

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



NGUYỄN THỊ VÂN ANH

**ĐẶC ĐIỂM LÂM SÀNG, CẬN LÂM SÀNG
VÀ NHẬN XÉT KẾT QUẢ ĐIỀU TRỊ BỆNH
KHÔNG CÓ GAMMAGLOBULIN MÁU
LIÊN KẾT NHIỄM SẮC THỂ X**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI – 2019

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

-----***-----

NGUYỄN THỊ VÂN ANH

**ĐẶC ĐIỂM LÂM SÀNG, CẬN LÂM SÀNG
VÀ NHẬN XÉT KẾT QUẢ ĐIỀU TRỊ BỆNH
KHÔNG CÓ GAMMAGLOBULIN MÁU
LIÊN KẾT NHIỄM SẮC THỂ X**

Chuyên ngành: Nhi khoa

Mã số: 62720135

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

Người hướng dẫn khoa học:

1. PGS.TS. Lê Thị Minh Hương
2. TS. Vũ Văn Quang

HÀ NỘI - 2019

LỜI CẢM ƠN

Trước tiên, tôi xin bày tỏ lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc tới PGS.TS. Lê Thị Minh Hương và TS. Vũ Văn Quang - hai người thầy đã hết lòng dìu dắt tôi từ những bước đầu tiên trong công tác và nghiên cứu. Những người thầy tận tình hướng dẫn tôi thực hiện đề tài, giúp tôi giải quyết nhiều khó khăn vướng mắc trong quá trình thực hiện luận án.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành đến toàn thể các bác sỹ, điều dưỡng Khoa Miễn dịch - Dịch ứng - Khớp, Khoa Sinh hoá, Khoa Xét nghiệm huyết học, Khoa Di truyền và Sinh học phân tử Bệnh viện Nhi Trung ương, đã giúp đỡ tôi thực hiện và hoàn thành luận án.

Tôi cũng xin được bày tỏ lời cảm ơn chân thành tới:

Các Thầy Cô Bộ môn Nhi Trường Đại học Y Hà Nội. Các thầy cô đã nhiệt tình chỉ dẫn, đào tạo, giúp tôi trưởng thành trong lĩnh vực nghiên cứu khoa học.

Đảng ủy, Ban Giám đốc và các khoa phòng của Bệnh viện Nhi Trung ương, đã tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi công tác, học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận án.

Đảng ủy, Ban Giám hiệu, phòng Đào tạo Sau đại học trường Đại học Y Hà Nội đã kiến tạo môi trường đào tạo chuyên nghiệp giúp tôi trưởng thành trong học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận án.

Những bệnh nhân và gia đình người bệnh đã đồng hành cùng tôi thực hiện nghiên cứu này và cung cấp cho tôi những số liệu vô cùng quý giá để tôi hoàn thành luận án.

Cuối cùng, xin cảm ơn Bố, Mẹ hai bên gia đình, cảm ơn Chồng và các con là nguồn động viên to lớn đã giúp đỡ, cổ vũ tôi phấn đấu học tập và nghiên cứu hoàn thành luận án.

Hà Nội, ngày 20 tháng 11 năm 2019

Tác giả luận án

Nguyễn Thị Vân Anh

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Nguyễn Thị Vân Anh, nghiên cứu sinh khóa 34 Trường Đại học Y Hà Nội, chuyên ngành Nhi khoa, xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của PGS.TS. Lê Thị Minh Hương và TS. Vũ Văn Quang.
2. Công trình này không trùng lặp với bất kỳ nghiên cứu nào khác đã được công bố trong ngoài nước.
3. Các số liệu và thông tin trong nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được xác nhận và chấp thuận của cơ sở nơi nghiên cứu

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

Hà Nội, ngày 20 tháng 11 năm 2019

Người viết cam đoan

Nguyễn Thị Vân Anh

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
ARN	Acid Ribonucleic	
BCG	Bacillus Calmette Guérin	Vaccine Lao
BN		Bệnh nhân
BTK	Bruton tyrosine kinase	
c.DNA	Complementary DNA	ADN bổ sung
CD	Cluster of differentiation	Cụm biệt hoá
EBV	Epstein-Barr Virus	
HIV	Human Immunodeficiency Viruses	
IgA	Immunoglobulin A	Immunoglobulin A
IgG	Immunoglobulin G	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M	Immunoglobulin M
IVIG	Intravenous immunoglobulin	Globulin miễn dịch tiêm tĩnh mạch
Kb	Kilo base	
kDa	kilo Dalton	
mARN	messenger ARN	ARN thông tin
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification	Kỹ thuật khuếch đại đa môi dựa vào phản ứng nối
NST		Nhiễm sắc thể
PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi trùng hợp
SCIG	Subcutaneous Immunoglobulin	Globulin miễn dịch tiêm dưới da
sIg	Surface Immunoglobulin	Kháng thể bề mặt
TBG	Hematopoietic stem cells	Tế bào gốc tạo máu
XLA	X-linked Agammaglobulinemia	Bệnh không có Gammaglobulin máu liên kết nhiễm sắc thể X

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN	3
1.1. Khái niệm.....	3
1.2. Lịch sử nghiên cứu	3
1.3. Dịch tễ học	4
1.4. Cơ sở di truyền, sinh lý học	5
1.4.1. Gen <i>BTK</i>	5
1.4.2. Protein BTK	6
1.4.3. Tế bào lympho B	8
1.5. Đặc điểm lâm sàng	10
1.5.1. Tuổi khởi phát triệu chứng nhiễm trùng và tuổi chẩn đoán bệnh XLA ...	11
1.5.2. Bệnh lý nhiễm trùng	12
1.5.3. Bệnh lý khớp	16
1.5.4. Bệnh lý tự miễn	17
1.5.5. Bệnh lý huyết học và bệnh lý ác tính	18
1.5.6. Tiền sử gia đình	18
1.6. Đặc điểm cận lâm sàng.....	19
1.6.1. Nồng độ kháng thể.....	19
1.6.2. Công thức máu ngoại vi.....	19
1.6.3. Số lượng tế bào lympho dưới nhóm.....	20
1.6.4. Phân tích gen <i>BTK</i>	21
1.6.5. Chẩn đoán hình ảnh	23
1.7. Điều trị	24
1.7.1. Liệu pháp điều trị thay thế Globulin miễn dịch	24
1.7.2. Điều trị nhiễm trùng.....	29

1.7.3. Điều trị bệnh lý tự miễn	30
1.7.4. Chăm sóc bệnh nhân XLA	31
1.7.5. Một số phương pháp điều trị mới	32
1.8. Tình hình nghiên cứu bệnh XLA	34
1.8.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới	34
1.8.2. Tình hình nghiên cứu tại Việt Nam	35
CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	36
2.1. Đối tượng nghiên cứu	36
2.1.1. Tiêu chuẩn chọn bệnh nhân	36
2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ	37
2.2. Phương pháp nghiên cứu	37
2.2.1. Thiết kế nghiên cứu	37
2.2.2. Cỡ mẫu nghiên cứu	37
2.2.3. Địa điểm và thời gian nghiên cứu	37
2.2.4. Quy trình nghiên cứu	38
2.2.5. Các chỉ số nghiên cứu	39
2.2.6. Các quy trình xét nghiệm	44
2.2.7. Xử lý số liệu	51
2.2.8. Kỹ thuật khắc phục sai số và nhiễu	52
2.2.9. Đạo đức của đề tài	52
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	54
3.1. Đặc điểm lâm sàng và xét nghiệm miễn dịch	54
3.1.1. Đặc điểm chung của bệnh nhân	54
3.1.2. Tiền sử bệnh nhân	55
3.1.3. Tiền sử gia đình	63
3.1.4. Đặc điểm lâm sàng thời điểm chẩn đoán bệnh	64
3.1.5. Nồng độ kháng thể	69

3.1.6. Công thức máu.....	69
3.1.7. Số lượng tế bào lympho dưới nhóm	71
3.1.8. Căn nguyên gây bệnh.....	72
3.2. Phân tích gen <i>BTK</i>	72
3.2.1. Tỷ lệ phát hiện đột biến	72
3.2.2. Kiểu đột biến điểm.....	73
3.2.3. Phân bố đột biến trên gen <i>BTK</i>	74
3.2.4. Vị trí các đột biến trên gen <i>BTK</i>	74
3.2.5. Đột biến mất đoạn.....	75
3.2.6. Phân bố đột biến trên các vùng chức năng	77
3.2.7. Đột biến mới.....	78
3.2.8. Đặc điểm của bệnh nhân có đột biến mới.....	83
3.2.9. Đặc điểm của bệnh nhân không tìm thấy đột biến.....	84
3.2.10. Kiểu gen của mẹ và chị em gái bệnh nhân	85
3.3. Điều trị	86
3.3.1. Liều điều trị	87
3.3.2. Triệu chứng lâm sàng trong thời gian điều trị	87
3.3.3. Nồng độ kháng thể trong thời gian điều trị.....	89
3.3.4. Mối liên quan giữa triệu chứng lâm sàng và nồng độ IgG đáy	92
CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN.....	93
4.1. Triệu chứng lâm sàng và xét nghiệm miễn dịch.....	93
4.1.1. Đặc điểm chung của nhóm nghiên cứu	93
4.1.2. Tiền sử bệnh	96
4.1.3. Tiền sử gia đình	105
4.1.4. Tình trạng nhiễm khuẩn giai đoạn chẩn đoán bệnh XLA	106
4.1.5. Nồng độ kháng thể.....	110
4.1.6. Công thức máu.....	112

