinh đã qua sàng lọc từ các tỉnh nên chưa đủ để phản ánh được đúng tỉ lệ mắc bệnh cũng như tỷ lệ các đột biến ở các dân tộc khác nhau. Sau người Kinh đến người Mường với 55 trẻ (chiếm 16,22%) có 8 dạng đột biến là G6PD Union 21/55, Canton 14/55, Viangchan 9/55, Kaiping 5/55, Gaohe, Chinese 5 mỗi loại có 2/55, G6PD Comibra Shunde 1/55 và cũng thấy có 1 loại chưa từng thấy xuất hiện ở người Việt Nam là G6PD Địa Trung Hải 1/55. Người Tày với 44 trẻ (chiếm 12,98%) nhưng cũng có đến 9 dạng đột biến khác nhau, trong đó G6PD Union cũng chiếm đa phần 21/44, đến G6PD Kaiping 13/44, Viangchan 11/44, Canton 8/44, Gaohe 6/44, dạng G6PD Valladoid 2/44 và NanKang 1/44 lần đầu thấy ở Việt Nam nằm ở nhóm người này, còn lại G6PD Union, Quing Yan, Chinese 5 mỗi biến thể đều xuất hiện 1 trường hợp. Người Nùng có 21 trẻ (chiếm 6,19%) với 7 dạng đột biến đều đã từng tìm thấy ở Việt Nam, trong đó chiếm nhiều nhất là G6PD Kaiping 8/21 và Canton 4/21. Sau đó đến G6PD Gaohe 2/21, còn lại G6PD Orissa,

Viangchan, Chinese 5, Union mỗi loại có 1 trường hợp. Cuối cùng là ở dân tộc Thái, có 18 trường hợp (chiếm 5,31%) với sự xuất hiện của 6 biến thể khác nhau, trong đó nhiều nhất lại là G6PD Kaiping 7/18 và Viangchan 4/18. Còn G6PD Union, Canton, Chinese 5 mỗi loại có 2/18 và ít nhất là G6PD Gaohe 1 trường hợp.

So sánh nghiên cứu này với các nghiên cứu trước đây chúng tôi thấy đều thấy có sự tương đồng về phân bố các loại đột biến theo các dân tộc. Theo tìm hiểu của chúng tôi, Ở miền Bắc Việt Nam đã có 3 nghiên cứu phân tích phân tử các biến thể G6PD đã được báo cáo cho đến nay <sup>15,18,112</sup> và khu vực miền Trung và miền Nam với nhiều nghiên cứu hơn <sup>16,17,91,126</sup> nhưng đều cho con số G6PD Viangchan là kiểu xuất hiện trội nhất ở người Kinh và đồng thời nhóm người Kinh sở hữu nhiều loại biến thể phổ biến từ Đông Nam Á và Trung Quốc chẳng hạn như G6PD Gaohe (95A> G), Canton (1376 G> T), và Kaiping (1388 G> A), Chinese 5 (c.1024C>T),... Điều này được giải thích do dân tộc Kinh có nguồn gốc từ nhiều tổ tiên khác nhau và mối liên hệ lịch sử chặt chẽ giữa Việt Nam và Trung Quốc có từ hơn 2.000 năm trước thời nhà Hán nên rõ ràng những biến thể có nguồn gốc từ Trung Quốc này đã được đưa vào dân tộc Kinh từ lâu đời. Ngay từ những nghiên cứu sơ khai đầu tiên về phân tử đột biến gen G6PD đã nói lên điều này. Trong nghiên cứu này cũng cho thấy sự phân bố tần suất của các biến thể G6PD trong dân số Kinh khá giống với dân tộc Thái và thể hiện người Thái có thể giống như người Kinh, dễ dàng chấp nhận kết hôn với các thành viên của các dân tộc khác từ Campuchia, Lào, Myanmar, Trung Quốc và Châu Đại Dương <sup>91</sup>. Đối với dân tộc Mường và Tày, phổ biến nhất là biến thể G6PD Union. Đây là dạng biến thể thuộc lớp II được tìm thấy lần đầu tiên ở người Tây Ban Nha có nguồn gốc Gypsies thuộc một nhóm bộ lạc từ Tây Bắc Ấn Độ di cư vào Trung và Tây Âu. Ngay từ những nghiên cứu rất sớm đã thấy rằng biến thể này có phân phối trên toàn thế giới <sup>137</sup>. Tóm lại, sự phân bố tần suất của các biến thể G6PD trong dân số Kinh, Thái, Mường, Tày, Nùng trong nghiên cứu này với các nhóm dân tộc khác ở Đông Nam Á là khá phong phú cho thấy mối liên hệ di cư và sự trôi dạt di truyền như nhóm dân tộc khác của các nước Đông Nam Á. Những phát hiện hiện tại của chúng tôi đã xác nhận sự hiện diện của tần suất phân bố các biến thể G6PD ở miền Bắc Việt Nam giống với phân bố tần suất được xác định trong nghiên cứu

trước đây. Do đó, có khả năng là người Việt Nam đã kết hôn với các dân tộc Trung Quốc hoặc châu Đại Dương, dẫn đến sự du nhập của các biến thể này vào dân số của mình.

Tuy nhiên khi so sánh với các dân tộc khu vực miền Trung và Nam Bộ chúng tôi thấy có sự khác biệt theo dân tộc về sự xuất hiện của một số biến thể ít gặp. Với các tỉnh khu vực Tây Nguyên tại tỉnh Đắk Lắk cho thấy các nhóm dân tộc Tày, Nùng, Mường, Sách, Thái, Kinh, H'Mông và Ê Đê thì G6PD Viangchan và Mahidol gặp nhiều nhất trong đó Mahidol gặp dân tộc Tày, Nùng, Mường, Sách, Thái, Kinh, H'Mông và Vianchang có mặt ở dân tộc Tày, Nùng, Mường, Sách, Kinh, Ê Đê. Ngoài ra, biến thể Canton cũng gặp trên các nhóm dân tộc Tày, Nùng, Sách, Kinh và Dao với tỷ lệ 9,2% và có 1 ca có biến thể Kaiping (0,8%) ở dân tộc Mường<sup>128</sup>. Còn tại tỉnh Đắk Nông thì cũng là Viangchan nhiều nhất, đến Mahidol và Canton. Khi phân tích gộp theo nhóm dân tộc di cư từ phía Bắc vào Tây Nguyên thì thấy nhóm dân tộc di cư từ các tỉnh miền núi phía Bắc có biến thể Viangchan có 18,46%, Mahidol là 4,62%, và Canton 1,54%. Trong khi đó, trên nhóm dân tộc bản địa, loại biến thể Vianchang chiếm ưu thế 70,77% và Canton là 3,08% và Mahidol là 1,54% thấp hơn<sup>105</sup>.

Để có cái nhìn tổng thể và đầy đủ về sự phát hiện các dạng đột biến khác nhau ở các dân tộc vùng miền khác nhau ở Việt Nam chúng tôi có bảng 4.3 thống kê các nghiên cứu thiếu enzyme G6PD từ trước đến nay được thực hiện trên cho thấy 13 dân tộc khác nhau với 20 loại đột biến được phát hiện, trong đó chúng tôi đã góp phần phát hiện ở 5 dân tộc với 14 loại đột biến. Với 8 nghiên cứu về đặc điểm và tỷ lệ các biến thể đột biến G6PD ở Việt Nam từ trước đến nay đã cho chúng ta một cái nhìn tương đối bao quát về các biến thể

Tuy nhiên, cần có các nghiên cứu sâu hơn dựa vào cộng đồng cần được thực hiện để xác định mức độ phổ biến, phân bố và tương quan kiểu hình của các biến thể này ở các nhóm dân tộc khác nhau và ở các khu vực địa lý khác nhau.

Bảng 4.3. So sánh sự xuất hiện các đột biến trên các dân tộc với các nghiên cứu tại VN

TT	Tên dạng đột biến	Exon	Hùng (2000)		Trần Thị Chính (2003)				Quach Xuan Hinh (2009)		Matsuoko (2007)		Hue (2009)		Hue (2013)	Hùng (2015)	Matsuoko (2017)		Giang (2022)					Nghiên cứu này													
			Pako	Kaga	Kinh	Kiatu	Raglai	Tày	Rục	Kinh	Thái	Kinh	Nùng	Kinh	Sieng	Kinh	Kinh	K'Ho	C'me	Tày	Nùng	Mường	H'Mông	Thái	Dao	M'Nông	Kinh	Kinh	Mường	Tày	Nùng	Thái					
1.	Gaoha	2	-	-	3	-	-	-	1	2	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15	2	6	2	1							
<b>2</b>	<b>Orissa</b>	<b>3</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>3</b>	-	-	<b>1</b>	-								
3	Quing Yan	5	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	-	1	-	-							
<b>4</b>	<b>Valladolid</b>	<b>5</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>2</b>	-	-							
<b>5.</b>	<b>NanKang</b>	<b>6</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>1</b>	-	-							
<b>6.</b>	<b>Địa Trung Hải</b>	<b>6</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>0</b>	<b>1</b>	-	-	-							
7.	Comibra Shunde	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	1	-	-	-							
8.	Viangchan	9	8	16	11	3	20	14	1	1	3	9	3	6	5	-	20	13	13	12	32	1	1	2	1	1	1	6	1	1	40	6	61	9	11	1	4
9.	Chatham	9	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
10.	Chinese-5	11	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	2	1	1	2						
<b>11</b>	<b>Taiwan 2</b>	<b>11</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>1</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
12	Union	11	-	-	7	3	8	1	-	-	-	1	2	-	-	-	2	2	5	-	-	-	-	-	-	-	24	21	1	1	2						
13	Canton	12	1	-	11	3	-	4	3	-	-	-	5	-	-	-	8	2	8	-	3	-	-	-	1	1	1	35	14	8	4	2					
14	Kaiping	12	-	-	7	-	-	-	1	-	-	-	3	-	-	-	2	1	11	-	-	-	-	-	-	-	40	5	13	8	7						
15.1	Silent 1	-	-	-	8	3	-	-	-	-	-	-	-	33	21	3	-	17	-	-	-	-	-	-	-	-	*	*	*	*	*	*	*	*			
15.2	Silent 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
16	Bao Loc	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
17	Vietnam1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
18	Vietnam2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
19	Vietnam3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
20	Ho Chi Minh	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
21	Mahidol	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			<b>9</b>	<b>16</b>	<b>7</b>	<b>44</b>	<b>18</b>	<b>21</b>	<b>18</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>12</b>	<b>5</b>	<b>19</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>64</b>	<b>35</b>	<b>30</b>	<b>18</b>	<b>85</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>8</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>41</b>	<b>8</b>	<b>201</b>	<b>55</b>	<b>44</b>	<b>21</b>	<b>18</b>

Ghi chú: Các số liệu trên của Việt Nam được báo cáo từ <sup>16,17,90,91,105,112,126,128</sup>



**Bảng 4.4. Bảng thống kê sự phân bố các dạng đột biến G6PD phổ biến theo các nhóm tộc chính của các nước khu vực Đông Nam Á trong những nghiên cứu gần đây<sup>53</sup>**

Quốc gia	Việt Nam		Lào	Campuchia		Thái Lan	Myanmar			Malaysia		Indonesia		Philippin
	Kinh	Khác	Lào	Khmer	Khác	Thái	Miến	Khác	Mã Lai	O.Asli	Java	Nhập cư		
Viangchan (871G> A)	164	19	245	637	5	169	9	3	36	6	7	31	6	
Mahidol (487G> A)			7	10		97	701	260	18		2			
Vanua Lara (383 T> C)									3			95	1	
Địa Trung Hải (563C> T)				5		1	2		25		5	2		
Coimbra (592C> T)	2			6			3		4	5	1	11		
Chatham (1003G> A)									2			31	8	
Kaiping (1388G> A)	14		7			50	13	10	2			30		
Canton (1376G> T)	13		8	9		38	16	2	4		4			
Chinese-5 (1024C> T)	11	1		3		3						2		
Quing Yuan (392G> T)	5		6			7	8	8						
Chinese -3 (493A> G)													4	
Gaohe (95A> G)	2					3								
Union (1360C> T)	9		25	4		19	4		2				38	
Khác	5			1		1	6		2					
1311T / 93C *	50	21				9		95	3	57	5		1	
<b>Tổng cộng</b>	<b>275</b>	<b>41</b>	<b>298</b>	<b>675</b>	<b>5</b>	<b>397</b>	<b>762</b>	<b>378</b>	<b>101</b>	<b>68</b>	<b>24</b>	<b>202</b>	<b>58</b>	

Ghi chú: Các số liệu của Việt Nam được báo cáo từ <sup>10,12,16-18,91,163</sup>, số liệu về Lào được báo cáo từ <sup>10,12,131,139,164</sup>; số liệu về Campuchia được báo cáo từ <sup>4,10,161,164,165</sup>; số liệu của Thái Lan được báo cáo từ <sup>10,12,55,93,99,106,107,119,127,130,164</sup>; số liệu của Myanmar được báo cáo từ <sup>43,164,166</sup>; số liệu của Malaysia được báo cáo từ <sup>12,51,141,151,155,164</sup>; số liệu về Indonesia được báo cáo bằng tiếng Java, Betawi và Sundan <sup>12,50,51,141,144,151,155,163,164</sup> <sup>12,50,144,163,164,167,168</sup>; số liệu của Philippines được báo cáo từ <sup>164,169,170</sup>

#### 4.2.3.3. Kết quả xác định đột biến gen G6PD theo lớp và hoạt độ enzyme

Một khía cạnh nữa cần phân tích qua kết quả này là hoạt độ enzyme của các trẻ em miền Bắc Việt Nam do các biến thể G6PD gây ra. Như nội dung về thiếu G6PD đã được làm rõ trong nghiên cứu này, mức nhau nghiêm trọng của bệnh thay đổi tùy thuộc vào hoạt động của enzyme còn lại và liên kết cơ chất, chúng bị ảnh hưởng bởi loại đột biến khác nhau. Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) phân chia 5 phân lớp dựa vào chức năng hoạt động enzyme và mức độ ảnh hưởng đến lâm sàng, trong đó phân lớp I, thiếu G6PD nặng khi hoạt độ enzyme <10% và có biểu hiện lâm sàng thường để lại hậu quả nghiêm trọng, thiếu máu tan máu HC không hình cầu mạn tính (CNSHA), bệnh nhân thường có tiền sử vàng da nặng, thiếu máu cần phải truyền máu, ghi nhận có tăng HC lưới và lách to<sup>8,32</sup>. Tuy nhiên các biến thể thuộc loại này thường không phổ biến và hiếm xảy ra trên quần thể. Lớp II, thiếu G6PD nặng khi hoạt độ enzyme <10% và có biểu hiện lâm sàng với thiếu máu tan máu cấp tính, từng đợt, loại này phổ biến hơn ở các nước châu Á và Địa Trung Hải. Lớp III được coi là thiếu G6PD nhẹ và trung bình khi hoạt độ enzyme 10-60%, có cơn tan máu cấp khi tiếp xúc với các tác nhân oxy hóa. Còn lại lớp IV và V thiếu G6PD rất nhẹ hoặc không khi hoạt độ enzyme >60%, không có biểu hiện lâm sàng và rất hiếm gặp.