4.1.7. Số lượng tế bào lympho dưới nhóm	112
4.2. Phân tích gen	113
4.2.1. Đặc điểm đột biến trên gen <i>BTK</i>	114
4.2.2. Vị trí đột biến.....	115
4.2.3. Đột biến mới.....	116
4.2.4. Đặc điểm bệnh nhân không phát hiện đột biến trên gen <i>BTK</i>	118
4.2.5. Phân tích gen của mẹ và chị em gái bệnh nhân	119
4.3. Điều trị	120
4.3.1. Liều điều trị	120
4.3.2. Đặc điểm lâm sàng khi được điều trị IVIG.....	122
4.3.3. Nồng độ Globulin miễn dịch trước và sau mỗi đợt điều trị.....	124
4.3.4. Mối tương quan giữa triệu chứng lâm sàng và nồng độ Globulin miễn dịch.....	124
4.3.5. Tiên lượng	125
KẾT LUẬN.....	126
KIẾN NGHỊ VÀ HƯỚNG NGHIÊN CỨU TIẾP THEO	128
DANH MỤC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1.	Thành phần phản ứng PCR.....	48
Bảng 3.1.	Tuổi khởi phát đợt nhiễm khuẩn đầu tiên.....	56
Bảng 3.2.	Bệnh đợt nhiễm khuẩn đầu tiên của bệnh nhân.....	56
Bảng 3.3.	Tần suất nhiễm khuẩn trước khi được chẩn đoán trong giai đoạn trẻ dưới 1 tuổi.....	59
Bảng 3.4.	Tần suất nhiễm khuẩn trước khi được chẩn đoán trong giai đoạn trẻ từ 1 tới 2 tuổi.....	60
Bảng 3.5.	Tần suất nhiễm khuẩn trước khi được chẩn đoán trong giai đoạn trẻ từ 2 tới 3 tuổi.....	61
Bảng 3.6.	Tần suất nhiễm khuẩn trước khi được chẩn đoán trong giai đoạn trẻ từ 3 tới 4 tuổi.....	62
Bảng 3.7.	Tần suất nhiễm khuẩn trước khi được chẩn đoán trong giai đoạn trẻ từ 4 tới 5 tuổi.....	63
Bảng 3.8.	Bệnh nhiễm khuẩn tại thời điểm chẩn đoán bệnh XLA.....	65
Bảng 3.9.	Phân bố tuổi tại thời điểm bệnh nhân chẩn đoán bệnh XLA	66
Bảng 3.10.	Thời gian chẩn đoán muộn và tiền sử gia đình.....	67
Bảng 3.11.	Mối liên quan giữa mức độ nhiễm khuẩn nặng thời điểm chẩn đoán bệnh và tuổi chẩn đoán.....	67
Bảng 3.12.	Mối liên quan giữa tiền sử gia đình và thời gian được chẩn đoán.....	68
Bảng 3.13.	Nồng độ kháng thể tại thời điểm chẩn đoán.....	69
Bảng 3.14.	Số lượng bạch cầu tại thời điểm chẩn đoán.....	69
Bảng 3.15.	Số lượng bạch cầu trung tính tại thời điểm chẩn đoán.....	70
Bảng 3.16.	Nồng độ Hemoglobin của bệnh nhân tại thời điểm được chẩn đoán..	70
Bảng 3.17.	Số lượng các tế bào lympho dưới nhóm tại thời điểm.....	71
Bảng 3.18.	Phân bố căn nguyên vi khuẩn gây bệnh trong đợt chẩn đoán	72

Bảng 3.19.	Kết quả xác định đột biến gen BTK bằng phương pháp giải trình tự	73
Bảng 3.20.	Vị trí đột biến trên các vùng chức năng	77
Bảng 3.21.	Đặc điểm lâm sàng, xét nghiệm miễn dịch của những bệnh nhân có đột biến mới chưa được công bố trên gen <i>BTK</i>	83
Bảng 3.22.	Đặc điểm điểm lâm sàng, xét nghiệm miễn dịch của những bệnh nhân không tìm thấy đột biến.....	84
Bảng 3.23.	Kết quả đột biến gen <i>BTK</i> của mẹ và các chị em gái.....	85
Bảng 3.24.	So sánh tần suất viêm phổi trung bình trong 6 tháng trước điều trị và 6 tháng điều trị	88
Bảng 3.25.	So sánh tần suất viêm phổi trung bình trong 6 tháng trước điều trị và 6 tháng điều trị	88
Bảng 3.26.	Các loại nhiễm khuẩn khác trong 6 tháng điều trị	89
Bảng 3.27.	Mối liên quan giữa liều điều trị và sự cải thiện IgG	90
Bảng 3.28.	Mối liên quan giữa nồng độ IgG đáy và tình trạng nhiễm khuẩn....	92
Bảng 3.29.	Mối liên quan giữa nồng độ IgG đáy và tần suất bị nhiễm khuẩn hô hấp của trẻ	92
Bảng 4.1.	So sánh tiền sử nhiễm khuẩn trước chẩn đoán bệnh XLA của nghiên cứu này với các nghiên cứu khác.....	98

DANH MỤC BIỂU ĐỒ

Biểu đồ 3.1.	Phân bố tuổi vào thời điểm tham gia nghiên cứu	54
Biểu đồ 3.2.	Sự phát triển thể chất tại thời điểm phát hiện	55
Biểu đồ 3.3.	Phân bố cân nặng khi sinh	55
Biểu đồ 3.4.	Tỷ lệ mắc các loại nhiễm trùng thường gặp trước khi chẩn đoán	57
Biểu đồ 3.5.	Tỷ lệ mắc các loại nhiễm khuẩn trước khi được chẩn đoán theo từng nhóm tuổi.....	58
Biểu đồ 3.6.	Tiền sử gia đình.....	63
Biểu đồ 3.7.	Đặc điểm kích thích Amidan	64
Biểu đồ 3.8.	Kiểu đột biến gen <i>BTK</i>	73
Biểu đồ 3.9.	Phân bố đột biến trên gen <i>BTK</i>	74
Biểu đồ 3.10.	Tình trạng nhiễm khuẩn trong 6 tháng điều trị	87
Biểu đồ 3.11.	Nồng độ IgG trước và sau mỗi đợt điều trị.....	89
Biểu đồ 3.12.	Mối liên quan giữa liều điều trị và sự chênh lệch nồng độ IgA trước và sau điều trị	91
Biểu đồ 3.13.	Mối liên quan giữa liều điều trị và sự chênh lệch nồng độ IgM trước và sau điều trị	91

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1.	Vị trí gen BTK trên NST giới tính X.....	5
Hình 1.2.	Sơ đồ cấu trúc protein Bruton's tyrosine kinase	7
Hình 1.3.	Cấu trúc Pre-BCR và BCR.....	8
Hình 1.4.	Các yếu tố ảnh hưởng sự phát triển của tế bào lympho B	9
Hình 2.1.	Sơ đồ nghiên cứu	38
Hình 2.2.	Kích thước Amidan theo phân độ Brodsky và Friedman	41
Hình 2.3.	Sơ đồ quy trình xác định đột biến gen BTK gây bệnh XLA	47
Hình 2.4.	Sơ đồ nhân đoạn gen BTK	47
Hình 3.1.	Vị trí các đột biến gen BTK	74
Hình 3.2.	Ảnh điện di bệnh nhân số 26 và số 27 gen BTK.....	75
Hình 3.3.	Kết quả phân tích MLPA của bệnh nhân số 26 và số 27	76
Hình 3.4.	Ảnh đột biến c.1735G>C trên gen BTK	78
Hình 3.5.	Phả hệ của bệnh nhân số 01.....	78
Hình 3.6.	Ảnh đột biến c.1908+2_11delinsC trên gen BTK.....	79
Hình 3.7.	Phả hệ của bệnh nhân số 02.....	80
Hình 3.8.	Phả hệ của bệnh nhân số 16.....	80
Hình 3.9.	Ảnh đột biến c.521-1G>A trên gen BTK.....	81
Hình 3.10.	Phả hệ của bệnh nhân 05	81
Hình 3.11.	Ảnh đột biến c.1578_1581del trên gen BTK	82
Hình 3.12.	Phả hệ của bệnh nhân số 19.....	82
Hình 4.1.	Hình ảnh Amidan bình thường và Amidan của bệnh nhân.....	95
Hình 4.2.	Viêm khớp gối và cổ chân phải của bệnh nhân số 31	102

ĐẶT VẤN ĐỀ

Không có Gammaglobulin máu liên kết nhiễm sắc thể X (X-linked Agammaglobulinemia - XLA) là một bệnh di truyền do đột biến gen Bruton Tyrosine Kinase (gen *BTK*) nằm trên nhiễm sắc thể giới tính X. Bệnh nhân bị đột biến gen *BTK* sẽ không sản xuất đủ protein cytoplasmic tyrosine kinase khiến cho tế bào lympho B không thể biệt hóa và trở thành tương bào. Vì vậy, cơ thể giảm khả năng sản xuất kháng thể chống lại các tác nhân gây bệnh và thường xuyên bị nhiễm trùng.

Tỷ lệ mắc bệnh XLA thay đổi ở nhiều quần thể nghiên cứu khác nhau. Tại Mỹ, tỷ lệ này là 11,25/100.000 dân [1]. Theo số liệu của tổ chức Suy giảm miễn dịch thế giới Jeffrey Modell, năm 2016 đã có 2.116 bệnh nhân XLA [2]. Tuy nhiên, đây là con số chưa đầy đủ vì nhiều nước không tham gia vào nghiên cứu này và trong thực tế, số lượng bệnh nhân XLA chưa được chẩn đoán còn rất lớn tại các nước đang phát triển, trong đó có Việt Nam.

Một trong những đặc điểm lâm sàng đặc trưng nhất của bệnh nhân XLA là thường xuyên bị nhiễm khuẩn sớm sau sinh vài tháng, khi mà kháng thể do mẹ truyền qua rau thai đã giảm dần. Trẻ bị nhiễm khuẩn ở nhiều cơ quan, nhiễm khuẩn nặng, tái phát nhiều đợt và cần điều trị kháng sinh đường tĩnh mạch, tác dụng mạnh và kéo dài.

Chẩn đoán xác định bệnh XLA dựa trên các dấu hiệu lâm sàng, sự giảm nặng nồng độ kháng thể cũng như số lượng tế bào lympho B trong máu ngoại vi và phân tích gen [3],[4]. Một số nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng xác định được đột biến trên gen *BTK* không những giúp chẩn đoán chính xác mà còn giúp tiên lượng mức độ nặng của bệnh và giúp tư vấn di truyền cho gia đình người bệnh [5],[6],[7],[8].

Bệnh nhân XLA không có khả năng sản xuất kháng thể nên nguyên tắc điều trị là thay thế Gammaglobulin thường xuyên và thích hợp để đảm bảo nồng độ kháng thể trong máu đủ để bảo vệ cơ thể khỏi nhiễm trùng. Trên thế giới, người bệnh XLA được chẩn đoán sớm, điều trị hiệu quả nên tỷ lệ tử vong và biến chứng thấp, nhiều người bệnh có chất lượng cuộc sống như người bình thường [9].

Tại Việt Nam từ thế kỷ trước, một số bệnh nhân có các biểu hiện lâm sàng nghi ngờ mắc bệnh XLA đã được đề cập. Tuy nhiên, do điều kiện xét nghiệm chưa phát triển nên hầu hết bệnh nhân bị bỏ sót chẩn đoán bệnh nên là suy giảm miễn dịch mà chỉ điều trị các đợt nhiễm trùng tái diễn. Gần đây, một số bệnh viện nhi khoa lớn tại Hà Nội, thành phố Hồ Chí Minh đã triển khai các xét nghiệm miễn dịch và phân tích đột biến gen *BTK* giúp chẩn đoán được dễ dàng hơn. Tuy nhiên, trên thực tế bệnh nhân XLA vẫn thường bị bỏ sót chẩn đoán, chẩn đoán muộn với những di chứng nặng nề, thậm chí tử vong do nhiễm trùng nặng.

Từ thực trạng trên, chúng tôi tiến hành đề tài: **“Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và nhận xét kết quả điều trị bệnh không có Gammaglobulin máu liên kết nhiễm sắc thể X”** với mục tiêu:

1. *Mô tả đặc điểm lâm sàng, xét nghiệm miễn dịch của bệnh không có Gammaglobulin máu liên kết nhiễm sắc thể X.*
2. *Phát hiện đột biến gen Bruton Tyrosine Kinase ở bệnh nhân không có Gammaglobulin máu liên kết nhiễm sắc thể X.*
3. *Nhận xét kết quả điều trị bệnh không có Gammaglobulin máu liên kết nhiễm sắc thể X bằng phương pháp truyền Gammaglobulin đường tĩnh mạch.*

CHƯƠNG 1

TỔNG QUAN

1.1. Khái niệm

Suy giảm miễn dịch tiên phát (hay còn gọi là bẩm sinh - Primary Immunodeficiency) là một nhóm các bệnh lý bất thường liên quan tới tình trạng suy giảm hoặc thiếu hụt một hoặc nhiều yếu tố trong hệ thống miễn dịch [10]. Theo phân loại mới nhất của Hiệp hội miễn dịch học quốc tế (IUIS) năm 2017, SGMD tiên phát gồm trên 330 bệnh di truyền đã được xác định ở mức độ phân tử [10]. Trong đó, SGMD thể dịch là nhóm bệnh thường gặp nhất.

Suy giảm miễn dịch thể dịch là một nhóm các rối loạn được đặc trưng bởi sự giảm sản xuất kháng thể hoặc rối loạn chức năng kháng thể vì sự gián đoạn trong quá trình biệt hoá của tế bào lympho B [11].

Bệnh không có Gammaglobulin máu liên kết nhiễm sắc thể X (X-linked Agammaglobulinemia) là một bệnh suy giảm miễn dịch thể dịch điển hình, đặc trưng bởi sự giảm nặng tất cả các globulin miễn dịch và tế bào lympho B trưởng thành, do đột biến ở gen Bruton Tyrosine Kinase nằm trên nhiễm sắc thể giới tính X [3], [12]. Vì vậy, cơ thể bệnh nhân bị giảm khả năng chống chọi với các tác nhân gây bệnh, đặc biệt là vi khuẩn.

1.2. Lịch sử nghiên cứu

XLA được mô tả lần đầu năm 1952 bởi một bác sĩ người Mỹ Ogden Carr Bruton. Ông đã nhận thấy sự thiếu hụt kháng thể ở cậu bé 8 tuổi Joseph S. Holtoner bị viêm phổi, viêm xoang, viêm tai giữa kéo dài. Từ đó sử dụng thuật ngữ “agammaglobulinemia” nghĩa là không có Gammaglobulin máu. Sau khi chẩn đoán, ông đã điều trị bằng cách tiêm bắp globulin miễn dịch và cứu sống bệnh nhân. Ngày nay, do tính lịch sử để lại, người ta vẫn tiếp tục dùng thuật ngữ này, mặc dù nhiều nghiên cứu đã thấy rằng một vài bệnh nhân

XLA có thể sản xuất được một lượng nhỏ, thậm chí một lượng đáng kể Globulin miễn dịch.

XLA chính là bệnh SGMD tiên phát đầu tiên được phát hiện trong lịch sử, làm tiền đề cho các hướng tìm kiếm bệnh SGMD tiên phát khác sau này.

Năm 1993, hai nhóm nghiên cứu độc lập của David Vetrie và của Satoshi Tsukada cùng tìm ra gen gây bệnh XLA: Bruton tyrosine kinase – *BTK* nằm ở cánh dài của nhiễm sắc thể X ở vị trí băng 21 cánh dài (Xq22.1). Gen *BTK* dài 37 kb chứa 19 exon. Đột biến ở gen này gây nên giảm hoặc mất chức năng của protein Bruton's tyrosine kinase [3], [4]. Ngày nay, theo ngân hàng dữ liệu đột biến gen người (Human gene mutation database) đã có 874 đột biến khác nhau trên gen *BTK* (401 đột biến sai nghĩa hoặc vô nghĩa; 139 đột biến vùng nối Exon/Intron, 181 đột biến mất đoạn nhỏ; 62 đột biến thêm đoạn nhỏ, 72 đột biến mất đoạn lớn, 15 đột biến thêm đoạn lớn, 2 đột biến tổ hợp và 2 đột biến phức tạp) (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>).

1.3. Dịch tễ học

Tỷ lệ mắc bệnh XLA thay đổi tùy thuộc vào các nghiên cứu tại các vùng lãnh thổ khác nhau. Tỷ lệ mắc bệnh tại Đức là 0,09 trên 100.000 dân [13], ở Mỹ là 11,25 trên 100.000 dân [1], ở các nước Đông Âu và Trung Âu là 1 trên 139.900 dân [14].

Tại các nước châu Á, rất ít nghiên cứu đưa ra tỷ lệ mắc bệnh XLA do chưa có nguồn dữ liệu khu vực cũng như dữ liệu của từng quốc gia. Tuy nhiên, do đặc điểm của bệnh SGMD thể XLA gây suy giảm miễn dịch thể dịch nặng nên rất nhiều bệnh nhân bị nhiễm khuẩn nặng và tử vong trước khi được chẩn đoán xác định bệnh. Vì vậy, đa số các báo cáo chỉ đưa ra số bệnh nhân mắc bệnh không thực sự đầy đủ.

Tỷ lệ tử vong ở bệnh nhân bị XLA đã thay đổi sau nhiều năm. Nghiên cứu tại Anh cho thấy, những bệnh nhân sinh trước năm 1960 thường chết đột

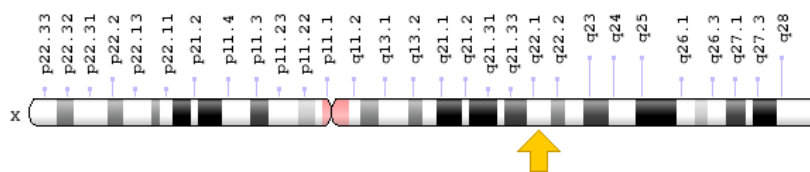
ngột trước 5 tuổi, có thể là do nhiễm khuẩn cấp tính. Nghiên cứu trước năm 1996 ở Anh và Mỹ trên tổng số 170 bệnh nhân bị XLA, có 17% tử vong [15] [16]. Mười hai trong số 27 bệnh nhân tử vong này là do nhiễm enterovirus, và biến chứng sau tiêm vắc xin dại, 9 bệnh nhân do bệnh phổi mạn tính, 3 bệnh nhân viêm gan.

Ngày nay, tỷ lệ tử vong của bệnh nhân XLA đã giảm đi đáng kể. Nghiên cứu lớn tại Mỹ năm 2006 trên 201 bệnh nhân XLA, chỉ có 17 bệnh nhân tử vong (8,5%) [17]. Trong đó, 3 bệnh nhân mắc bệnh viêm não do echovirus và 1 bệnh nhân tử vong do viêm cơ tim, có lẽ do coxsackievirus, 2 bệnh nhân tử vong vì bệnh phổi mạn tính. Cơ sở miễn dịch học và di truyền phân tử. Hơn nữa, tỷ lệ tử vong cũng khác nhau tùy từng quốc gia hoặc nghiên cứu. Tại Iran, tác giả Abolhassania công bố năm 2015 trên 41 bệnh nhân XLA được theo dõi trong 20 năm có 26,8% bệnh nhân tử vong [18].