Trong nghiên cứu này, khi phân tích theo mức độ qua hoạt độ enzyme G6PD qua bảng 3.7 cho thấy: hoạt động enzyme của 350 bệnh nhân nhi dao động từ 0-186,1 U/10<sup>12</sup> HC với mức trung bình chung là  $41,3 \pm 35,9$  U/10<sup>12</sup> HC, trong đó thấp nhất ở 1 bệnh nhi nam có mức enzyme là 0 và cao nhất cũng là 1 bệnh nhi nam có nồng độ là 186,1 U/10<sup>12</sup> HC. Chia theo tổng bệnh nhi thấy cao nhất có 66,29% bệnh nhân có nồng độ G6PD mức độ vừa, 29,14% nhóm bệnh nhân mức độ nặng và thấp nhất có 4,57% nhóm bệnh nhi có mức độ nhẹ. Điều này cũng phù hợp với các nghiên cứu trên thế giới cũng như ở Việt Nam. Sự khác biệt của các mức độ enzyme có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ . Hầu hết các nghiên cứu đều cho thấy không có mối liên hệ giữa hoạt độ enzyme với mức độ nặng, nhẹ của lâm sàng mà thường do hiện tượng tiếp xúc với các tác nhân gây ôxi hoá. Và quan trọng nữa, hoạt độ cũng như các dấu hiệu lâm sàng, các biến chứng xảy ra còn lệ thuộc các

dạng biến thể có nằm trong nhóm cấu trúc của enzyme với vị trí có chứa những acid amin có tính đồng nhất cao thường là vùng có chức năng quan trọng hay không?. Những đột biến xảy ra ở xa vùng này thì enzyme ít thay đổi chức năng ngược lại đột biến xảy ra xung quanh vùng này hay tại chính vùng này sẽ dẫn tới thay đổi nhiều về mặt chức năng. Trong các đột biến gây bệnh thiếu hụt G6PD, những đột biến tại vị trí xa vùng gắn NADP<sup>+</sup> hay xa vị trí gắn cơ chất G6P thường ít gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến chức năng của enzyme và ngược lại. Cấu trúc của enzyme vị trí có chứa những acid amin có tính đồng nhất cao thường là vùng có chức năng quan trọng. Vì vậy, những đột biến xảy ra ở xa vùng này thì enzyme ít thay đổi chức năng ngược lại đột biến xảy ra xung quanh vùng này hay tại chính vùng này sẽ dẫn tới thay đổi nhiều về mặt chức năng. Trong các đột biến gây bệnh thiếu hụt G6PD, những đột biến tại vị trí xa vùng gắn NADP<sup>+</sup> hay xa vị trí gắn cơ chất G6P thường ít gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến chức năng của enzyme và ngược lại. Exon 10 là vị trí đã được ghi nhận nhiều đột biến nhất trên gen G6PD, 86% đột biến nằm trên vùng này được xếp vào phân lớp I, đây là những đột biến tập trung quanh các vùng gắn G6P và NADP<sup>+</sup> như các vị trí acid amin 360-365, 374-388, 389-395 và 408-414<sup>9,65</sup>. Trong nghiên cứu, chúng tôi cũng đã tiến hành khảo sát trên toàn bộ exon 10, tuy nhiên không ghi nhận trường hợp bệnh nhân nào có biến đổi ở vị trí này.

Phân lớp loại II với đặc điểm thiếu vừa, hoạt độ enzyme 10-60% so với hoạt động bình thường (tương ứng 20-120 UI/10<sup>12</sup> HC), phân lớp loại III với đặc điểm thiếu nhẹ, hoạt độ enzyme 60-150% so với hoạt động bình thường (tương ứng 120 - 200 UI/10<sup>12</sup> HC). Tuy nhiên sự phân biệt giữa các lớp không phải luôn luôn rõ ràng, những dạng đột biến được liệt kê trong lớp I nhưng xét về mặt hoạt độ enzyme thì thậm chí lại cao hơn một số biến thể được xếp vào phân lớp III. Việc phân loại các biến thể thành loại II và III còn gây tranh cãi nhiều hơn vì dữ liệu tích lũy trong nhiều năm cho thấy sự biến đổi cực kỳ lớn về tính năng của protein và rất ít khác biệt về hoạt tính enzyme còn lại. Do đó, hoạt tính của enzyme được sử dụng để phân biệt giữa các lớp dường như không đủ để phân loại chính xác về nguy cơ tan máu<sup>32</sup>. Phân loại của WHO đôi khi cũng bị hiểu sai và được sử dụng như một phân

loại kiểu hình của “các cá thể” thay vì phân loại các hoạt động enzyme còn sót lại được quan sát thấy ở nam giới dị hợp tử với biến thể cụ thể<sup>4</sup>.

Điều này cũng được nhận thấy trong nghiên cứu của chúng tôi, qua bảng 3.8 cho thấy Theo phân loại của WHO thiếu enzyme G6PD có 5 lớp (I-V). thì tất cả các đột biến được phát hiện đều thuộc phân lớp II, lớp III, không có biến thể nào nằm trong lớp I và lớp IV, V. Lớp II có 8 loại đột biến với 280 bệnh nhân chiếm 82,6 %, lớp III có 5 loại với 59 bệnh nhân chiếm 17,4% (dạng Taiwan2 được dự đoán thuộc lớp này). Hoạt độ enzyme trung bình của lớp II là  $38,7 \pm 34,82 \text{ U}/10^{12} \text{ HC}$  và lớp III là  $53,6 \pm 39,78 \text{ U}/10^{12} \text{ HC}$ , và sự khác biệt về hoạt độ enzyme của 2 lớp này có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ .

Tuy nhiên bệnh nhân có cùng kiểu đột biến nhưng hoạt độ enzyme tương đối chênh lệch nhau dẫn tới dải phân bố hoạt độ enzyme của mỗi dạng đột biến tương đối rộng. Nhóm lớp II với 8 dạng đột biến, G6PD Viangchan độ dao động của enzyme từ 1,01-159,1 UI/10<sup>12</sup> HC; G6PD Kaiping 0,3-186,1 UI/10<sup>12</sup> HC; G6PD Canton 1,7-173,3 UI/10<sup>12</sup> HC; G6PD Union 0-152 UI/10<sup>12</sup> HC đều tương ứng với cả thiếu nghiêm trọng, vừa và nhẹ. Còn lại 4 loại đột biến G6PD Valladolid có 2 bệnh nhi: 43,1 và 53,1 UI/10<sup>12</sup> HC, G6PD NanKang với 1 bệnh nhi có nồng độ enzyme 26,7 UI/10<sup>12</sup> HC và tương tự G6PD Địa Trung Hải và G6PD Comibra Shunde đều có 1 bệnh nhi với hoạt độ enzyme tương ứng 15,5 UI/10<sup>12</sup> HC và 67,7 UI/10<sup>12</sup> HC đều thuộc mức độ vừa. Trong các đột biến lớp III, vẫn có các biến thể có hoạt độ enzyme mức độ nặng như G6PD Gaohe có hoạt độ enzyme 10,1-94,7 UI/10<sup>12</sup> HC và G6PD Chinese-5 là 0,01-163,8 UI/10<sup>12</sup> HC. Như vậy, điều này không phù hợp với các phân loại của WHO về thiếu hụt mức độ II là nghiêm trọng hoặc III là vừa đến nhẹ. Còn lại 3 đột biến của lớp 3 là G6PD Qing Yan, G6PD Orissa và G6PD Comibra Shunde có với hoạt độ enzyme tương ứng 28,3-167,6 UI/10<sup>12</sup> HC, 27-78,9 và 123,4 UI/10<sup>12</sup> HC đều thuộc mức độ vừa và nhẹ. Một số tác giả cũng đã chỉ ra hạn chế của hệ thống phân loại của WHO là nó thường dựa vào một số lượng nhỏ các quan sát và phương pháp luận phòng thí nghiệm không được tiêu chuẩn hóa<sup>133</sup>. Hơn nữa, việc sử dụng tùy ý giá trị giới hạn của hoạt tính enzyme 10% để phân biệt

giữa các biến thể loại II và III không được tìm thấy có liên quan đáng kể đến mức độ nghiêm trọng của chứng tan máu lâm sàng trong một số nghiên cứu<sup>52</sup>. Gần đây khi nghiên cứu về tương quan kiểu gen, kiểu hình ở trẻ sơ sinh, có tác giả cho rằng, thiếu G6PD rất không đồng nhất về các biểu hiện sinh hóa, lâm sàng và phân tử, các đột biến G6PD khác nhau đã tạo ra một loạt các kiểu hình lâm sàng và sinh hóa chông chéo giữa các biến thể loại I, II hoặc III. Có sự thay đổi rộng rãi trong hoạt động của enzyme ở các cá thể thiếu G6PD, ngay cả ở những người có cùng kiểu gen, cùng với phổ đột biến không đồng nhất, cản trở việc phân loại các biến thể *G6PD* theo phân loại hiện tại của WHO<sup>171</sup>. Các tỷ lệ đồng xuất hiện trái ngược nhau giữa các mức độ thiếu hụt trầm trọng/trung bình đến nhẹ và các biến thể G6PD đã được tìm thấy trong nghiên cứu hiện tại của chúng tôi và trong một số nghiên cứu trước đó<sup>102,117,133,147</sup> ủng hộ việc đề xuất xem xét lại hoặc phân loại lại hệ thống phân biệt hoạt động enzyme G6PD của WHO đã được thiết lập. Gần đây nhất, một số phân tích *in-silico* đã được công bố cho thấy các dự đoán về thiếu hụt enzyme cần chỉ dựa trên hoạt tính của enzyme được đánh giá trong một sự kiện tan máu, dữ liệu kiểu gen, các đặc điểm kiểu hình và lâm sàng tốt hơn để có ý nghĩa cho thực hành lâm sàng đưa vào phân loại đặc biệt với đánh giá trên phụ nữ dị hợp tử<sup>38,156,172</sup>

Trong nghiên cứu, có 11 trường hợp chưa xác định được đột biến qua khảo sát trên các exon. Những trường hợp này có hoạt độ enzyme tương đối thấp dao động trong khoảng từ 0,32 đến 111,27 U/10<sup>12</sup>HC. Các đột biến gây bệnh trên các trường hợp này có thể được xác định được khi khảo sát trên các intron của gen G6PD. Điều này cho thấy vẫn rất cần những thăm dò được tiến hành với cỡ mẫu lớn và trên toàn bộ cả các exon và intron gen G6PD với kỹ thuật hiện đại hơn nữa. Từ đó có thể xây dựng bản đồ phân bố các đột biến tại Việt Nam là cơ sở dữ liệu phục vụ cho nghiên cứu, sàng lọc bệnh ở những khu vực có tần suất mắc bệnh cao giúp cho công tác phòng bệnh hiệu quả và giảm đáng kể các nguy cơ xảy ra các biến chứng nguy hiểm của bệnh như tan máu đồng thời tạo điều kiện thuận lợi cho công tác tư vấn di truyền bệnh. Việc nắm được các đột biến thường gặp trong dân cư Việt Nam nói

chung và các dân tộc nói riêng cũng hỗ trợ cho việc thiết lập các công cụ chẩn đoán được dễ dàng, chính xác hơn.