1.4. Cơ sở di truyền, sinh lý học

1.4.1. Gen *BTK*

Gen *BTK* nằm trên nhiễm sắc thể X, cánh dài, băng 22, dưới băng 1 (Xq22.1); dài 37,5 kilobase, chứa 19 exon. Kích thước của các exon thay đổi từ 55 đến 560 bp, và các intron từ 164 bp đến 9 kb [3],[19].



Hình 1.1. Vị trí gen *BTK* trên NST giới tính X [20]

Vùng điều khiển của gen *BTK* ban đầu được suy ra từ trình tự chuỗi ADN ở đầu 5' ở vị trí bắt đầu [21]. Qua phân tích chức năng của vùng này, 4 vị trí gắn và kích hoạt quá trình sao chép của 4 nhân tố đã được xác định là Sp1/3, Spi-B/PU.1, và OCT1/OBF1 và nhân tố hạt nhân (NF)- κ B [22],[23]

[24]. Protein BTK biểu hiện trong tất cả các tế bào tạo máu, ngoại trừ các tế bào T và tế bào plasma. Điều này cho thấy gen *BTK* được khởi động sớm trong quá trình phân bào, và biểu hiện protein BTK đã được quan sát thấy trong các tế bào mang marker tiền thân CD34 [25].

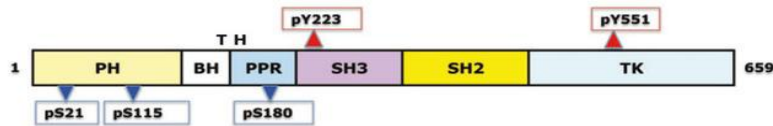
Đột biến gen *BTK* là đột biến gen lặn trên nhiễm sắc thể X. Người phụ nữ mang gen bệnh trên một nhiễm sắc thể X sẽ không mắc bệnh nhưng có thể truyền nhiễm sắc thể X đó cho con trai. Vì vậy, đa số người mắc bệnh là nam giới do mang một nhiễm sắc thể X đột biến. Rất hiếm trường hợp nữ giới bị bệnh. Các anh, em trai của bệnh nhân có thể cũng mang đột biến từ mẹ và mắc bệnh XLA nên cần được sàng lọc bệnh sớm bằng định lượng kháng thể và số lượng tế bào lympho B. Bên cạnh đó, các chị em gái của mẹ bệnh nhân và chị em gái của bệnh nhân cần được xét nghiệm có mang gen đột biến hay không, để có thể tư vấn di truyền, phát hiện sớm thai nhi nam mang gen bệnh.

Các đột biến trên gen *BTK* của bệnh nhân có thể di truyền từ mẹ nhưng một số bệnh nhân (15-20%) do đột biến mới (de novo) và mẹ không phải người mang gen bệnh [26]. Việc xác định được đột biến cho bệnh nhân và những người có nguy cơ mang gen bệnh không những giúp cho việc quyết định điều trị mà còn giúp tư vấn di truyền và chẩn đoán trước sinh.

1.4.2. Protein BTK

➤ Cấu trúc protein BTK

Gen *BTK* mã hóa protein: Bruton's Tyrosine Kinase (protein BTK) dài 659 acid amin, nặng 77 Kilodaltons, với năm khu vực chức năng: plekstrin homology (PH) (acid amin 1 tới 138), Tec homology (TH) (acid amin 139 tới 215), Src homology 3 (SH3) (acid amin 216 tới 280), Src homology 2 (SH2) (acid amin 281 tới 377) và kinase (TK hay còn gọi là SH1) (acid amin 375 tới 659) [27].



Hình 1.2. Sơ đồ cấu trúc protein Bruton's tyrosine kinase [27]

Protein BTK là đại diện của nhóm gia đình Tec của các protein không tham gia vai trò receptor: tyrosine kinases (13). Nó tham gia trong tất cả các giai đoạn phát triển của tế bào lympho B từ tế bào tiền B CD34+CD19+ tới tế bào B trưởng thành, tới tế bào plasma thì không còn tác dụng. Protein BTK cũng thể hiện ở tế bào erythroid precursors, myeloid cells, tế bào mast, tế bào mono, megakaryocytes và tiểu cầu.

➤ Chức năng của protein BTK

Gen *BTK* mã hóa cho protein Bruton's Tyrosine Kinase là một trong những Protein Tyrosine Kinase (PTK) nằm trong bào tương. Các protein Tyrosine Kinases đóng vai trò enzym xúc tác cắt phosphate của ATP thành ADP. Phosphoryl hóa dư lượng tyrosine điều chỉnh hoạt tính enzym và tạo ra các vị trí gắn kết các protein báo hiệu hạ lưu. Hai nhóm PTK có mặt trong các tế bào: các PTK receptor xuyên màng và các PTK không phải receptor (nonreceptor). PTK là thành phần quan trọng của con đường tín hiệu tế bào. Vì vậy, hoạt động xúc tác của chúng được điều chỉnh rất nghiêm ngặt. Trong vài năm qua, các nghiên cứu cấu trúc có độ phân giải cao của PTK đã cung cấp một cơ sở phân tử để hiểu rõ hơn về cơ chế điều chỉnh sự tương tác giữa PTK và các receptor của chúng [28].

Đột biến gen *XLA* gây giảm hoặc mất chức năng của protein Tyrosine Kinases khiến cho tế bào lympho B không thể biệt hóa hoặc trưởng thành tương bào – tế bào chính có chức năng sản xuất các kháng thể. Các cơ quan lưới nội mô và bạch huyết, nơi các tế bào lympho B tăng sinh, biệt hóa, và được lưu trữ cũng kém phát triển. Lách, amidan, các hạch vòm họng, các mảng Payer ở

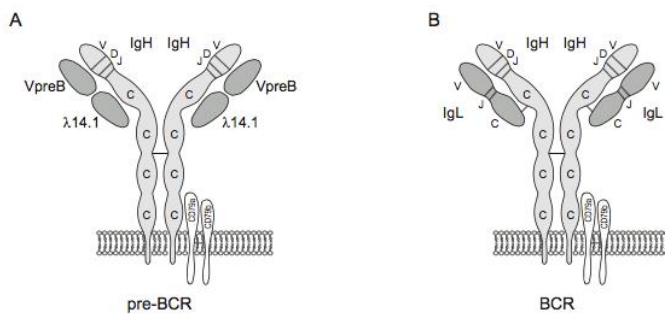
ruột, và các hạch bạch huyết ngoại vi có thể đều giảm kích thước hoặc không có ở bệnh nhân XLA.

1.4.3. Tế bào lympho B

Bình thường, các tế bào lympho B trải qua quá trình biệt hoá và trở thành tương bào, sản xuất kháng thể. Trong tủy xương, tế bào mầm tạo máu (hematopoietic stem cell) phát triển thành tế bào đầu dòng lympho (lymphoid preprecursor cell), sau đó tiếp tục biệt hoá thành tế bào Pro-B, tiếp tục biệt hoá thành tế bào Pre-B rồi thành tế bào B non (immature B cell).

Sau khi đã biệt hoá thành tế bào B non, chúng sẽ di chuyển tới mô lympho ngoại vi như hạch, lách để tiếp tục biệt hoá thành tế bào B trưởng thành (mature B cell). Sau đó, các tế bào B trưởng thành sẽ ra máu ngoại vi.

Trong quá trình biệt hoá từ tế bào Pre-B tới tế bào B non có sự ảnh hưởng trực tiếp của phức hợp Pre-BCR (Pre B-cell receptor signalling – preBCR). Phức hợp pre-BCR bao gồm hai chuỗi Ig μ giống hệt nhau và 2 protein chuỗi nhẹ VpreB và λ 14.1, cùng với các phân tử gắn kết CD79 α và CD79 β . Có nhiều đột biến gây ra bất thường phức hợp Pre-BCR.

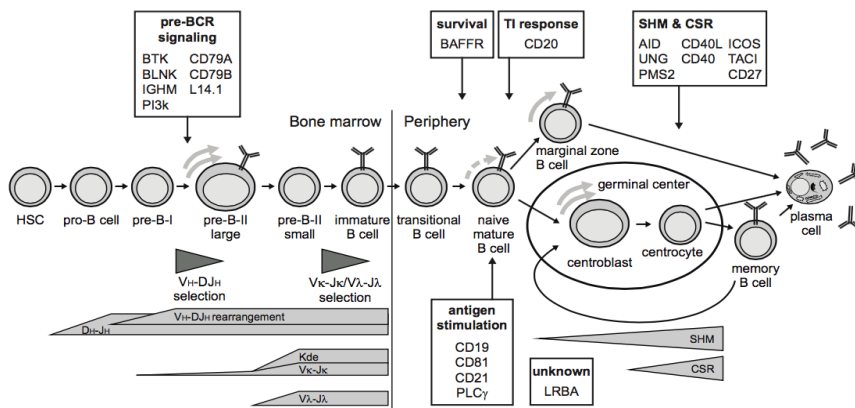


Hình 1.3. Cấu trúc Pre-BCR và BCR [29]

Trong bệnh XLA, đột biến gen *BTK* gây ra bất thường trong quá trình tổng hợp protein Bruton tyrosine kinase, một protein quan trọng giúp hình thành phức hợp Pre-BCR. Do vậy, các tế bào lympho B sẽ bị dừng biệt hoá ở

giai đoạn tế bào Pre B trong tủy xương, dẫn đến sự vắng mặt của các tế bào lympho B trong máu ngoại vi và các mô lympho ngoại biên. Kết quả là sự sản xuất tất cả các loại kháng thể: IgM, IgA, IgG, các kháng thể đặc hiệu với các căn nguyên gây bệnh đều bị suy giảm nghiêm trọng.