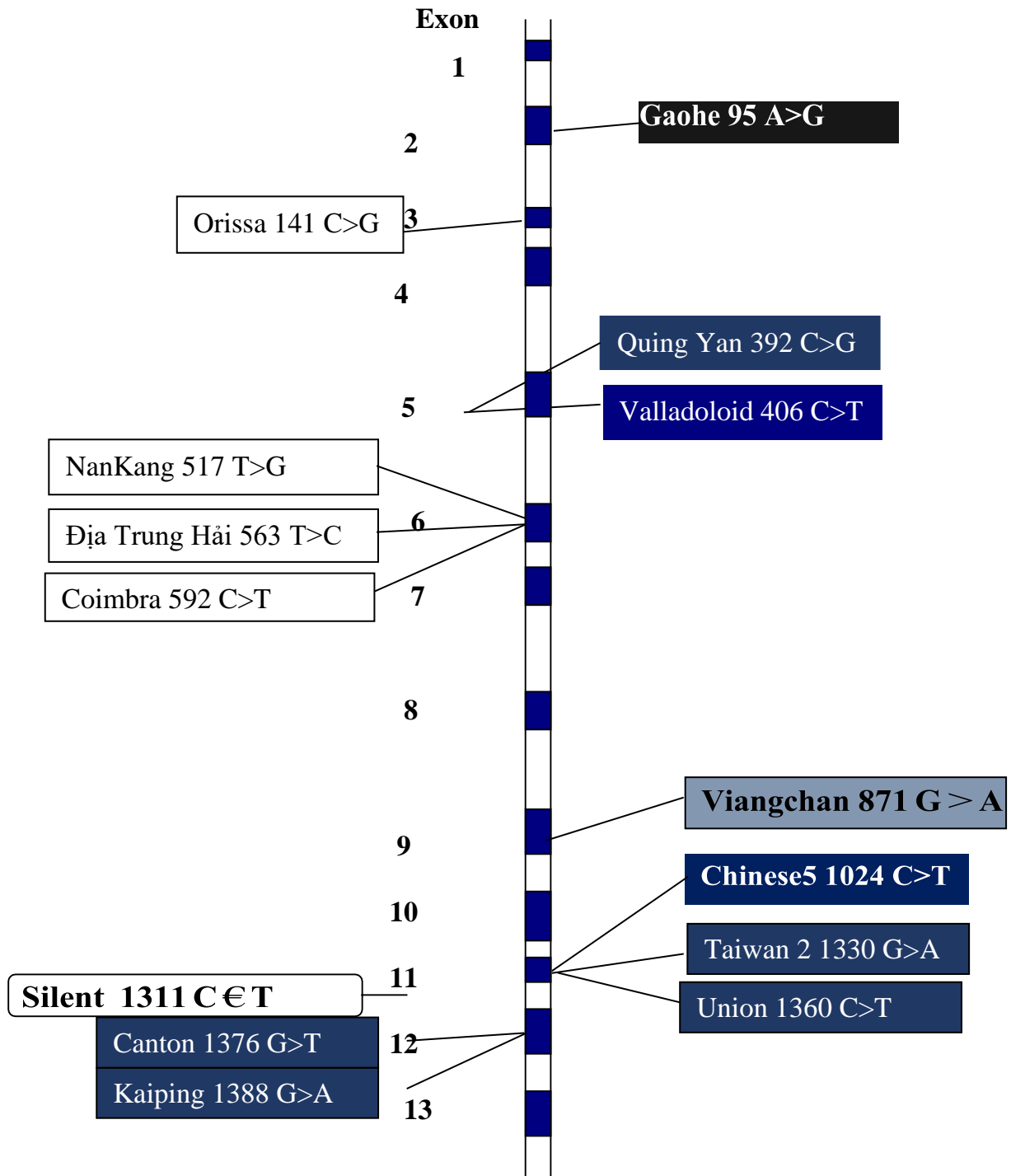
#### 4.2.3.4. Kết quả xác định đột biến gen G6PD với hoạt độ enzyme và kiểu gen

Phân tích về đặc điểm mức độ enzyme và mối tương quan kiểu gen, kiểu hình của các đột biến qua bảng 3.7, 3.9 cho thấy: 301 nam giới có đột biến dạng dị hợp tử (Hemozygous) cũng là tổng số nam giới bị bệnh có hoạt động enzyme là  $35,9 \pm 30,9$  U/10<sup>12</sup> HC còn 38 nữ giới có hoạt động enzyme là  $82,3 \pm 45,81$  U/10<sup>12</sup> HC trong đó có 2 dạng kiểu hình: 29 trường hợp đồng hợp tử (Homozygous) với hoạt động enzyme  $56,1 \pm 42,1$  U/10<sup>12</sup> HC và 9 trường hợp dị hợp tử (Hetezygous) có hoạt động enzyme  $89,6 \pm 44,6$  U/10<sup>12</sup> HC. Khi so sánh hoạt động enzyme giữa nhóm nam dị hợp tử và nữ dị hợp tử có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 99% ( $p < 0,01$ ); mức độ enzyme giữa nhóm nam dị hợp tử và nữ đồng hợp tử và nữ dị hợp tử và nữ đồng hợp tử cũng có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95% ( $p_{2,3} < 0,05$ ). Khi đánh giá mức độ enzyme theo độ theo giá trị cao nhất và thấp nhất cho thấy: Hoạt độ enzyme thấp nhất xảy ra ở cả 2 đối tượng nam giới dị hợp tử và nữ đồng hợp tử đều ở đột biến dạng G6PD Union, đột biến thuộc lớp II theo phân loại của WHO: ở 1 nam giới dị hợp tử hoạt độ enzyme bằng 0 U/10<sup>12</sup> HC và 1 nữ đồng hợp tử là 2 U/10<sup>12</sup> HC. Nhưng hoạt độ enzyme thấp nhất trên nữ dị hợp tử bằng 12,5 U/10<sup>12</sup> HC lại xảy ra trên đột biến G6PD Canton cũng thuộc lớp II. Hoạt độ enzyme cao nhất xảy ra nam giới nồng độ enzyme bằng 186,1 U/10<sup>12</sup> HC với đột biến G6PD Kaiping cũng thuộc lớp II, còn nữ đồng hợp tử có hoạt độ enzyme cao nhất là 116,2 U/10<sup>12</sup> HC với đột biến G6PD Chinese 5 và nữ dị hợp tử có hoạt độ enzyme cao nhất là 167,55 U/10<sup>12</sup> HC với đột biến G6PD Qing Yan, đều là các đột biến thuộc lớp III. Như vậy, khi tất cả nam giới mang bất kỳ loại biến thể G6PD nào đều có biểu hiện thiếu hụt enzyme đều có thể ở các mức độ từ nghiêm trọng, vừa và nhẹ nhưng 96,8% là vừa và nặng. Điều này hoàn toàn phù hợp vì ở nam do chỉ có một NST X, nên khi bị đột biến thường là thiếu hoàn toàn, nồng độ enzyme thấp hơn hẳn. Hoạt động của enzyme G6PD ở phụ nữ dị hợp tử cũng dao động giữa mức độ thiếu hụt nặng, vừa và nhẹ nhưng 95 % là vừa và nhẹ. Có hai trường hợp nữ dị hợp tử có hoạt độ enzyme mức độ nặng ( $< 20$  UI/10<sup>12</sup>HC) là một

trường hợp với G6PD Kaiping với 12,5 U/10<sup>12</sup> HC và G6PD Union với 20 U/10<sup>12</sup> HC. Là một đặc điểm liên kết với X, sự biểu hiện của sự thiếu hụt G6PD ở phụ nữ dị hợp tử theo lý thuyết của Lyon. Do sự bất hoạt ngẫu nhiên của một trong hai NST X sớm trong đời sống phôi thai, có thể tìm thấy hỗn hợp tế bào bình thường và thiếu enzyme. Do đó, những con cái dị hợp tử thể hiện sự biến đổi của biểu hiện tùy thuộc vào mức độ khảm<sup>32</sup>. Vậy hai bệnh nhân nữ dị hợp tử này có hoạt độ enzyme dưới 20 IU/10<sup>12</sup>HC có khả năng là do một trong hai NST X trong tế bào ở nữ đã bị bất hoạt từ giai đoạn sớm của thời kỳ phôi thai, sau đó theo quá trình phân bào, nó được nhân lên tạo thành cơ thể dạng khảm giữa những tế bào có NST lành và NST mang gen đột biến với các tỷ lệ khác nhau. Trong trường hợp này có 2 quần thể HC: một quần thể bình thường và một quần thể thiếu G6PD. Tỷ lệ giữa hai quần thể HC này là không phải luôn đồng đều. Một số ít trường hợp, các HC bất thường chỉ chiếm 1%, nhưng cũng có khi lên đến 99%. Ngoài ra, còn có 1 trường hợp nữ khác trong nghiên cứu có hai đột biến dị hợp tử Canton và Kaiping, có hoạt độ enzyme đo được là 32,7 IU/10<sup>12</sup>HC được xếp vào nhóm mức độ vừa, hai đột biến này có vị trí tương đối gần nhau trên exon 12 và đều được xếp vào phân lớp II theo sự phân loại của tổ chức y tế thế giới, là hai biến thể phổ biến nhất ở khu vực miền Nam Trung Quốc.

Thiếu G6PD ở nữ có hai dạng: thiếu G6PD đồng hợp tử và thiếu G6PD dị hợp tử. Các trường hợp thiếu đồng hợp tử là cả hai X (1 nhận từ bố và 1 từ mẹ) đều bị đột biến, trường hợp này thường hiếm gặp hơn, ở nữ hay gặp hơn cả là các đột biến dạng dị hợp tử<sup>100,101</sup>. Theo quan sát của chúng tôi, 9 trường hợp nữ đồng hợp tử chỉ có 2 mức độ thiếu hụt nặng và vừa và còn phụ thuộc vào biến thể đột biến. Mức độ nặng xảy ra ở 1 đột biến G6PD Unoin với 2 UI/10<sup>12</sup> HC và đột biến G6PD Viangchan với 15.3 UI/10<sup>12</sup> HC. So sánh kết quả này với các nghiên cứu khác trên thế giới cho thấy cũng cho kết quả tương tự, các nam giới dị hợp tử và nữ đồng hợp tử thường cho kết quả hoạt độ gen trầm trọng hơn so nữ dị hợp tử<sup>99,102,139,173</sup>. Tuy nhiên, các tác giả cũng cho rằng các phương pháp định tính và định lượng enzyme G6PD đã phát hiện không tốt các trường hợp thiếu G6PD ở nữ. Trong phương pháp đánh giá độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp Akira Hirono so với phương

pháp định lượng, Tạ Thị Tĩnh và cộng sự đã nhận xét phương pháp có độ nhạy 79% và độ đặc hiệu 97% nếu phát hiện cả hai giới. Độ nhạy tăng lên 92% nếu chỉ phát hiện ở nam và giảm xuống còn 63% khi phát hiện ở nữ.



Hình 4.1. Vị trí các dạng đột biến trên gen G6PD



### **4.3. Phân tích đột biến gen G6PD ở một số gia đình**

Từ 341 trẻ thiếu G6PD tại mục tiêu 1, căn cứ về tiêu chí chọn các gia đình, chúng tôi tiến hành thu thập được mẫu của 25 gia đình bao gồm 20 gia đình từ 20 trẻ nam và 5 gia đình từ 5 trẻ nữ thiếu enzyme G6PD. Tổng số 152 người đã được tiến hành lấy mẫu máu làm xét nghiệm. Qua nghiên cứu chúng tôi thu được kết quả như sau:

#### **4.3.1. Một số đặc điểm địa dư, dân tộc của các gia đình**

Về địa dư và dân tộc, từ 339/350 trẻ em thiếu G6PD có đột biến gen thuộc mục tiêu 1 thuộc 28 tỉnh/thành miền Bắc Việt Nam chúng tôi lựa chọn 25 gia đình thuộc 14 địa dư tỉnh/thành khu vực miền Bắc Việt Nam, mỗi tỉnh/thành có 1-2 gia đình thiếu G6PD, trong đó Hà Nội có 4 gia đình chiếm tỷ lệ cao nhất, sau đó đến Hải Dương: 3 gia đình, Hưng Yên, Cao Bằng, Hải Phòng, Bắc Giang, Điện Biên, Lào Cai, Ninh Bình mỗi tỉnh có 2 gia đình, còn lại Hoà Bình, Bắc Ninh, Lạng Sơn, Yên Bái mỗi tỉnh có 1 gia đình thiếu G6PD, đảm bảo phân bố trong 28 tỉnh thành. Đồng thời lựa chọn được 5 dân tộc gặp tỷ lệ thiếu của bệnh này cũng bao gồm thuộc 5 dân tộc khác nhau trong mục tiêu 1 gặp tỷ lệ cao mắc bệnh này ở khu vực miền Bắc Việt Nam. Cụ thể với các tỷ lệ: Dân tộc Kinh: 10, Mường có 9 gia đình, dân tộc Tày có 3 gia đình và dân tộc Nùng 2 và Thái 1 gia đình. Điều này đã được chúng tôi bàn luận kỹ trong mục tiêu 1.

#### **4.3.2. Phát hiện thiếu enzyme và đột biến gen G6PD các gia đình**

Từ 341 trẻ thiếu G6PD tại mục tiêu 1, căn cứ về tiêu chí chọn các gia đình, chúng tôi tiến hành thu thập được mẫu của 25 gia đình bao gồm 20 gia đình từ 20 trẻ nam và 5 gia đình từ 5 trẻ nữ thiếu enzyme G6PD. Kết quả thu được theo bảng 3.11 cho thấy, tổng số 127 người với 19 trường hợp thế hệ III là các anh/chị/em của bệnh nhi; 50 trường hợp thế hệ II là 50 bố, mẹ và 58 trường hợp thế hệ I là ông, bà nội ngoại. Theo trình tự nghiên cứu, đầu tiên qua xác định nồng độ enzyme phát hiện 71 trường hợp có thiếu enzyme G6PD, chiếm 55,9%. Sau đó từ 71 trường hợp này chúng tôi tiếp tục tiến hành phương pháp giải trình tự phát hiện được 63 trường hợp có đột biến gen chiếm 88,73%. Kết quả đột biến gen từ các trường hợp trong 25 gia đình có thành viên thiếu enzyme thấp hơn so với tỉ lệ phát hiện ở mục tiêu 1 là: 97,15% khi làm trên các đối tượng là các thế hệ trong gia đình.

Khi phân tích cụ thể về tỷ lệ thiếu enzyme và đột biến gen G6PD ở các thế hệ qua bảng 3.11 cho thấy: Thế hệ III là thế hệ các trẻ bị bệnh và các anh/chị/em: trừ 25 bệnh nhân nhi (20 nam, 4 nữ) được phát hiện từ mục tiêu 1 thì nghiên cứu này tiếp tục phát hiện 12/19 anh/chị em vừa thiếu enzyme và đồng thời đều có đột biến gen được tiếp tục phát hiện qua mục tiêu này chiếm 26,76%, trong đó 5 trẻ nam và nữ 7 trẻ nữ. Như vậy ở thế hệ này nếu chỉ tính đến số anh/chị/em thì nam giới ít hơn nữ giới, điều này cũng dễ giải thích do đây là các đối tượng có thể được hoặc không được tham gia sàng lọc sơ sinh bệnh thiếu G6PD. Đồng thời với một con số 25 gia đình cũng là nhược điểm của nghiên cứu này nên không khẳng định được với tỷ lệ về giới qua con số này.

Thế hệ thứ II trong gia đình là bố mẹ bệnh nhi chúng tôi đã thu được tổng 50 bố, mẹ trong đó tỉ lệ thiếu enzyme và đột biến gen G6PD lần lượt là 29/50 (58%) và 25/29 (86,2%). Với các bố: Từ 24 người bố trong gia đình chỉ có 6 trường hợp có thiếu enzyme và chỉ có 1 trường hợp bố có đột biến. Gia đình này thuộc loại đột biến G6PD Viangchan. Còn lại 23 trường hợp thiếu enzyme và 24 trường hợp đột biến gen là từ mẹ. Có 1 trường hợp mẹ có hoạt độ enzyme bình thường nhưng có đột biến gen G6PD, trường hợp này là trường hợp mẹ dị hợp tử không hề có biểu hiện lâm sàng cũng như nồng độ enzyme hoàn toàn bình thường nhưng vẫn mang gen đột biến từ bà ngoại sau đó truyền cho con trai của mình. Người mẹ này mang đột biến G6PD Canton.

Với thế hệ cao nhất là ông bà, qua bảng 3.10, 3.11 thu được 58 người từ 29 cặp ông bà bao gồm: 23 cặp ông bà ngoại, 1 bà ngoại và 6 cặp ông bà nội: 1) Với các cặp ông bà nội: Được lấy từ 6 người bố có thiếu enzyme, thấy có 1 ông thiếu enzyme nhưng khi tiến hành tìm các đột biến trên gen G6PD thì không trường hợp nào có đột biến; có 5 bà nội cũng không thấy trường hợp nào có thiếu enzyme cũng như có đột biến. Nhưng qua tìm hiểu từ 1 gia đình có bố bị bệnh và đột biến chúng tôi thu được thông tin từ gia đình 1 bà nội đã bị mất được chẩn đoán có liên quan thiếu G6PD. 2) Với các cặp ông bà ngoại: Được thu thập từ 24 người mẹ, 23 cặp ông bà ngoại và 1 bà ngoại với 24 bà ngoại thì phát hiện 14 người thiếu enzyme nhưng 12 người đột biến gen và 23 ông ngoại (do 1 ông đã mất) thì 13 người thiếu enzyme và 12 người đột biến gen. Như vậy thế hệ này được tiến hành lấy số lượng

đông nhất tổng 30 người thiếu và 26 người đột biến, đa phần là các trường hợp ông bà ngoại truyền cho con gái của mình và tiếp tục truyền cho cháu của họ.

Về giới tính cho thấy, kết quả đột biến gen từ 25 bệnh nhi lấy theo các loại đột biến trẻ nam là 20 (80%) và nữ là 5 (20%) gần tương ứng với tỷ lệ trẻ thiếu G6PD trong mục tiêu 1 (nam: 88,9%, nữ 11,1%). Còn lại các thành viên trong gia đình 71 trường hợp có thiếu enzyme G6PD với 25 nam giới (35,2%) và 46 nữ giới (65,8%); 63 trường hợp có đột biến gen với 18 nam (28,57%) và 45 nữ (72,43%). Tỷ lệ khác với kết quả phát hiện các đột biến từ mục tiêu 1 do các trường hợp tại mục tiêu 2 hầu hết là chưa được sàng lọc, phần nhiều là người mang gen bệnh nên tỷ lệ nữ giới cao hơn. Chung tỉ lệ phân tích cả 3 thế hệ I,II,III (ông bà, bố mẹ, con) thì số nam giới chiếm 48,27%, nữ là 51,73%. Điều này cho thấy do đặc điểm di truyền của bệnh nên khó phát hiện ở nữ giới, đặc biệt ở các thế hệ trước. Vì vậy với sự tiến bộ của khoa học công nghệ, kỹ thuật y học, bệnh cần được chẩn đoán sớm, khi còn nhỏ để có sự can thiệp kịp thời qua SLSS và cần sự quan tâm của gia đình bệnh nhi giúp cho tư vấn di truyền và phòng bệnh. Đối với thế hệ ông bà và bố mẹ hầu như đã mang gen bệnh nhưng diễn biến âm thầm, không được sàng lọc, không được chẩn đoán, do các trường hợp dị hợp tử không có triệu chứng lâm sàng hoặc các triệu chứng nhẹ nên hầu như không được chẩn đoán, theo dõi và quản lý cũng như tư vấn di truyền. Điều này hoàn toàn phù hợp với đặc điểm di truyền của bệnh mà cũng phù hợp với các nghiên cứu ở Việt Nam và trên thế giới đã được nói đến trong mục tiêu 1.

#### **4.3.3. Đặc điểm về nồng độ enzyme và di truyền các biến thể của gen G6PD trong các gia đình:**

Để có được các kết quả về đột biến gen trên toàn bộ 13 exon, tương tự mục tiêu 1 chúng tôi đã tiến hành phản ứng PCR và giải trình tự Sanger nghiên cứu với tất cả các mẫu DNA đều có độ tinh sạch cao (mật độ quang ở bước sóng 260/280 nm khoảng 1,8-2,0), đảm bảo cho kỹ thuật PCR thực hiện thành công. Sử dụng 8 cặp mồi đặc hiệu cho kích thước của các sản phẩm PCR trên gel agarose 1,5% đều cho hình ảnh rõ nét. Kết quả đã xác định được 71 trường hợp thiếu enzyme G6PD chiếm tỷ lệ 55,9% và trong đó tìm thấy 63 trường hợp có đột biến gen

chiếm 88,73%. Tỷ lệ phát hiện đột biến gen của các thành viên trong gia đình bệnh nhân thấp hơn so với tỷ lệ phát hiện ở mục tiêu 1 là: 97,15% khi làm trên các đối tượng là bệnh nhi. So sánh tỷ lệ này với với nghiên cứu của tác giả Nguyễn Thị Huệ khi nghiên cứu ở người Việt Nam với tỷ lệ 89,7% nhưng vì nghiên cứu đó được thực hiện trên cỡ mẫu 30 bệnh nhân<sup>16</sup>.

Phân tích theo các dạng đột biến cho thấy, từ 13 dạng đột biến được xác định tại mục tiêu 1, chúng tôi đã lấy được 12 loại đột biến khác nhau. Sở dĩ chúng tôi chọn theo tỷ lệ trên là căn cứ vào tỷ lệ các đột biến mà nghiên cứu đã phát hiện từ mục tiêu 1, trong đó 12/13 đột biến được lựa chọn lấy theo gia đình, duy nhất dạng đột biến G6PD Taiwan2 (c.1330G>A) không được xuất hiện ở mục tiêu 2 này là do đột biến này được chúng tôi tìm thấy ở 1 gia đình có người mẹ đơn thân nhưng hiện tại đang sinh sống tại Đài Loan nên chúng tôi không thể lấy được mẫu (theo bảng 2.1). Cụ thể dạng đột biến từ cao đến thấp căn cứ trên tỷ lệ phát hiện các đột biến tại mục tiêu 1: Nhiều nhất là dạng biến thể G6PD Viangchan 5 gia đình chiếm 20%, sau đó đến G6PD Canton và Kaiping mỗi loại 4 gia đình (16%), G6PD Union với 3 gia đình (12%), đột biến G6PD Gaohe có 2 gia đình (8%). Cuối cùng, 7 dạng đột biến còn lại đều từ 7 gia đình, mỗi gia đình/1 đột biến (4%): đột biến G6PD Orissa ở exon 2, có 4 loại đột biến là G6PD Quing Yan, Valladoid, NanKang, Địa Trung Hải đều ở exon 2 và G6PD Chinese 5 trên exon 6.

Phân tích về đặc điểm nồng độ enzyme và kiểu di truyền gen G6PD trong các gia đình bệnh nhân nhìn vào bảng 3.12 cho thấy hoạt độ trung bình của các gia đình là  $93,5 \pm 65,8 \text{ UI}/10^{12} \text{ HC}$  giá trị lớn nhất là  $188 \text{ UI}/10^{12} \text{ HC}$  và nhỏ nhất là  $1 \text{ UI}/10^{12} \text{ HC}$ . Giá trị này cao hơn so với giá trị trung bình của nhóm các bệnh nhân thuộc mục tiêu 1 ( $\bar{X} \pm \text{SD}$ :  $41,3 \pm 35,9 \text{ UI}/10^{12} \text{ HC}$ ; min-max: 0-186,1) với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ . Điều này hoàn toàn phù hợp do trong nhóm này chỉ có 25 trường hợp là bệnh nhân nhi được xác định khi đến khám tại bệnh viện Nhi Trung Ương còn lại đều là các trường hợp người mang gen bệnh nên nồng độ enzyme cao hơn.

12 loại đột biến được nghiên cứu trong các gia đình, trường hợp nồng độ enzyme thấp nhất là thuộc gia đình bệnh nhi của đột biến G6PD Chinese-5 với nồng

độ enzyme  $1 \text{ UI}/10^{12} \text{ HC}$ , được xếp vào phân loại lớp III. Điều này cũng giống như 1 trường hợp ở mục tiêu 1, bệnh nhi có nồng độ enzyme thấp nhất của lớp 3 cũng thuộc đột biến Chinese-5. Nhưng rất tiếc 2 trường hợp này không nằm trong cùng 1 gia đình. Điều này một lần nữa cho thấy sự phân loại lớp theo hoạt độ enzyme cho đến nay không có sự chính xác, đồng thời sự di truyền của thiếu hụt về nồng độ enzyme là không giống nhau giữa các thế hệ. Ngoài ra 11 dạng đột biến còn lại thì nồng độ enzyme thấp nhất đều thuộc các bệnh nhi nằm trong mục tiêu 1. Nồng độ enzyme cao nhất, thuộc về 1 người bố của gia đình bệnh nhi có đột biến G6PD Gaohe với nồng độ  $188 \text{ UI}/10^{12} \text{ HC}$ . Nhưng khi phân tích đột biến thì không thấy đột biến xuất hiện ở người bố này mà sự di truyền đột biến của gia đình này là từ người mẹ và bà ngoại. Và người vừa có nồng độ enzyme cao vừa xuất hiện đột biến thuộc về người mẹ với đột biến G6PD Kaiping có nồng độ  $180,2 \text{ UI}/10^{12} \text{ HC}$ . Nồng độ enzyme của gia đình này cũng không có sự giống nhau về nồng độ enzyme của 3 thế hệ. Điều này một lần nữa khẳng định, mặc dù bệnh di truyền trên NST X theo phả hệ nhưng nồng độ enzyme thì không giống nhau.

Ngoài ra chúng tôi cũng tiến hành phân tích 8 trường hợp khác mà có nồng độ enzyme G6PD có nồng độ enzyme dưới  $200 \text{ UI}/10^{12} \text{ HC}$ , được coi là thiếu G6PD thuộc 5 người bố, 2 bà ngoại, 1 ông nội mà không có đột biến, thì thấy 8 người này với các nồng độ enzyme đều nằm trong thiếu mức độ enzyme nhẹ, tương ứng từ cao đến thấp như sau: 188, 182,8, 167,7, 167, 165, 165,1, 136,5 và  $123,6 \text{ UI}/10^{12} \text{ HC}$ . Bên cạnh đó có 1 trường hợp người mẹ của gia đình G6PD Canton mẹ có nồng độ G6PD  $298,1 \text{ UI}/10^{12} \text{ HC}$  nhưng khi phân tích gen lại thấy đột biến. Điều này cho thấy rằng xét nghiệm Sinh học phân tử hiện nay có ý nghĩa đặc hiệu trong xác định đột biến và dạng đột biến của bệnh thiếu G6PD này và các bệnh di truyền khác.