Đột biến gen *BTK* là đột biến gen đầu tiên (năm 1993) gây bất thường Pre-BCR được tìm thấy, chiếm 85% trong số tất cả các trường hợp không có Gammaglobulin máu tiên phát. Sau đó, các đột biến khác cũng gây ảnh hưởng tới các thành phần của phức hợp Pre-BCR dần được phát hiện. Năm 1996 phát hiện đột biến gen gây bất thường chuỗi nặng Ig μ (IGHM) [27]. Những năm tiếp theo, các đột biến khác lần lượt được tìm thấy: đột biến λ 14.1, CD79 α , BLNK, CD79 β , P85a, PI3K [30],[31],[32]. Những đột biến này là đột biến trên gen lặn nằm trên nhiễm sắc thể thường, cũng gây bệnh không có Gammaglobulin máu và cần chẩn đoán phân biệt với bệnh XLA do đột biến trên nhiễm sắc thể giới tính X.



Hình 1.4. Các yếu tố ảnh hưởng sự phát triển của tế bào lympho B [29]

Bình thường, các tế bào B trưởng thành khu trú và trở thành loại tế bào chính trong hạch bạch huyết. Ở bệnh nhân XLA, các hạch bạch huyết và hạch phản ứng rất nhỏ vì chứa rất ít tế bào lympho B [19]. Khi nghiên cứu mô bệnh

học của các hạch trong ổ bụng cũng không thấy sự có mặt của các tế bào plasma [33].

1.5. Đặc điểm lâm sàng

Đa số bệnh nhân XLA là nam giới do đột biến gen *BTK* nằm trên nhiễm sắc thể giới tính X. Bệnh nhân XLA nữ rất hiếm gặp nhưng y văn cũng đã mô tả một vài trường hợp. Đó là do bệnh nhân nữ đó có một NST X đột biến trên gen *BTK* nhưng NST X còn lại bị bất hoạt hoặc do bệnh nhân bị đột biến đồng hợp tử: nhận 1 NST X đột biến từ người bố cũng bị bệnh XLA và 1 NST X bất thường từ người mẹ mang gen đột biến.

Khi mới ra đời, do IgG của mẹ truyền được qua rau thai nên nồng độ IgG trong máu của trẻ bình thường như những đứa trẻ khoẻ mạnh khác. Bản thân trẻ XLA không có khả năng tự sản xuất được kháng thể nên sau một vài tháng, khi IgG của mẹ truyền sang bị giải phóng hết, nồng độ IgG trong máu bắt đầu giảm và sau 6 tháng, nồng độ IgG sẽ giảm xuống rất thấp, thậm chí bằng không.

Các biểu hiện lâm sàng chủ yếu là nhiễm khuẩn, đặc biệt là các vi khuẩn sinh mủ. Bệnh nhân XLA do giảm nặng khả năng sản xuất tất cả các kháng thể: IgA, IgM, IgG, IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, các kháng thể đặc hiệu chống các vi sinh vật nên nhiễm trùng thường xuyên, kéo dài và tái phát liên tục. Không giống như nhiễm khuẩn tái diễn do bất thường cấu trúc các cơ quan (như dị dạng đường hô hấp, dị dạng tiết niệu...), bệnh nhân thiếu hụt miễn dịch thường bị nhiễm trùng ở nhiều cơ quan, vị trí khác nhau: viêm tai giữa, viêm xoang, viêm phổi, viêm kết mạc, tiêu chảy và nhiễm trùng da... Rất nhiều bệnh nhân XLA trước khi được chẩn đoán còn có những đợt nhiễm khuẩn nặng đe dọa tính mạng như viêm phổi nặng, viêm mủ màng phổi, viêm màng não, viêm mô tế bào, nhiễm trùng huyết...

Ngoài các biểu hiện nhiễm trùng, bệnh nhân XLA còn có thể có biểu hiện các bệnh lý tự miễn, dị ứng, khối u...

1.5.1. Tuổi khởi phát triệu chứng nhiễm trùng và tuổi chẩn đoán bệnh XLA

Bệnh nhân suy giảm miễn dịch không có Gammaglobulin máu liên kết nhiễm sắc thể X có triệu chứng chủ yếu là nhiễm trùng nặng, dai dẳng và tái phát nhiều đợt. Bệnh thường diễn ra trong năm đầu đời, khi mà kháng thể IgG của người mẹ truyền qua rau thai đã hết. Nghiên cứu của Winkelstein và cộng sự, trong số 175 bệnh nhân bị XLA, khoảng 50% bệnh nhân có triệu chứng nhiễm khuẩn trong năm đầu đời và chỉ có dưới 10% bệnh nhân có các triệu chứng trong 3 tháng sau sinh do trẻ được bảo vệ bởi các kháng thể của mẹ truyền qua rau thai [17]. Nghiên cứu ở Ý trên 73 bệnh nhân, tuổi khởi phát triệu chứng nhiễm khuẩn trung bình là 2 tuổi [6].

Một số bệnh nhân XLA có đột biến gen *BTK* gây bệnh XLA nhưng được chẩn đoán rất muộn, khi đã trưởng thành do bệnh nhân không có các triệu chứng nghiêm trọng đủ để gợi ý xét nghiệm và chẩn đoán; hoặc có các đợt nhiễm khuẩn nhưng không thường xuyên [34].

Các nghiên cứu gần đây cho thấy tuổi trung bình khi trẻ bắt đầu có biểu hiện nhiễm khuẩn tăng lên và tuổi chẩn đoán trung bình đã giảm ở đa số các quần thể. Nghiên cứu của Conley và Howard tiến hành từ năm 1990 đến năm 2001 cho thấy tuổi chẩn đoán trung bình là 35 tháng [35]. Trong khi đó, nghiên cứu ở Iran năm 2006, tác giả Moin và cộng sự cũng báo cáo rằng tuổi chẩn đoán ở người Iran đã giảm đáng kể trong vòng 30 năm qua [36]. Hơn nữa, tuổi chẩn đoán cũng phụ thuộc nhiều vào tiền sử gia đình. Nhóm nghiên cứu đã giải thích có thể do đã được nâng cao hiểu biết về bệnh và lưu ý tới tiền sử gia đình nên bệnh nhân đã được phát hiện bệnh sớm hơn so với trước kia.

Nghiên cứu của tác giả Winkelstein và cộng sự báo cáo tuổi chẩn đoán trung bình của những bệnh nhân có tiền sử trong gia đình có người bị nhiễm khuẩn nặng hoặc suy giảm miễn dịch là 2,6 tuổi, trong khi những bệnh nhân không có tiền sử gia đình là 5,4 tuổi [17]. Cũng cần lưu ý rằng sự khởi phát

bệnh cũng có thể thay đổi giữa các thành viên khác nhau trong một gia đình mang cùng một đột biến gen *BTK* [37] [38] [39]. Điều này chứng minh rằng các yếu tố khác có thể ảnh hưởng đến mức độ cũng như thời điểm bị nhiễm khuẩn của bệnh nhân XLA.

1.5.2. Bệnh lý nhiễm trùng

Các vi sinh vật gây nhiễm trùng cho bệnh nhân XLA rất đa dạng. Trong đó, các vi khuẩn sinh mủ là hay gặp nhất, sau đó tới các vi khuẩn khác, vi khuẩn không điển hình, virus, và đôi khi là nấm.

➤ Nhiễm vi khuẩn và vi khuẩn không điển hình

Nhiễm khuẩn là biến chứng chính của bệnh XLA cũng như các bệnh SGMD thể dịch khác [17]. Các vi khuẩn có vỏ, chủ yếu là Phế cầu (*Streptococcus pneumoniae*) và *Haemophilus influenza* là những mầm bệnh thường gặp nhất trong các bệnh nhân bị SGMD thể dịch, phản ánh vai trò quan trọng của kháng thể trong quá trình kháng lại các vi khuẩn có vỏ.

Các vi khuẩn thường gặp khác là *Staphylococcus aureus*; *Pseudomonas* spp. (bao gồm: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas fluorescens*); *Mycoplasma* spp. (bao gồm: *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma pneumoniae*); *Enterobacter*, *Campylobacter*. Rất hiếm gặp nhưng đôi khi bệnh nhân XLA còn bị nhiễm trùng nặng do các vi khuẩn gây nhiễm khuẩn cơ hội như: *Pneumocystis jirovecii* và các loại nấm [6], [40]. Các căn nguyên vi khuẩn trên có thể gây nhiễm trùng ở nhiều cơ quan khác nhau, chủ yếu là viêm tai giữa, viêm xoang và viêm phổi.

Đa số bệnh nhân XLA đã từng bị viêm tai giữa và viêm xoang mạn tính điều trị dai dẳng. Thậm chí, có những bệnh nhân đã được can thiệp ngoại khoa để điều trị viêm xoang, nhưng kết quả không làm giảm mức độ nhiễm khuẩn tái phát [6].

➤ Nhiễm virus

Đột biến gen *BTK* chỉ gây giảm protein Bruton Tyrosin Kinase của tế bào lympho B mà ko ảnh hưởng tới số lượng tế bào lympho T. Do vậy, bệnh nhân XLA chủ yếu chỉ bị ảnh hưởng miễn dịch thể dịch. Đa số bệnh nhân XLA nhiễm virus vẫn có khả năng tạo ra các đáp ứng miễn dịch để diệt và loại bỏ virus khỏi cơ thể [41]. Bệnh nhân thường vẫn có khả năng chống lại các virus trong họ herpes như cytomegalovirus (CMV), Varicella, hoặc virus Epstein-Barr (EBV) gây ra những vấn đề nặng ở bệnh nhân XLA [35].