Phân tích sự di truyền các đột biến theo kiểu gen qua bảng 3.12 chúng tôi nhận thấy, trong 25 gia đình, bao gồm 63 trường hợp với 12 loại đột biến thì 45 trường hợp là nữ với 43 dị hợp tử (Hetezygous: 68,23%) và 2 đồng hợp (Homozygous: 3,17%). Trong 43 nữ dị hợp tử (Hetezygous) bao gồm 7 chị em, 22 mẹ và 14 bà ngoại. Các dạng đột biến gen này rải đều ở gần hết 12 loại đột biến. Có 2 nữ đồng hợp tử (Homozygous) là 2 người mẹ thuộc 1 gia đình có đột biến G6PD Chinese-5 và 1 gia đình có đột biến G6PD Union. Hai người mẹ này đều được di truyền từ bố

mẹ của mình. 18 nam đều là dạng dị hợp tử (Hemizygous: 28,6%), bao gồm 5 anh em, duy nhất 1 bố và 12 ông nội, ngoại. Tỷ lệ này cũng tương đồng với các tỷ lệ về các dạng đột biến gen chúng tôi đã phát hiện từ mục tiêu 1. Cụ thể thể hệ III ngoài nhóm 25 bệnh nhân thì có 11 anh chị em trong đó không phát hiện trường hợp đồng hợp tử nào, tất cả đều là dị hợp tử với 5 nam và 7 nữ. Ở thể hệ bố mẹ với 25 trường hợp có duy nhất 1 trường hợp bố dị hợp tử do di truyền từ bà nội thuộc 1 gia đình đột biến G6PD Viangchan, tuy nhiên người bà này đã mất năm 2017 được người nhà nói nhiều lần đi bệnh viện được bác sĩ chẩn đoán có bệnh thiếu enzyme G6PD và qua nghiên cứu thấy mô hình di truyền này hoàn toàn hợp lý. 24 trường hợp là mẹ trong đó 22 trường hợp là dị hợp tử và 2 trường hợp mẹ đồng hợp tử. 22 trường hợp mẹ dị hợp tử gặp ở 11/12 dạng đột biến tại các gia đình, duy chỉ không gặp loại G6PD Chinese 5, các trường hợp này đều được di truyền bởi 1 NST từ ông ngoại hoặc bà ngoại. Hai trường hợp đồng hợp tử là 01 dạng G6PD Chinese 5 và 01 là dạng G6PD Union được di truyền từ cả hai ông bà ngoại. Chính vì sự di truyền trên mà thể hệ ông bà với 26 trường hợp đều là dị hợp tử có 12 là ông ngoại và 14 bà ngoại.

Về đặc điểm di truyền trong nghiên cứu này đã được tóm tắt các kết quả qua bảng 3.13 cho thấy rất phù hợp với đặc thù di truyền bệnh trên gen lặn của NST giới tính X nên thường nam giới bị bệnh khi mang 1 gen gây bệnh, nữ giới bị bệnh khi ở thể đồng hợp tử, còn nữ dạng dị hợp tử là người mang gen bệnh. Và sự di truyền cũng không phụ thuộc vào loại đột biến, phần lớn là hiện tượng bà ngoại mang gen bệnh (12 gia đình chiếm 48%) hoặc ông ngoại (10 gia đình chiếm 40%) di truyền lại cho người mẹ và người mẹ lại truyền bệnh cho các con của mình. Duy nhất có 1 gia đình (gia đình có đột biến dạng Viangchan) là bà nội truyền gen cho bố, sau đó bố truyền lại cho cả con trai và con gái. Ngoài ra còn 2 gia đình cả ông bà nội ngoại di truyền cho mẹ đồng hợp tử. Sự di truyền của bệnh cơ bản đã được khẳng định và tuân theo quy luật. Tại Việt Nam nghiên cứu về hiện tượng di truyền này cũng được tác giả Trần Thị Chính và cộng sự nói đến trong đề tài cấp Bộ tuy rằng số lượng mẫu tương đối nhỏ với kết quả 8 cặp mẹ con cũng đều cho kết quả các con cùng dạng đột biến với mẹ và 3 gia đình cả bố mẹ và con cùng một dạng đột biến, các con gái của họ đều nguy cơ thiếu G6PD đồng hợp tử khi nhận cả hai gen của bố mẹ<sup>15</sup>. Điều này một lần nữa cho thấy cùng với sự phát triển của khoa học công nghệ,

việc thực hiện sàng lọc trước sinh và thực hiện chẩn đoán sớm ở trẻ em bằng các kỹ thuật sinh học phân tử và các kỹ thuật hiện đại là rất cần thiết để kịp thời chẩn đoán bệnh đặc biệt các trường hợp nữ dị hợp tử với hiệu ứng khảm chi có mỗi nhiễm sắc thể X có hoạt động enzyme nằm trong giới hạn bình thường.

## KẾT LUẬN

Nghiên cứu phát hiện đột biến gen G6PD trên bệnh nhân thiếu enzyme G6PD, chúng tôi rút ra được kết luận sau:

### **1. Xác định các dạng đột biến gen trên bệnh nhân thiếu enzyme thuộc một số dân tộc miền Bắc Việt Nam**

- Xác định 339/350 trường hợp thiếu hụt enzyme G6PD mang đột biến trên 13 exon của gen G6PD.

- Xác định được 14 đột biến của gen G6PD, đều là các đột biến điểm: 9 loại lớp II (82,7%) và 5 loại lớp III (17,3%), không có lớp I, IV; Bao gồm các dạng: G6PD Viangchan (24,43%), G6PD Kaipping (20,74%), G6PD Canton (17,9%) và G6PD Union (14,77%), G6PD Gaohe (7,39%), G6PD Chinese-5 (4,26%), G6PD Quing Yan (3,69%), G6PD Orissa (1,14%), G6PD Valladolid (0,57%), G6PD NanKang, G6PD Địa Trung Hải, G6PD Comibra Shunde và G6PD Taiwan2 đều chiếm 0,29%; 89 trường hợp (25,43%) dạng đột biến đa hình Silent và dưới dạng kết hợp với các đột biến khác; 1 trường hợp có đồng thời 2 đột biến G6PD Canton và Kaipping. Có 5 loại lần đầu tiên xuất hiện tại Việt Nam là G6PD Orissa, G6PD Valladolid, G6PD NanKang, G6PD Comibra Shunde và G6PD Taiwan2.

### **2. Phân tích đột biến gen G6PD ở một số gia đình bệnh nhi**

Từ 25 gia đình của 25 bệnh nhi, với 127 người phát hiện:

- 71/127 trường hợp có thiếu enzyme (88,7%) và 63/71 trường hợp có đột biến gen ở cả 3 thế hệ (88,73%) với 12 dạng đột biến (G6PD Viangchan, Kaipping, Canton, Union, Gaohe, Chinese-5, Quing Yan, Orissa, Valladolid, NanKang, Địa Trung Hải, Taiwan2, Comibra Shunde).

- 18 nam giới mang 1 alen (hemizygous), 43 nữ dị hợp tử (heterozygous) và 2 nữ đồng hợp tử (homozygous).

- 12/25 gia đình di truyền bệnh từ bà ngoại cho con gái, 10/25 gia đình ông ngoại cho con gái, 02 gia đình cả ông bà ngoại cho con gái và 1/25 bà nội truyền cho bố. Sự di truyền các dạng đột biến của gen G6PD tuân theo quy luật di truyền của Mendel.



## KIẾN NGHỊ

Bệnh thiếu enzyme G6PD thường khó được phát hiện vì hầu hết chỉ gây triệu chứng lâm sàng khi tiếp xúc các nguy cơ gây tan máu. Rất nhiều triệu chứng của bệnh gây nên những chẩn đoán khác nhau. Chẩn đoán được chính xác nguyên nhân gây tan máu do thiếu enzyme, góp phần vào chẩn đoán sớm, dự phòng giúp giảm kinh phí điều trị cho gia đình người bệnh cũng như gánh nặng của xã hội. Do đó chúng tôi xin có một số kiến nghị như sau:

1. Thiết lập và quản lý cơ sở dữ liệu về đột biến gen G6PD ở bệnh nhân thiếu enzyme này.
2. Thiết lập và quản lý cơ sở dữ liệu về người mang gen bệnh thiếu enzyme G6PD.
3. Tư vấn di truyền trước hôn nhân và chẩn đoán trước sinh cho những bà mẹ có nguy cơ sinh con bị bệnh trong quá trình mang thai.

**DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU ĐÃ CÔNG BỐ  
LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. Ngo Thi Thao, Tran Huy Thinh, Ta Thanh Dat et al. Molecular Characterization and Genotype-Phenotype Correlation of G6PD Mutations in Five Ethnicities of Northern Vietnam. *Hindawi Anemia*, Volume 2022, Article ID 2653089, <https://doi.org/10.1155/2022/2653089>
2. Trần Huy Thịnh, Ngô Thị Thảo, Trần Văn Khánh. Phát hiện các đột biến trên gen G6PD ở bệnh nhân dân tộc Thái thiếu hụt enzyme G6PD, *Tạp chí Nghiên cứu y học- Trường ĐHYHN- 2022. số 7, tập 155: 8-13*
3. Ngô Thị Thảo, Trần Văn Khánh. Nghiên cứu đột biến gen G6PD ở bệnh nhân thiếu hụt enzyme G6PD. *Tạp chí Sinh lý học Việt Nam*, số 2- tháng 6/2021, tập 25: 55-66.
4. Ngô Thị Thảo, Trần Văn Khánh. Nghiên cứu đột biến gen thiếu enzyme G6PD của một số gia đình miền Bắc Việt Nam. *Tạp chí Y học Việt Nam*, Tháng 11- Số đặc biệt năm 2020, tập 496: 762-770.
5. Ngô Thị Thảo, Trần Văn Khánh. Nghiên cứu một số đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và đột biến gen của trẻ thiếu hụt G6PD đến khám tại viện Nhi trung ương. *Tạp chí Y học Việt Nam/ Tháng 5- Số đặc biệt năm 2018, tập 467: 601-608.*

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. RC S. Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival. *IUBMB Life*. 2012;64(5):362-369.
2. Luzzatto L, Nannelli C, Notaro R. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2016;30(2):373-393.
3. Luzzatto L, Seneca E. G6PD deficiency: a classic example of pharmacogenetics with on-going clinical implications. *British journal of haematology*. 2014;164(4):469-480.
4. Kim S, Nguon C, Guillard B, et al. Performance of the CareStart™ G6PD deficiency screening test, a point-of-care diagnostic for primaquine therapy screening. *PloS one*. 2011;6(12):e28357.
5. Lippi G, Mattiuzzi C. Updated Worldwide Epidemiology of Inherited Erythrocyte Disorders. *Acta haematologica*. 2020;143(3):196-203.
6. Nkhoma ET, Poole C, Vannappagari V, Hall SA, Beutler E. The global prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a systematic review and meta-analysis. *Blood cells, molecules & diseases*. 2009;42(3):267-278.
7. Cappellini MD, Fiorelli G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet (London, England)*. 2008;371(9606):64-74.
8. WHO. Revision of WHO classification of G6PD variants and International classification of diseases (ICD)-11. *Malaria Policy Advisory Committee Meeting 2–4 October 2019, Geneva, Switzerland Background document for Session 7*. 2019.
9. Minucci A, Moradkhani K, Hwang MJ, Zuppi C, Giardina B, Capoluongo E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations database: review of the "old" and update of the new mutations. *Blood cells, molecules & diseases*. 2012;48(3):154-165.

10. Bancone G, Menard D, Khim N, et al. Molecular characterization and mapping of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations in the Greater Mekong Subregion. *Malaria journal*. 2019;18(1):20.
11. DelFavero JJ, Jnah AJ, Newberry D. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency and the Benefits of Early Screening. *Neonatal network : NN*. 2020;39(5):270-282.
12. Iwai K, Hirono A, Matsuoka H, et al. Distribution of glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations in Southeast Asia. *Hum Genet*. 2001;108(6):445-449.
13. Huỳnh Văn Quốc Vũ, Trần Ngọc Dung và CS. Tỷ lệ thiếu men G6PD và các yếu tố liên quan ở trẻ sơ sinh sinh tại Bệnh viện Phụ Sản Thành Phố Cần Thơ. *Tạp chí y học Việt Nam*. 2022;516 (1):31-35.
14. Ngô Thị Bình Minh, Phạm Thanh Long và CS. Nghiên cứu khảo sát tỉ lệ bất thường của xét nghiệm sàng lọc sơ sinh tại Bệnh viện Đại học y dược thành phố Hồ Chí Minh. *Tạp chí y học thành phố Hồ Chí Minh*. 2021;25(2):157-162.
15. Trần Thị Chính, Nguyễn Thị Ngọc Dao. Phát hiện thiếu hụt G6PD và phân tích các dạng đột biến của nó ở một số trường hợp thuộc các dân tộc Kinh, Mường, Raclei và Tày ở Hà Nội, Hòa Bình, Khánh Hòa. *Tạp chí nghiên cứu y học* 2003;23 (3):99-104.
16. Nguyen Thi Hue, Dang Thi Lan Anh and et al. Common mutations in G6PD of Vietnamese-Kinh deficiency patients. *American Journal of biotechnology*. 2013;12(12): p. 1318-1325.
17. Nguyen Thi Hue, Charlieu JP, Chau TT, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations and haemoglobinuria syndrome in the Vietnamese population. *Malaria journal*. 2009;8:152.
18. Nguyen Minh Hung, Matsuoka H, Eto H, et al. Glucose6Phosphate Dehydrogenase (G6PD) Variants in Three Minority Ethnic Groups in Central and Northern Vietnam. *Tropical Medicine and Health*. 2009;37:17-20.