Mặc dù ít bị nhiễm bệnh do các virus nhưng bệnh nhân XLA lại rất nhạy cảm với nhóm Enterovirus (EV): Poliovirus, Echoviruses và Coxsackievirus. Các virus này có thể gây viêm màng não mạn tính và đôi khi gây hội chứng viêm da cơ [42],[43]. Tỷ lệ nhiễm khuẩn Enterovirus mạn tính ngày nay giảm đáng kể so với thời kỳ 20 đến 30 năm trước đây. Điều này có thể do bệnh nhân được duy trì nồng độ bình thường của IgG huyết thanh bằng các chế phẩm Gammaglobulin miễn dịch. Tuy nhiên, một số báo cáo đã cho thấy bệnh nhân vẫn bị viêm não do EV mặc dù đã được điều trị thay thế kháng thể trong máu [43]. Một số bệnh nhân khác cũng xuất hiện các biểu hiện tổn thương thần kinh mà không xác định được nguyên nhân [44]. Xét nghiệm dịch não tủy có thể tăng số lượng tế bào lympho, tăng Protein và giảm Glucose. Xét nghiệm PCR dịch não tủy có thể xác định Enterovirus nhưng nhiều trường hợp PCR âm tính, đặc biệt ở những bệnh nhân đang được điều trị Gammaglobulin liều cao. Chẩn đoán hình ảnh trong giai đoạn cấp có thể khó phát hiện tổn thương nhưng theo dõi và chụp lại sau một thời gian có thể thấy hình ảnh teo não ở cả chất xám và chất trắng [43].

Điều trị cho bệnh nhân viêm não mạn tính do Enterovirus rất khó khăn. Hầu hết các bác sĩ đều đồng ý rằng liều cao IVIG có tác dụng tốt trong điều trị. Tuy nhiên, một số bệnh nhân vẫn tiếp tục tiến triển nặng mặc dù điều trị

IVIG mạnh [44]. Thuốc Ribavirin được xem là một giải pháp điều trị diệt virus nhưng nhiều nghiên cứu cũng chỉ ra rằng thuốc không thể làm sạch virus trong nhu mô não của bệnh nhân [45],[46].

Không giống như bệnh lý nhiễm khuẩn do dị dạng bẩm sinh tại một cơ quan, bệnh nhân XLA có biểu hiện nhiễm khuẩn tái diễn ở nhiều cơ quan khác nhau, thường nặng và tái phát nhiều đợt:

➤ Nhiễm khuẩn hô hấp

Viêm phổi là một trong những bệnh khiến trẻ XLA khi chưa được chẩn đoán phải nhập viện thường xuyên. Các vi khuẩn có vỏ vẫn là nguyên nhân chủ yếu gây viêm phổi. Ngoài ra, một số nghiên cứu cho thấy tỷ lệ viêm phổi do Mycoplasma ở bệnh nhân SGMD thể dịch tăng cao hơn so với các bệnh nhân có hệ miễn dịch bình thường. Một trường hợp viêm phổi do sởi đã được báo cáo ở bệnh nhân XLA [17].

Hậu quả của những đợt viêm phổi nặng, viêm phổi mạn tính dẫn tới biến chứng bệnh phổi mạn tính, một trong những nguyên nhân gây tử vong sớm ở bệnh nhân XLA. Đó là bệnh giãn phế quản, bệnh lý phổi kẽ. Một số nghiên cứu cho thấy một số bệnh nhân đã bị giãn phế quản vào thời điểm chẩn đoán bệnh [47],[48]. Điều này liên quan chặt chẽ tới việc chẩn đoán muộn [6]. Tuy nhiên, các nghiên cứu cũng thấy rằng, các mô phổi mạn tính cũng có thể do các rối loạn tự miễn dịch và rối loạn về biệt hoá của các tế bào lympho. Những tổn thương phổi mạn tính này vẫn sẽ tiếp tục tiến triển ngay cả khi bệnh nhân được điều trị thay thế IVIG [6],[47],[48]. Vì vậy, cần phải chẩn đoán sớm bệnh nhân khi chưa có những tổn thương phổi mạn tính.

➤ Viêm xoang và viêm tai giữa mạn tính

Nhiễm khuẩn tai mũi họng và xoang là một trong những nhiễm khuẩn thường gặp nhất ở bệnh nhân XLA. Trước khi được chẩn đoán bệnh Suy giảm miễn dịch, trẻ thường viêm tai giữa, viêm xoang liên tục, không đáp ứng với

điều trị kháng sinh. Rất nhiều bệnh nhân đã được can thiệp ngoại khoa để điều trị viêm xoang, nhưng sau phẫu thuật, trẻ vẫn nhiễm khuẩn liên tục [6].

➤ Nhiễm khuẩn đường tiêu hoá

Bệnh nhân XLA thường bị các biến chứng đường tiêu hóa. Tiêu chảy mạn tính hoặc tái phát là biểu hiện lâm sàng phổ biến nhất, đôi khi đi kèm với giảm hấp thu và chậm tăng cân. *Giardia lamblia* là căn nguyên gây bệnh khá phổ biến. Winkelstein và cộng sự báo cáo 12 trong số 46 bệnh nhân XLA bị tiêu chảy mạn tính hoặc tái phát có nhiễm *Giardia lamblia* [17]. Ở những bệnh nhân này, *Giardia* có thể không gây đau bụng và tiêu chảy điển hình. Thay vào đó là tình trạng mệt mỏi và nồng độ IgG trong máu giảm thấp một cách bất thường, gợi ý dấu hiệu ban đầu của nhiễm trùng. Thường rất khó để điều trị loại trừ được hết *Giardia* trong đường tiêu hoá của bệnh nhân.

Ngoài ra các vi khuẩn hay gặp khác là vi khuẩn Gram âm *Campylobacter jejuni* với biểu hiện ỉa chảy, có thể kèm theo tổn thương da, viêm màng ngoài tim. Biểu hiện tiêu chảy do *Campylobacter* rất thay đổi: có thể ỉa chảy rầm rộ hoặc chậm và ít triệu chứng. Đối với những trẻ khoẻ mạnh, nhiễm *Campylobacter* có thể lành tính, tự khỏi nhanh chóng mà không cần điều trị kháng sinh nhưng bệnh nhân XLA, sự bài tiết *C.jejuni* trong phân nếu không được điều trị có thể kéo dài hơn 2 đến 3 tuần [49].

Các tác nhân gây bệnh khác được phát hiện ở bệnh nhân viêm đại tràng bao gồm: Rotavirus, *Campylobacter*, Enterovirus, *Salmonella* spp. và *Clostridium difficile* [17].

➤ Viêm kết mạc

Nhiều báo cáo đã cho thấy tỷ lệ viêm kết mạc cấp tính và/hoặc mạn tính khá cao (từ 8 đến 20%) đối với bệnh nhân mắc bệnh XLA [6],[17]. Tác nhân gây bệnh chỉ được phân lập trong một số trường hợp, thường là *Haemophilus influenza*, đôi khi cũng gặp viêm kết mạc do *Chlamydia trachomatis*. Viêm kết mạc đôi khi có biến chứng nặng như viêm giác mạc và loét giác mạc [6],[22],[50].

➤ Nhiễm trùng da

Mặc dù nhiễm khuẩn ngoài da ít gặp hơn các loại nhiễm khuẩn khác ở bệnh nhân XLA nhưng những biến chứng như viêm mô tế bào, áp xe ở bệnh nhân XLA khá cao (từ 18 đến 27% bệnh nhân XLA bị nhiễm khuẩn ngoài da [6] [17]. Các vi khuẩn có thể gặp đứng đầu là tụ cầu, sau đó tới *Helicobacter* và *Campylobacter*.

➤ Viêm màng não

Viêm màng não do nhiễm khuẩn đôi khi xảy ra ở bệnh nhân XLA. Các vi khuẩn chủ yếu do *Streptococcus pneumoniae* và *Haemophilus influenzae* tuýp b (3-4% bệnh nhân XLA) [6].

➤ Nhiễm khuẩn huyết

Bệnh nhân suy giảm miễn dịch thể dịch nặng như XLA có nhiều nguy cơ bị nhiễm khuẩn huyết, đặc biệt là trước khi chẩn đoán và điều trị thay thế Immunoglobulin. Khoảng 6 đến 10% bệnh nhân bị XLA đã được báo cáo là có các đợt nhiễm khuẩn huyết, nhiều hơn so với tỷ lệ nhiễm khuẩn huyết ở bệnh nhân suy giảm miễn dịch bẩm sinh nói chung là 1%. Các vi khuẩn thường phân lập được là *Pseudomonas* spp., *Streptococcus pneumoniae* và *Haemophilus influenzae* [6] [17]. Nhiễm trùng huyết có ổ nguyên phát từ khớp hoặc tuỷ xương cũng khá phổ biến ở bệnh nhân XLA (3% bệnh nhân XLA) [17].

1.5.3. Bệnh lý khớp

Cơ chế gây tổn thương khớp ở bệnh nhân XLA rất phức tạp. Tổn thương này khá phổ biến trong những năm 1960 và 1970 nhưng ít phổ biến hiện nay.

Trái lại với các bệnh lý nhiễm khuẩn chiếm ưu thế ở các cơ quan khác như đường hô hấp, tiêu hoá, bệnh nhân XLA thường ít gặp viêm khớp nhiễm khuẩn hơn so với viêm khớp vô khuẩn. Các vi khuẩn: Phế cầu, Tụ cầu... gây ra biểu hiện nhiễm khuẩn rầm rộ, sưng, nóng, đỏ đau và hạn chế vận động, biểu hiện nhiễm khuẩn toàn thân nặng, đôi khi gây nhiễm khuẩn huyết [35].

Các vi khuẩn không điển hình cũng có thể gây viêm khớp mạn tính [51]. Triệu chứng lâm sàng rất đa dạng: viêm một khớp: khớp gối, khớp vai, khớp khuỷu tay hoặc nhiều khớp, thường đối xứng. Các vi khuẩn đã được phân lập từ dịch khớp của những bệnh nhân bị bệnh là: *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma felis*, *Mycoplasma orale* và *Mycoplasma salivarium* [51]. Các triệu chứng lâm sàng đôi khi khá giống với viêm khớp dạng thấp, vì vậy, trong những trường hợp nghi ngờ, khi cần phải xét nghiệm dịch khớp để chẩn đoán phân biệt [51].

Trong các nguyên nhân gây viêm khớp, viêm khớp không nhiễm khuẩn thường gặp, biểu hiện tại những khớp lớn, gây sưng khớp nhưng ít đau [16]. Viêm khớp thường không gây phá huỷ khớp và đáp ứng điều trị Gammaglobulin. Nghiên cứu của Quartier và cộng sự cho thấy nồng độ IgG đáy trên 8 g/L có liên quan đến cải thiện triệu chứng lâm sàng rõ rệt hơn so với nhóm có nồng độ IgG đáy từ 5 tới 8 g/L [48]. Mặc dù biểu hiện khớp sưng nóng như phản ứng viêm nhưng các xét nghiệm như tốc độ máu lắng, yếu tố dạng thấp, kháng thể kháng nhân bình thường. Ngoài ra, bệnh nhân XLA cũng có thể viêm khớp dạng thấp không điển hình do kích hoạt các tế bào CD8 và viêm khớp vẩy nến [52] [53].

1.5.4. Bệnh lý tự miễn

Tỷ lệ bệnh nhân XLA mắc các bệnh tự miễn tương đối thấp so với các bệnh suy giảm miễn dịch thể dịch khác. Chỉ có một vài trường hợp được báo cáo lẻ tẻ: ĐTĐ type 1, viêm khớp vẩy nến [52] [53] [54]. Tuy nhiên, bệnh lý ruột viêm (IBD) hoặc bệnh lý ruột do mất protein có các đặc điểm tương tự như IBD có thể thấy ở 5 đến 10% bệnh nhân XLA hoặc các thể SGMD thể dịch do gen lặn nằm trên NST thường khác [55]. Ở một số bệnh nhân giảm Gammaglobulin máu, các dấu hiệu cổ điển của bệnh lý ruột viêm có thể sau nhiễm *Giardia*, *Enterovirus*. Sau khi vi sinh vật đã bị tiêu diệt, bệnh nhân có

thể tiếp tục giảm cân, đau bụng. Để kiểm soát các biểu hiện tự miễn, bệnh nhân cần được sử dụng Corticoid và các thuốc ức chế miễn dịch. Đôi khi cần phải sử dụng liệu pháp chống yếu tố hoại tử u (Tumor Necrosis Factor). Tuy nhiên, các thuốc này lại cũng có thể ảnh hưởng tới hệ miễn dịch vốn đã rất yếu ớt của bệnh nhân suy giảm miễn dịch [55] [56]. Vì vậy, cần phải cân nhắc kĩ trước khi đưa ra quyết định điều trị cho bệnh nhân.

1.5.5. Bệnh lý huyết học và bệnh lý ác tính

Các rối loạn về huyết học ở bệnh nhân XLA chủ yếu là biểu hiện trong giai đoạn nhiễm khuẩn cấp tính. Nghiên cứu ở Anh trên 44 bệnh nhân XLA, có 18% trẻ XLA có các biến chứng về huyết học: giảm bạch cầu lympho gặp ở 11% bệnh nhân, giảm bạch cầu trung tính gặp ở 41% bệnh nhân [56].

Có một số bằng chứng về sự gia tăng tỷ lệ ung thư biểu mô dạ dày ruột ở những bệnh nhân bị XLA. Van der Meer và Brosens trong hai nghiên cứu độc lập đã mô tả ba bệnh nhân XLA bị ung thư biểu mô tuyến tiền liệt và hai bệnh nhân ung thư biểu mô đại tràng. Ngoài ra, còn một số báo cáo bệnh nhân XLA bị ung thư dạ dày, ung thư biểu mô tuyến tiền liệt [57] [58].

Nguyên nhân tăng nguy cơ ung thư dạ dày-ruột ở những bệnh nhân bị XLA vẫn còn chưa rõ ràng. Một số quan điểm cho rằng nhiễm trùng mạn tính có thể dẫn đến chứng viêm và chứng loạn sản [57]. Tuy nhiên, không phải tất cả những bệnh nhân này đều bị nhiễm trùng đường tiêu hóa mạn tính. Một số giả thiết cho rằng thay đổi hệ vi sinh ruột do nhiễm khuẩn kéo dài và điều trị điều trị kháng sinh cũng làm tăng nguy cơ ung thư đường tiêu hoá.

Ngoài ra, một số bệnh nhân XLA với các khối u ác tính khác đã được báo cáo: u tuyến yên, ung thư phổi [15] [59].

1.5.6. Tiền sử gia đình

XLA là bệnh do đột biến gen lặn nằm trên nhiễm sắc thể giới tính X nên có tính chất di truyền. Nhiều gia đình khi nghiên cứu phả hệ thấy rõ 4 – 5 thế hệ có những người nam giới mắc bệnh nhiễm khuẩn tái phát và tử vong

sớm trong tình trạng nhiễm khuẩn nặng. Các nghiên cứu cho thấy có khoảng 1/3 tới 1/2 các trường hợp có tiền sử gia đình mắc bệnh. Tác giả Winkelstein và cộng sự nghiên cứu 148 bệnh nhân sinh năm 1988 tới năm 1997: 38% có tiền sử gia đình có người mắc bệnh XLA hoặc tử vong sớm do nhiễm khuẩn tái phát. Nghiên cứu của Esenboga tại Thổ Nhĩ Kỳ năm 2018 là 47% [60].

1.6. Đặc điểm cận lâm sàng

1.6.1. Nồng độ kháng thể

Do có sự sụt giảm rõ rệt số lượng tế bào lympho B trưởng thành trong máu ngoại vi nên khả năng sản xuất kháng thể cũng bị giảm rõ rệt. Theo tiêu chuẩn chẩn đoán của hiệp hội suy giảm miễn dịch Mỹ và Châu Âu năm 1999, nồng độ kháng thể IgA, IgG và IgM của bệnh nhân XLA nhỏ hơn -2SD so với trẻ cùng độ tuổi [12].

Bệnh nhân XLA thường có nồng độ IgG dưới 2 g/L. Đa số khi phát hiện bệnh, nồng độ IgG rất thấp, có thể không đo được. Chỉ có 10% bệnh nhân có nồng độ trên 2 g/L.

Nồng độ IgM và IgA thường dưới 0,2 g/L. Dấu hiệu giảm IgM là một dấu hiệu quan trọng do giảm IgG và IgA có thể gặp ở trẻ chậm sản xuất globulin miễn dịch sinh lý. Trong khi giảm IgM thường gặp trong bệnh cảnh suy giảm miễn dịch bẩm sinh.

1.6.2. Công thức máu ngoại vi

Công thức máu cơ bản cần được thực hiện ở tất cả những bệnh nhân suy giảm miễn dịch tiên phát. Mặc dù cơ chế bệnh sinh của XLA là giảm số lượng tế bào lympho B nên số lượng bạch cầu trung tính, bạch cầu ái toan, ái kiềm, hồng cầu và tiểu cầu không bị ảnh hưởng. Tuy nhiên, công thức máu vẫn có vai trò quan trọng, giúp xác định mức độ nhiễm trùng và có thể loại trừ một số bệnh suy giảm miễn dịch tiên phát khác như: giảm bạch cầu hạt trung tính, suy giảm miễn dịch trầm trọng phối hợp.

Một số trường hợp bệnh nhân XLA đã có tiền sử giảm bạch cầu hạt trung tính, đặc biệt trong đợt nhiễm khuẩn và được chẩn đoán nhầm với bệnh giảm bạch cầu hạt bẩm sinh. Vi khuẩn *Pseudomonas* và tụ cầu là hai loại vi khuẩn thường gây giảm bạch cầu hạt trung tính nặng ở bệnh nhân XLA [35] [61].

Trong nghiên cứu của chúng tôi, tổng số lượng bạch cầu lympho trong máu ngoại vi trong giới hạn bình thường so với tuổi là $3,78 \pm 2,25$ G/L. Như vậy, khác với thể suy giảm miễn dịch bẩm sinh thể trầm trọng kết hợp, bệnh nhân XLA không thể phát hiện dựa vào công thức máu ngoại vi để chẩn đoán sơ bộ mà phải dựa vào nồng độ kháng thể [11] [35] [62].

1.6.3. Số lượng tế bào lympho dưới nhóm

Bình thường, số lượng tế bào lympho B dao động theo tuổi của bệnh nhân nhưng trung bình chiếm 5-15% số lượng tế bào lympho trong máu ngoại vi [63]. Đối với bệnh nhân XLA, các tế bào lympho B không thể biệt hoá thành các tế bào lympho B trưởng thành nên số lượng tế bào lympho B ra máu ngoại vi rất ít hoặc thậm chí bằng không.