19. Beutler E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a historical perspective. *Blood*. 2008;111(1):16-24.
20. Luzzatto L, Arese P. Favism and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *The New England journal of medicine*. 2018;378(1):60-71.
21. Au SW GS, Lam VM, Adams MJ. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP<sup>+</sup> molecule and provides insights into enzyme deficiency. *Structure*. 2000;8(3):293-303.
22. McNicholas S, Potterton E, Wilson KS, Noble ME. Presenting your structures: the CCP4mg molecular-graphics software. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2011;67(Pt 4):386-394.
23. Nguyễn Thị Thu Phương, Ngô Thị Quỳnh Mai. Mô tả đặc điểm thiếu máu của bệnh nhân thiếu hụt G6PD tại bệnh viện đa khoa Quốc tế Hải Phòng. *Tạp chí y học Việt Nam*. 2022;tháng 1, 2022(2):244-247.
24. Kotaka M, Gover S, Vandeputte-Rutten L, Au SW, Lam VM, Adams MJ. Structural studies of glucose-6-phosphate and NADP<sup>+</sup> binding to human glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2005;61(Pt 5):495-504.
25. Gómez-Manzo Sl, Marcial-Quino J, Ortega-Cuellar D, et al. Functional and Biochemical Analysis of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) Variants: Elucidating the Molecular Basis of G6PD Deficiency. *Catalysts MDPI Publishing*. 2017;7(5):135.
26. Fernando J, Bonilla MD, M.SC., Magda Carolina Sanchez LQ, Lilian Chuairre MS. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD). Response of the human erythrocyte and another cells to the decrease in their activity. *Colombia Medica*. 2007;38(1).
27. JE F. Diagnosis and management of G6PD deficiency. *Am Fam Physician*. 2005;72(7):1277-1282.
28. Allahverdiyev A.M. BM, Elcicek S., Koc R.C., Ates S.C., Baydar S.Y., Yaman S., Abamor E.S. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency and Malaria: A Method to Detect Primaquine-Induced Hemolysis In Vitro. In: *Canuto RA, editor Biochemistry, Genetics and Molecular Biology In Tech; Rijeka, Croatia*. 2012.

29. Bancone G, Chu CS. G6PD Variants and Haemolytic Sensitivity to Primaquine and Other Drugs. *Frontiers in Pharmacology*. 2021;12(283).
30. Lai YK, Lai NM, Lee SW. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and risk of diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Annals of hematology*. 2017;96(5):839-845.
31. Belfield KD, Tichy EM. Review and drug therapy implications of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists*. 2018;75(3):97-104.
32. Ravikumar N, Greenfield G. Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Deficiency: A Review. *Int J Med Students*. 2020;8(3):281-287.
33. Cunningham AD, Hwang S, Mochly-Rosen D. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency and the Need for a Novel Treatment to Prevent Kernicterus. *Clinics in perinatology*. 2016;43(2):341-354.
34. Beutler E. G6PD deficiency. *Blood*. 1994;84(11):3613-3636.
35. Roper D, Layton M, Rees D, et al. Laboratory diagnosis of G6PD deficiency. A British Society for Haematology Guideline. *The British Society for Haematology*. 2020;189(1):24-39.
36. Sirdah M, Reading NS, Vankayalapati H, et al. Molecular heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Gaza Strip Palestinians. *Blood cells, molecules & diseases*. 2012;49(3-4):152-158.
37. Al-Azzam SI, Al-Ajlony MJ, Al-Khateeb T, Alzoubi KH, Mhaidat N, Ayoub A. An audit of the precipitating factors for haemolytic crisis among glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient paediatric patients. *Journal of medical screening*. 2009;16(4):167-169.
38. Lee SW, Chaiyakunapruk N, Lai NM. What G6PD-deficient individuals should really avoid. *British journal of clinical pharmacology*. 2017;83(1):211-212.

39. Peters AL, Van Noorden CJ. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria: cytochemical detection of heterozygous G6PD deficiency in women. *J Histochem Cytochem.* 2009;57(11):1003-1011.
40. Onori ME, Ricciardi Tenore C, Urbani A, Minucci A. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and hydroxychloroquine in the COVID-19 era: a mini review. *Molecular biology reports.* 2021;48(3):2973-2978.
41. Quinn J, Gerber B, Fouche R, Kenyon K, Blom Z, Muthukanagaraj P. Effect of High-Dose Vitamin C Infusion in a Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase-Deficient Patient. *Case reports in medicine.* 2017;2017:5202606.
42. Miri-Aliabad G, Khajeh A, Shahraki T. Prevalence of G6PD deficiency in Children with Hepatitis A. *International journal of hematology-oncology and stem cell research.* 2017;11(2):92-95.
43. Moiz B, Ali SA. Fulminant hemolysis in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Clinical case reports.* 2018;6(1):224-225.
44. Mason PJ, Bautista JM, Gilsanz F. G6PD deficiency: the genotype-phenotype association. *Blood reviews.* 2007;21(5):267-283.
45. Rees DC, Lambert C, Cooper E, et al. Glucose 6 phosphate dehydrogenase deficiency is not associated with cerebrovascular disease in children with sickle cell anemia. *Blood.* 2009;114(3):742-743; author reply 743-744.
46. Fasola FA, Fowodu FO, Shokunbi WA, Kotila TR. The effect of the coinheritance of Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency on the severity of sickle cell disease. *The Nigerian postgraduate medical journal.* 2019;26(2):118-122.
47. Chiu DT, Zuo L, Chao L, et al. Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency in patients of Chinese descent and identification of new base substitutions in the human G6PD gene. *Blood.* 1993;81(8):2150-2154.
48. Group RoaWS. Standardization of procedures for the study of glucose-6-phosphate dehydrogenase. . *World Health Organization technical report series.* 1967;366:1-53.

49. Vives-Corrons JL, Kuhl W, Pujades MA, Beutler E. Molecular genetics of the glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) Mediterranean variant and description of a new G6PD mutant, G6PD Andalus1361A. *American journal of human genetics*. 1990;47(3):575-579.
50. Satyagraha AW, Sadhewa A, Baramuli V, et al. G6PD deficiency at Sumba in Eastern Indonesia is prevalent, diverse and severe: implications for primaquine therapy against relapsing Vivax malaria. *PLoS neglected tropical diseases*. 2015;9(3):e0003602.
51. Boonyuen U, Chamchoy K, Swangsri T, Saralamba N, Day NP, Imwong M. Detailed functional analysis of two clinical glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) variants, G6PDViangchan and G6PDViangchan+Mahidol: Decreased stability and catalytic efficiency contribute to the clinical phenotype. *Mol Genet Metab*. 2016;118(2):84-91.
52. Howes RE, Piel FB, Patil AP, et al. G6PD deficiency prevalence and estimates of affected populations in malaria endemic countries: a geostatistical model-based map. *PLoS Med*. 2012;9(11):e1001339.
53. Zheng Y, Wang J, Liang X, et al. Epidemiology, evolutionary origin, and malaria-induced positive selection effects of G6PD-deficient alleles in Chinese populations. *Molecular genetics & genomic medicine*. 2020;8(12):e1540.
54. Bancone G, Gornsawun G, Chu CS, et al. Validation of the quantitative point-of-care CareStart biosensor for assessment of G6PD activity in venous blood. *PloS one*. 2018;13(5):e0196716.
55. Bancone G, Kalnoky M, Chu CS, et al. The G6PD flow-cytometric assay is a reliable tool for diagnosis of G6PD deficiency in women and anaemic subjects. *Scientific reports*. 2017;7(1):9822.
56. Anderle A, Bancone G, Domingo GJ, Gerth-Guyette E, Pal S, Satyagraha AW. Point-of-Care Testing for G6PD Deficiency: Opportunities for Screening. *International journal of neonatal screening*. 2018;4(4):34.



57. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *National Organization for Rare Disease (NORD)*. 2019. <https://rarediseases.org/rare-diseases/glucose-6-phosphate-dehydrogenase-deficiency>.
58. Baird JK. 8-Aminoquinoline Therapy for Latent Malaria. *Clinical microbiology reviews*. 2019;32(4).
59. Harcke SJ, Rizzolo D, Harcke HT. G6PD deficiency: An update. *JAAPA : official journal of the American Academy of Physician Assistants*. 2019;32(11):21-26.
60. Richardson SR, O'Malley GF. Glucose 6 Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.; 2021.
61. Yoshida A, Beutler E, Motulsky AG. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase variants. *Bulletin of the World Health Organization*. 1971;45(2):243-253.
62. Relling MV, McDonagh EM, Chang T, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guidelines for Rasburicase Therapy in the context of G6PD Deficiency Genotype. *Supplemental Material* 2014.
63. WHO. Point-of-care G6PD testing to support safe use of primaquine for the treatment of vivax malaria. *WHO Evidence Review Group meeting report 8–9 October 2014 Geneva: World Health Organization*. 2014.
64. Lacerda MVG, Llanos-Cuentas A, Krudsood S, et al. Single-Dose Tafenoquine to Prevent Relapse of Plasmodium vivax Malaria. *The New England journal of medicine*. 2019;380(3):215-228.
65. Gómez-Manzo S, Marcial-Quino J, Vanoye-Carlo A, et al. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase: Update and Analysis of New Mutations around the World. *Int J Mol Sci*. 2016;17(12).
66. Liu Z, Yu C, Li Q, et al. Chinese newborn screening for the incidence of G6PD deficiency and variant of G6PD gene from 2013 to 2017. *Human mutation*. 2020;41(1):212-221.

67. Nguyễn Chung Viêng, Nguyễn Văn Dũng và CS. Khảo sát tỉ lệ và một số yếu tố liên quan đến thiếu men G6PD đối với trẻ sơ sinh thực hiện sàng lọc tại bệnh viện phụ sản thành phố Cần Thơ giai đoạn 2017-2022. *Đề tài cấp cơ sở, bệnh viện Phụ sản thành phố Cần Thơ*. 2021.
68. Padilla CD, Therrell BL. Newborn screening in the Asia Pacific region. *Journal of inherited metabolic disease*. 2007;30(4):490-506.
69. Espino FE, Bibit JA, Sornillo JB, Tan A, von Seidlein L, Ley B. Comparison of Three Screening Test Kits for G6PD Enzyme Deficiency: Implications for Its Use in the Radical Cure of Vivax Malaria in Remote and Resource-Poor Areas in the Philippines. *PloS one*. 2016;11(2):e0148172.
70. Henriques G, Phommasone K, Tripura R, et al. Comparison of glucose-6 phosphate dehydrogenase status by fluorescent spot test and rapid diagnostic test in Lao PDR and Cambodia. *Malaria journal*. 2018;17(1):243.
71. Itoh S, Okada H, Kuboi T, Kusaka T. Phototherapy for neonatal hyperbilirubinemia. *Pediatrics international : official journal of the Japan Pediatric Society*. 2017;59(9):959-966.
72. Raub AG, Hwang S, Horikoshi N, et al. Small-Molecule Activators of Glucose-6-phosphate Dehydrogenase (G6PD) Bridging the Dimer Interface. *ChemMedChem*. 2019;14(14):1321-1324.
73. Domingo GJ, Advani N, Satyagraha AW, et al. Addressing the gender-knowledge gap in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: challenges and opportunities. *International health*. 2019;11(1):7-14.
74. G6PD deficiency. *National Organization for Rare Disorders (NORD)*. 2021. <https://rarediseases.org/rare-diseases/glucose-6-phosphate-dehydrogenase-deficiency>.
75. Maciag M, Plochocka D, Jablonska-Skwiecinska E, et al. Molecular analysis of three novel G6PD variants: G6PD Pedoplis-Ckaro, G6PD Piotrkow and G6PD Krakow. *Acta Biochim Pol*. 2007;54(4):877-881.

76. Longo L, Vanegas OC, Patel M, et al. Maternally transmitted severe glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency is an embryonic lethal. *The EMBO journal*. 2002;21(16):4229-4239.
77. Tong Y, Liu B, Zheng H, et al. A novel G6PD deleterious variant identified in three families with severe glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *BMC medical genetics*. 2020;21(1):150.
78. Howes RE, Dewi M, Piel FB, et al. Spatial distribution of G6PD deficiency variants across malaria-endemic regions. *Malaria journal*. 2013;12:418.
79. Vulliamy TJ, Kaeda JS, Ait-Chafa D, et al. Clinical and haematological consequences of recurrent G6PD mutations and a single new mutation causing chronic nonspherocytic haemolytic anaemia. *British journal of haematology*. 1998;101(4):670-675.
80. Tạ Thành Văn. PCR và một số kỹ thuật y sinh học phân tử. *Nhà xuất bản y học*. 2010;48(3) 154 -165.
81. Collaborators GMAcOD. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*. 2015;385:117–171.
82. Zúñiga M, Mejía RE, Sánchez AL, Sosa-Ochoa WH, Fontecha GA. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency among malaria patients of Honduras: a descriptive study of archival blood samples. *Malaria journal*. 2015;14:308.
83. Vizzi E, Bastidas G, Hidalgo M, Colman L, Pérez HA. Prevalence and molecular characterization of G6PD deficiency in two Plasmodium vivax endemic areas in Venezuela: predominance of the African A-(202A/376G) variant. *Malaria journal*. 2016;15:19.
84. Powers JL, Best DH, Grenache DG. Genotype-Phenotype Correlations of Glucose-6-Phosphate-Deficient Variants Throughout an Activity Distribution. *The journal of applied laboratory medicine*. 2018;2(6):841-850.

85. Yoshida A. Amino acid substitution (histidine to tyrosine) in a glucose-6-phosphate dehydrogenase variant (G6PD Hektoen) associated with overproduction. *J Mol Biol.* 1970;52(3):483-490.
86. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. WHO Working Group. *Bulletin of the World Health Organization.* 1989;67(6):601-611.
87. Verlé P, Nhan DH, Tinh TT, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in northern Vietnam. *Trop Med Int Health.* 2000;5(3):203-206.
88. Huỳnh Thị Diễm Thúy. Phát hiện thiếu hụt enzym G6PD và các dạng đột biến gen của nó ở một số trường hợp trẻ sơ sinh người Kinh sinh tại Hà Nội. *Luận văn Thạc sĩ Y học Đại học Y Hà Nội.* 2004.
89. Dang Thi Lan Anh, Nguyen Thi Cam Huong, et al. An Optimized HRM method for diagnosis of G6PD deficiency in Kinh Vietnamese via Viangchan mutation. *Journal of Biotechnology.* 2016;14(4):589-598.
90. Matsuoka H, Thuan DT, et al. Seven different glucose-6-phosphate dehydrogenase variants including a new variant distributed in Lam Dong Province in southern Vietnam. *Acta medica Okayama.* 2007;61(4):213-219.
91. Matsuoka H, Pham Minh Hung, et al. Further Molecular Analysis of G6PD Deficiency Variants in Southern Vietnam and a Novel Variant Designated as G6PD Ho Chi Minh (173 A>G; 58 Asp>Gly): Frequency Distributions of Variants Compared with Those in Other Southeast Asian Countries. *Acta medica Okayama.* 2017;71(4):325-332.
92. Khoa hoá sinh, Bệnh viện Nhi Trung ương. Quy trình định lượng enzyme G6PD trên máy hóa sinh tự động Beckman Coulter AU5800 theo chuẩn ISO 15189: 2012. 2017.
93. Bancone G, Gilder ME, Chowwiwat N, et al. Prevalences of inherited red blood cell disorders in pregnant women of different ethnicities living along the Thailand-Myanmar border. *Wellcome open research.* 2017;2:72.

94. Chu CS, Bancone G, Nosten F, White NJ, Luzzatto L. Primaquine-induced haemolysis in females heterozygous for G6PD deficiency. *Malaria journal*. 2018;17(1):101.
95. Đinh Thị My . Xác định tỷ lệ thiếu hụt G6PD và nghiên cứu một số đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng của trẻ sơ sinh bệnh lý có xét nghiệm thiếu G6PD tại khoa sơ sinh Bệnh viện Nhi Trung Ương. *Luận văn Thạc sĩ Y học Đại học Y Hà nội*. 2008.
96. Huỳnh Văn Quốc Vũ, Trần Ngọc Dung và CS. Tỷ lệ thiếu G6PD và một số yếu tố liên quan đến trẻ sơ sinh tại bệnh viện Phụ sản thành phố Cần Thơ năm 2021-2022. *Tạp chí y học Việt Nam*. 2022;516 (1) tháng 7, 2022:31-35.
97. Peng Q, Li S, Ma K, et al. Large cohort screening of G6PD deficiency and the mutational spectrum in the Dongguan District in Southern China. *PloS one*. 2015;10(3):e0120683.
98. Zhong Z, Wu H, Li B, et al. Analysis of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Genetic Polymorphism in the Hakka Population in Southern China. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2018;24:7316-7321.
99. Boonyawat B, Phetthong T, Suksumek N, Traivaree C. Genotype-Phenotype Correlation of G6PD Mutations among Central Thai Children with G6PD Deficiency. *Anemia*. 2021;2021:6680925.
100. Kotepui M, Uthaisar K, PhunPhuech B, Phiwklam N. Prevalence and hematological indicators of G6PD deficiency in malaria-infected patients. *Infectious diseases of poverty*. 2016;5:36.
101. Lee J, Kim TI, Kang JM, et al. Prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency among malaria patients in Upper Myanmar. *BMC infectious diseases*. 2018;18(1):131.
102. Sathupak S, Leechaoenkiat K, Kampuansai J. Prevalence and molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the Lue ethnic group of northern Thailand. *Scientific reports*. 2021;11(1):2956.

103. Phạm Thị Hương Trang. Phát hiện đột biến điểm hay gặp ở người thiếu hụt G6PD bằng phương pháp ARMS. *Luận văn Bác sĩ nội trú, Đại học Y Hà Nội*. 2013.
104. Hoàng Thu Trang. Xác định tỷ lệ thiếu G6PD ở trẻ sơ sinh tại một số tỉnh phía Bắc. *Luận văn bác sĩ nội trú, Đại học Y Hà Nội*. 2010.
105. Nguyễn Đức Giang, Vũ Sinh Nam và cs. Phân tích biến thể di truyền thiếu hoạt độ enzyme G6PD bằng kỹ thuật Multiplex với độ phân giải cao tại vùng lưu hành sốt rét của tỉnh Đắk Nông *Tạp chí y học Việt Nam*. 2022;521(1), tháng 12 năm 2022:189-194.
106. Nuchprayoon I, Sanpavat S, Nuchprayoon S. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations in Thailand: G6PD Viangchan (871G>A) is the most common deficiency variant in the Thai population. *Human mutation*. 2002;19(2):185.
107. Ninokata A, Kimura R, Samakkarn U, Settheetham-Ishida W, Ishida T. Coexistence of five G6PD variants indicates ethnic complexity of Phuket islanders, Southern Thailand. *Journal of human genetics*. 2006;51(5):424-428.
108. Matsuoka H, Wang J, Hirai M, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations in Myanmar: G6PD Mahidol (487G>A) is the most common variant in the Myanmar population. *Journal of human genetics*. 2004;49(10):544-547.
109. Nuchprayoon I, Louicharoen C, Charoenvej W. Glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations in Mon and Burmese of southern Myanmar. *Journal of human genetics*. 2008;53(1):48-54.
110. Bệnh viện Nhi Trung Ương. Sổ tay khoảng tham chiếu các giá trị sinh học trẻ em. 2018.
111. Bệnh viện Nhi Trung Ương. Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị Nhi khoa (cập nhật). 2018.
112. Quách Xuân Hinh. Nghiên cứu các chỉ số sinh lý hồng cầu và đột biến gen G6PD hồng cầu ở người bị thiếu hụt G6PD trên một số dân tộc tại Việt Nam. *Luận án tiến sĩ y học, Học viện Quân y*. 2009.

113. KA A-E. Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *Afr J Biotechnol.* 2003;2(5):91-95.
114. Sarkar S, Biswas NK, Dey B, Mukhopadhyay D, Majumder PP. A large, systematic molecular-genetic study of G6PD in Indian populations identifies a new non-synonymous variant and supports recent positive selection. *Infect Genet Evol.* 2010;10(8):1228-1236.
115. Li Q, Yang F, Liu R, et al. Prevalence and Molecular Characterization of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency at the China-Myanmar Border. *PloS one.* 2015;10(7):e0134593.
116. He M, Lin K, Huang Y, et al. Prevalence and Molecular Study of G6PD Deficiency in the Dai and Jingpo Ethnic Groups in the Dehong Prefecture of the Yunnan Province. *Human heredity.* 2018;83(2):55-64.
117. Deng Z, Yang F, Bai Y, et al. Co-inheritance of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency mutations and hemoglobin E in a Kachin population in a malaria-endemic region of Southeast Asia. *PloS one.* 2017;12(5):e0177917.
118. Lin M, Yang LY, Xie DD, et al. G6PD Deficiency and Hemoglobinopathies: Molecular Epidemiological Characteristics and Healthy Effects on Malaria Endemic Bioko Island, Equatorial Guinea. *PloS one.* 2015;10(4):e0123991.
119. Phompradit P, Kuesap J, Chaijaroenkul W, et al. Prevalence and distribution of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) variants in Thai and Burmese populations in malaria endemic areas of Thailand. *Malaria journal.* 2011;10:368.
120. Ren X, He Y, Du C, Jiang W, Chen L, Lin Q. A novel mis-sense mutation (G1381A) in the G6PD gene identified in a Chinese man. *Chin Med J (Engl).* 2001;114(4):399-401.
121. Au WY, Ma ES, Lam VM, Chan JL, Pang A, Kwong YL. Glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency in elderly Chinese women heterozygous for G6PD variants. *Am J Med Genet A.* 2004;129a(2):208-211.

122. Jiang W, Yu G, Liu P, et al. Structure and function of glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient variants in Chinese population. *Hum Genet.* 2006;119(5):463-478.
123. Deng C, Guo CB, Xu YH, Deng B, Yu JL. Three mutations analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in neonates in South-west China. *Pediatrics international : official journal of the Japan Pediatric Society.* 2007;49(4):463-467.
124. He Y, Zhang Y, Chen X, Wang Q, Ling L, Xu Y. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the Han Chinese population: molecular characterization and genotype-phenotype association throughout an activity distribution. *Scientific reports.* 2020;10(1):17106.
125. Yang WC, Tai S, Hsu CL, et al. Reference levels for glucose-6-phosphate dehydrogenase enzyme activity in infants 7-90 days old in Taiwan. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi.* 2020;119(1 Pt 1):69-74.
126. Nguyễn Mạnh Hùng, Trần Thị Huyền Trâm và cs. Tỷ lệ thiếu G6PD và các dạng biến thể C G6PD ở trẻ sơ sinh tại bệnh viện Phụ sản Quốc tế Sài Gòn. *Y học thành phố Hồ chí Minh.* 2015;19(4): .
127. UsaBoonyuen, KamonwanChamchoy, ThitiluckSwangsri, et al. Detailed functional analysis of two clinical glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) variants, G6PDViangchan and G6PDViangchan + Mahidol: Decreased stability and catalytic efficiency contribute to the clinical phenotype. *Molecular Genetics and Metabolism.* 2016;118(2):84-91.
128. Đặng Thị Hồng Xuân Thủy, Huỳnh Hồng Quang và cs. Đánh giá hoạt độ enzyme G6PD tại chỗ bằng bộ cảm biến định lượng CareStart™ tại vùng SRLH Plasmodium vivax huyện Krông Năng, tỉnh Đắk Lắk. *Tạp chí Truyền nhiễm Việt Nam.* 2021;234(2-2021):65-71.
129. Poon MC, Hall K, Scott CW, Prchal JT. G6PD Viangchan: a new glucose 6-phosphate dehydrogenase variant from Laos. *Hum Genet.* 1988;78(1):98-99.



130. Laosombat V, Sattayasevana B, Janejindamai W, et al. Molecular heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) variants in the south of Thailand and identification of a novel variant (G6PD Songklanagarind). *Blood cells, molecules & diseases*. 2005;34(2):191-196.
131. Ong KIC, Iwagami M, Araki H, et al. Prevalence of G6PD Viangchan variant in malaria endemic areas in Lao PDR: an implication for malaria elimination by 2030. *Malaria journal*. 2019;18(1):75.
132. Chiu DT, Zuo L, Chen E, et al. Two commonly occurring nucleotide base substitutions in Chinese G6PD variants. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;180(2):988-993.
133. Bancone G, Chu CS, Somsakchaicharoen R, et al. Characterization of G6PD genotypes and phenotypes on the northwestern Thailand-Myanmar border. *PloS one*. 2014;9(12):e116063.
134. Kumar R, Singh M, Mahapatra S, et al. Fine Mapping of Glucose 6 Phosphate Dehydrogenase (G6PD) Deficiency in a Rural Malaria Area of South West Odisha Using the Clinical, Hematological and Molecular Approach. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*. 2020;12(1):e2020015.
135. Perng LI, Chiou SS, Liu TC, Chang JG. A novel C to T substitution at nucleotide 1360 of cDNA which abolishes a natural Hha I site accounts for a new G6PD deficiency gene in Chinese. *Human molecular genetics*. 1992;1(3):205.
136. Calabrò V, Mason PJ, Filosa S, et al. Genetic heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency revealed by single-strand conformation and sequence analysis. *American journal of human genetics*. 1993;52(3):527-536.
137. Rovira A, Vulliamy TJ, Pujades A, Luzzatto L, Corrons JL. The glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficient variant G6PD Union (454 Arg-->Cys) has a worldwide distribution possibly due to recurrent mutation. *Human molecular genetics*. 1994;3(5):833-835.

138. PATH VP-. G6PD deficiency in Myanmar—a brief on available evidence *Medicines for malaria Venture*. 2021.
139. Sanephonasa A, Cheepsunthorn CL, Khaminsou N, Savongsy O, Nuchprayoon I, Leechoenkiat K. Molecular characterization of G6PD mutations reveals the high frequency of G6PD Aures in the Lao Theung population. *Malaria journal*. 2021;20(1):30.
140. Chao LT, Du CS, Louie E, et al. A to G substitution identified in exon 2 of the G6PD gene among G6PD deficient Chinese. *Nucleic Acids Res*. 1991;19(21):6056.
141. Achoubi N, Asghar M, Wahengbam AKGS, Singh SJ, Saraswathy KN, Murry B. Prevalence and Molecular Characterization of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency among Brahmins and Muslims of Manipur, India. *Indian Journal of Public Health Research & Development*. 2020;11(1):278-282.
142. Sulistyaningrum N, Arlinda D, Hutagalung J, et al. Prevalence of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Variants in Malaria-Endemic Areas of South Central Timor, Eastern Indonesia. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2020;103(2):760-766.
143. Corcoran CM, Calabrò V, Tamagnini G, et al. Molecular heterogeneity underlying the G6PD Mediterranean phenotype. *Hum Genet*. 1992;88(6):688-690.
144. Soemantri AG, Saha S, Saha N, Tay JS. Molecular variants of red cell glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Central Java, Indonesia. *Human heredity*. 1995;45(6):346-350.
145. Aghakhanian F, Yunus Y, Naidu R, et al. Unravelling the genetic history of Negritos and indigenous populations of Southeast Asia. *Genome biology and evolution*. 2015;7(5):1206-1215.
146. Kaeda JS, Chhotray GP, Ranjit MR, et al. A new glucose-6-phosphate dehydrogenase variant, G6PD Orissa (44 Ala-->Gly), is the major polymorphic variant in tribal populations in India. *American journal of human genetics*. 1995;57(6):1335-1341.

147. Arunachalam AK, Sumithra S, Maddali M, et al. Molecular Characterization of G6PD Deficiency: Report of Three Novel G6PD Variants. *Indian journal of hematology & blood transfusion : an official journal of Indian Society of Hematology and Blood Transfusion*. 2020;36(2):349-355.
148. Zarza R, Pujades A, Rovira A, et al. Two new mutations of the glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) gene associated with haemolytic anaemia: clinical, biochemical and molecular relationships. *British journal of haematology*. 1997;98(3):578-582.
149. Yan JB, Xu HP, Xiong C, et al. Rapid and reliable detection of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) gene mutations in Han Chinese using high-resolution melting analysis. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2010;12(3):305-311.
150. Chen HL, Huang MJ, Huang CS, Tang TK. G6PD NanKang (517 T-->C; 173 Phe-->Leu): a new Chinese G6PD variant associated with neonatal jaundice. *Human heredity*. 1996;46(4):201-204.
151. Ainoon O, Boo NY, Yu YH, Cheong SK, Hamidah HN, Lim JH. Complete molecular characterisation of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency in a group of Malaysian Chinese neonates. *Malays J Pathol*. 2004;26(2):89-98.
152. Vulliamy TJ, D'Urso M, Battistuzzi G, et al. Diverse point mutations in the human glucose-6-phosphate dehydrogenase gene cause enzyme deficiency and mild or severe hemolytic anemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85(14):5171-5175.
153. Kurdi-Haidar B, Mason PJ, Berrebi A, et al. Origin and spread of the glucose-6-phosphate dehydrogenase variant (G6PD-Mediterranean) in the Middle East. *American journal of human genetics*. 1990;47(6):1013-1019.
154. Beutler E, Kuhl W. The NT 1311 polymorphism of G6PD: G6PD Mediterranean mutation may have originated independently in Europe and Asia. *American journal of human genetics*. 1990;47(6):1008-1012.

155. Ainoon O, Yu YH, Amir Muhriz AL, Boo NY, Cheong SK, Hamidah NH. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) variants in Malaysian Malays. *Human mutation*. 2003;21(1):101.
156. Chiu YH, Liu YN, Chen HJ, et al. Prediction of functional consequences of the five newly discovered G6PD variations in Taiwan. *Data in brief*. 2019;25:104129.
157. Menziletoglu Yildiz S, Yuzbasioglu Ariyurek S, Tahiroglu M, Aksoy K. Detection of 1311 polymorphism in the glucose-6-phosphate dehydrogenase gene by microarray technique. *Archives of medical science : AMS*. 2011;7(4):586-591.
158. De Vita G, Alcalay M, Sampietro M, Cappelini MD, Fiorelli G, Toniolo D. Two point mutations are responsible for G6PD polymorphism in Sardinia. *American journal of human genetics*. 1989;44(2):233-240.
159. Moiz B, Nasir A, Moatter T, Naqvi ZA, Khurshid M. Population study of 1311 C/T polymorphism of Glucose 6 Phosphate Dehydrogenase gene in Pakistan - an analysis of 715 X-chromosomes. *BMC genetics*. 2009;10:41.
160. Amini F, Ismail E, Zilfalil BA. Prevalence and molecular study of G6PD deficiency in Malaysian Orang Asli. *Intern Med J*. 2011;41(4):351-353.
161. Matsuoka H, Nguon C, Kanbe T, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations in Cambodia: G6PD Viangchan (871G>A) is the most common variant in the Cambodian population. *Journal of human genetics*. 2005;50(9):468-472.
162. Takizawa T, Huang IY, Ikuta T, Yoshida A. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: primary structure and cDNA cloning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1986;83(12):4157-4161.
163. Kawamoto F, Matsuoka H, Kanbe T, et al. Further investigations of glucose-6-phosphate dehydrogenase variants in Flores Island, eastern Indonesia. *Journal of human genetics*. 2006;51(11):952-957.

164. Tantular IS, Kawamoto F. Distribution of G6PD deficiency genotypes among Southeast Asian populations. *Trop Med Health*. 2021;49(1):97.
165. Louicharoen C, Nuchprayoon I. G6PD Viangchan (871G>A) is the most common G6PD-deficient variant in the Cambodian population. *Journal of human genetics*. 2005;50(9):448-452.
166. Pal S, Bansil P, Bancone G, et al. Evaluation of a Novel Quantitative Test for Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency: Bringing Quantitative Testing for Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency Closer to the Patient. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2019;100(1):213-221.
167. Zaramella P, De Salvia A, Zaninotto M, et al. Lethal effect of a single dose of rasburicase in a preterm newborn infant. *Pediatrics*. 2013;131(1):e309-312.
168. Wisnumurti DA, Sribudiani Y, Porsch RM, et al. G6PD genetic variations in neonatal Hyperbilirubinemia in Indonesian Deutromalay population. *BMC Pediatr*. 2019;19(1):506.
169. Samilchuk E, D'Souza B, Al-Awadi S. Population study of common glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations in Kuwait. *Human heredity*. 1999;49(1):41-44.
170. Skold A, Cosco DL, Klein R. Methemoglobinemia: pathogenesis, diagnosis, and management. *South Med J*. 2011;104(11):757-761.
171. Vela-Amieva M, Alcántara-Ortigoza MA, González-Del Angel A, Belmont-Martínez L, López-Candiani C, Ibarra-González I. Genetic spectrum and clinical early natural history of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Mexican children detected through newborn screening. *Orphanet journal of rare diseases*. 2021;16(1):103.

172. Chiu YH, Chen HJ, Chang YC, et al. Applying a multiplexed primer extension method on dried blood spots increased the detection of carriers at risk of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in newborn screening program. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2019;495:271-277.
173. Boonyuen U, Songdej D, Tanyaratsrisakul S, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations in malaria endemic area of Thailand by multiplexed high-resolution melting curve analysis. *Malaria journal*. 2021;20(1):194.

## PHỤ LỤC 1

### QUY TRÌNH TÁCH CHIẾT DNA TỪ MÁU NGOẠI VI

bằng kit The Wizard Genomic DNA purification

1. Cho 900µl cell lyse solution vào ống 1,5ml
2. Thêm 300 µl máu toàn phần
3. Lắc 5-6 lần
4. Ủ 10 phút ở nhiệt độ phòng
5. Ly tâm 14 000 vòng 1 phút/22°C
6. Loại bỏ dịch nổi
7. Lặp lại bước 1-6 đến khi thấy tủa trắng. Vortex 10-15 giây. Thêm 300 µl Nuclei Lysis Solution. Ủ tiếp ở 37°C trong 1 giờ.
8. Thêm 100 µl Protein Precipitation Solution
9. Ly tâm 14 000 vòng 3 phút/22°C
10. Chuyển dịch nổi sang ống mới chứa 300 µl Isopropanol. Lắc và quan sát tủa DNA
11. Ly tâm 14000 vòng 10 phút/4 °C. Loại bỏ dịch nổi, thêm 300 µl ethanol 70° lắc 5-10 lần. Ly tâm 14000 vòng 10 phút/4 °C. Bỏ dịch nổi, để khô ở 56°C trong 20 phút.
12. Bổ sung 50 µl DNA Rehydration Solution. Ủ ở 65 °C trong 1 giờ và để qua đêm ở nhiệt độ phòng.

## PHỤ LỤC 2

### QUY TRÌNH KIỂM TRA NỒNG ĐỘ VÀ ĐỘ TINH SẠCH DNA

**Nguyên lý:** Dựa vào sự hấp thụ ánh sáng tối đa ở bước sóng 260 nm của hai đơn phân cấu tạo nên DNA là base purin và pyrimidin, người ta sử dụng giá trị mật độ quang ở bước sóng 260 nm để xác định nồng độ acid nucleic trong mẫu.

Ngoài ra mật độ quang ở bước sóng 280 nm còn xác định được nồng độ protein, cacbohydrat có mật độ quang lớn nhất tại bước sóng 230 nm. Từ đó dựa vào tỷ lệ  $A_{260}/A_{280}$  để kiểm tra chất lượng của DNA tách chiết.

**Tiến hành:**

- Chọn máy, chọn chương trình
- Trước khi đo nồng độ cần phải tráng bằng dung dịch hòa loãng DNA ở bước tách mẫu. Hút 2 $\mu$ l DNA hòa loãng cho vào mắt đọc. Chú ý cần thấm hết dung dịch DNA của lần đo trước. Bấm nút measure hoặc F1, đợi ra kết quả, quan sát đồ thị.

Sản phẩm đạt yêu cầu khi  $A_{260}/A_{280} = 1,8 - 2,0$  và  $A_{260}/A_{230} > 2$

*Chú ý:* Sản phẩm DNA tách chiết cần được bảo quản ở nhiệt độ 4°C trong thời gian ngắn hoặc ở nhiệt độ -20°C trong thời gian dài hơn.

DNA sau khi được tách chiết, kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch đạt yêu cầu sẽ được sử dụng làm khuôn để khuếch đại một đoạn gen G6PD bằng máy PCR Eppendorf. Các mẫu DNA được tách chiết đều được pha loãng về nồng độ khoảng 50 ng/ $\mu$ l để thực hiện phản ứng PCR.



### PHỤ LỤC 3

## QUY TRÌNH ĐIỆN DI KIỂM TRA SẢN PHẨM PCR TRÊN GEL AGAROSE

Bước 1: Chuẩn bị gel agarose 1,5%:

- Chuẩn bị khay đổ gel và lược: Tùy thuộc vào số lượng mẫu DNA cần kiểm tra mà chọn loại khay và răng lược thích hợp, có hai loại khay để đổ bản gel:  
Khay lớn: cân 0,375g bột agarose hòa tan trong 25ml dung dịch TBE 1X.  
Khay nhỏ: cân 0,225g bột agarose hòa tan trong 15ml dung dịch TBE 1X.
- Đun hỗn hợp bằng lò vi sóng trong khoảng 1-1,5 phút đến khi dung dịch sôi hoàn toàn và bột agarose tan hết thành dung dịch đồng nhất.
- Đổ gel vào khay điện di đã có sẵn các lược để tạo giếng.
- Để khoảng 45 phút để gel đông đặc hoàn toàn.

Bước 2: Tra mẫu điện di

- Đặt bản gel vào bể điện di sao cho bản gel ngập hoàn toàn trong dung dịch đệm TBE 1X.
- Tra 2 $\mu$ l Marker vào giếng đầu tiên.
- Tra 2-3 $\mu$ l sản phẩm PCR lần lượt vào các giếng còn lại trên bản gel.

Bước 3: Chạy điện di

- Chạy điện di mẫu trong 20-30 phút ở hiệu điện thế 100V

Bước 4 : Nhuộm bản gel

- Ngâm bản gel vào dung dịch nhuộm Ethidium bromide trong 3-5 phút. Sau đó lấy bản gel ra rửa nước để loại bỏ phẩm nhuộm dư thừa.

Bước 5: Chụp bản gel

- Quan sát các vạch sáng xuất hiện trên bản gel. Chụp hình lưu trữ kết quả.
- Vạch điện di rõ nét, không có vạch phụ, kích thước khi so trên thang chuẩn tương ứng với kích thước của đoạn gen cần khuếch đại