Số lượng tế bào lympho B có thể xác định bằng xét nghiệm phát hiện dấu ấn màng tế bào bằng hệ thống phân tích dòng chảy tế bào - Flow Cytometry. Nguyên lý của kỹ thuật là sử dụng chùm tia laser phát hiện ra các kháng thể gắn huỳnh quang được gắn lên các dấu ấn màng tế bào máu. Nhờ đó nhận biết các tế bào mang các dấu ấn bề mặt (hay còn gọi là kháng nguyên bề mặt), giúp xác định chính xác loại và số lượng từng loại tế bào. Dựa vào nguyên lý này, các nhà miễn dịch học đã ứng dụng để xác định số lượng các dòng tế bào: lympho T (CD3+, CD4+, CD8+), lympho B (CD19+, CD20+) và các tế bào diệt tự nhiên (CD56+) và rất nhiều tế bào dưới nhóm khác. Việc xác định được các dấu ấn miễn dịch trên màng tế bào vào những năm 1970 đã mở ra một thời kì mới giúp chứng minh được về bản chất và phân loại các thể của bệnh SGMD tiên phát.

Theo tiêu chuẩn chẩn đoán của hiệp hội suy giảm miễn dịch Mỹ và Châu Âu năm 1999, bệnh nhân XLA có số lượng tế bào lympho B dưới 2%. Hầu hết các bệnh nhân XLA, đặc biệt là những bệnh nhân dưới 10 tuổi, đều có rất ít tế bào B trong máu (<1% tổng số lympho bào). Bên cạnh đó, số lượng lympho T và NK của bệnh nhân XLA bình thường [12].

1.6.4. Phân tích gen *BTK*

Năm 1993, sau khi hai nhà khoa học phát hiện ra đột biến gen *BTK*, các nghiên cứu trên gen này nhanh chóng được phát triển [3] [56]. Công bố gần đây nhất của ngân hàng gen người thế giới (Human gene mutation database – <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>) đã có 874 đột biến khác nhau trên gen *BTK*. Những đột biến này được tìm thấy trên cả exon và intron suốt chiều dài gen và là những đột biến đã được chứng minh là làm giảm số lượng hoàn toàn hoặc mất chức năng của protein Bruton Tyrosine Kinase. Tuy nhiên, mỗi năm, con số các đột biến được tìm thấy và công bố được tăng lên do số lượng bệnh nhân được chẩn đoán ngày càng lớn và nghiên cứu được mở rộng ở các quần thể khác nhau trên toàn thế giới.

Hiện nay, phương pháp phổ biến đang được thực hiện để xác định đột biến trên gen *BTK* là giải trình tự gen. Phương pháp này cho phép xác định hầu hết các đột biến điểm, đột biến mất đoạn nhỏ hoặc lặp đoạn của gen. Đối với bệnh XLA, 95% các trường hợp mắc bệnh cần phải giải trình tự gen *BTK* để phát hiện đột biến điểm: thay thế nucleotid (một hoặc một nhóm nucleotid này bằng một hoặc một nhóm nucleotid khác); đảo nucleotid (đảo vị trí của các nucleotid trong một đơn vị mã hoá); mất nucleotid (mất một hoặc một vài nucleotid) hoặc thêm nucleotid (thêm một hoặc một vài nucleotid) [64]. Tùy kích thước và số lượng các nucleotid bị biến đổi, có thể tạo ra các đột biến: Đột biến sai nghĩa (Missense mutation - loại đột biến này thay đổi một cặp base ADN trong gen dẫn đến kết quả thể một acid amin này bằng acid amin khác

trong protein tạo nên từ gen đó), đột biến vô nghĩa (Nonsense mutation - thay thế một acid amin này bằng acid amin khác, tạo tín hiệu kết thúc tổng hợp chuỗi protein; đột biến lệch khung (Frameshift mutation – do thêm một vài nucleotide làm thay đổi nhóm bộ ba nucleotid và làm lệch khung đọc của gen, tạo ra protein thường không có chức năng).

Phương pháp giải trình tự gen Sanger giúp phát hiện đột biến ở các vùng mã hóa trên gen *BTK*, vùng ranh giới exon-intron, vùng cận promoter. Nghiên cứu đa trung tâm của Alessandrom Plebani và cộng sự tại Ý trên 73 bệnh nhân XLA đã phát hiện 55,6% đột biến điểm, 14,3% làm xuất hiện codon kết thúc sớm, 15,9% đột biến mất đoạn nhỏ, 6,3% đột biến thêm đoạn nhỏ và 7,9% đột biến ở vùng nối [6]. Một số nghiên cứu khác sử dụng phương pháp phân tích đột biến ở mức mARN nên không khảo sát vùng promoter và vùng Intron như nghiên cứu của tác giả Hoàng Anh Vũ năm 2013 [65].

Các đột biến gen *BTK*, ảnh hưởng đến các vùng khác nhau của protein. Khoảng 35% đột biến điểm, dẫn đến sự thay thế acid amin. Các đột biến thay thế acid amin này được phát hiện chủ yếu ở vùng kinase, đặc biệt là ở phần đầu C của vùng kinase. Một số đột biến thay thế acid amin cũng có thể được phát hiện ở các vùng PH và SH2, trong khi vùng TH SH3 ít phát hiện thấy đột biến [66]. Các đột biến tạo mã kết thúc sớm chiếm khoảng 15-20% số đột biến trên gen *BTK*. Đột biến thêm hoặc mất 1 đến 10bp, các loại đột biến dịch khung và tạo mã kết thúc sớm, chiếm tỷ lệ 15-20% các loại đột biến. Một số các nghiên cứu cũng phát hiện các đột biến mất 3bp [67] [68]. Các đột biến tạo codon kết thúc sớm, đột biến ranh giới exon/intron và các đột biến dịch khung xuất hiện trên bất cứ vùng nào của gen *BTK*. Năm 1998, Holinski và cộng sự đã phát hiện 1 đột biến điểm trên vùng promoter. Đột biến trên vùng promoter là các đột biến rất hiếm gặp, chỉ chiếm khoảng một vài phần trăm trên gen *BTK* và trên các gen khác [69].

Đột biến mất đoạn lớn trên gen *BTK*, có kích thước từ 2 kb trở lên, được thấy ở khoảng 5% các bệnh nhân XLA. Một số đột biến mất đoạn lớn có thể kèm theo mất đoạn các gen lân cận như *TIMM8A*, *TAF7L* và *DRP2* [70] [71]. Đột biến mất đoạn bao gồm phần 3' của gen *BTK* hầu như không xóa được gen *TIMM8A*, đây là gen cách 1 kb sau exon 19 của gen *BTK* (hình 1: vị trí gen *BTK*). Một số bệnh nhân XLA có đột biến mất đoạn gen *BTK* có kèm theo mất đoạn gen *TIMM8A* thường có biểu hiện điển, chủ yếu do viêm tai giữa hoặc sử dụng kháng sinh gây độc. Một số đột biến lặp hai hoặc nhiều exon trên gen *BTK* và đột biến đảo đoạn ít nhất 48kb xảy ra giữ exon 4 và 5 cũng đã được công bố bởi tác giả Rohrer vào năm 1999 [72]. Năm 2005, hai bệnh nhân XLA của hai gia đình khác nhau đã được phát hiện có đột biến chèn đoạn exon 9 trên gen *BTK*, nhưng cấu trúc đột biến chèn đoạn của hai bệnh nhân này khác nhau [73].

Một số nghiên cứu trước đây cho rằng không có sự tương quan giữa đột biến đặc hiệu trong *BTK* và mức độ nặng của bệnh [74]. Tuy nhiên, phân tích số lượng lớn bệnh nhân cho thấy một số đột biến có xu hướng dẫn đến độ tuổi chẩn đoán cao hơn, nồng độ Globulin miễn dịch giảm ít hơn và số lượng tế bào lympho B giảm nhẹ hơn so với các đột biến khác. Đột biến thay thế acid amin vẫn cho phép sản xuất một số protein BTK. Các đột biến vùng cắt nối exon/intron làm thay đổi toàn bộ trình tự gen và mRNA kể từ điểm đột biến, vì vậy, có khả năng sẽ tạo ra chuỗi protein bất hoạt dẫn đến không tổng hợp được protein BTK [6] [7-8]. Điều này đưa ra giả thuyết rằng có sự thay đổi các yếu tố di truyền hoặc yếu tố môi trường ảnh hưởng đến mức độ nặng của bệnh.

1.6.5. Chẩn đoán hình ảnh

Chụp X-quang phổi hoặc cắt lớp CT-scan phổi độ phân giải cao cho bệnh nhân XLA có thể giúp xác định sớm bệnh giãn phế quản của bệnh nhân. Thường tổn thương giãn phế quản gặp ở thùy giữa và dưới với hình ảnh ứ khí

Commented [VANT1]: Thấy 2

và dày thành phế quản. CT-scan xoang giúp chẩn đoán tình trạng viêm xoang mạn tính rất thường gặp ở bệnh nhân XLA.

1.7. Điều trị

Suy giảm miễn dịch thể không có Gammaglobulin máu liên kết nhiễm sắc thể X là một bệnh suy giảm miễn dịch thể dịch nặng, tồn tại suốt đời. Vì vậy, bệnh nhân cần điều trị thay thế kháng thể thường xuyên, liên tục và kéo dài. Bên cạnh đó, cũng như các thể suy giảm miễn dịch tiên phát khác, bệnh nhân cũng cần được chăm sóc, vệ sinh, phát hiện sớm và điều trị các biến chứng, các bệnh lý tự miễn đi kèm. Trên thế giới, một số trung tâm lớn đã áp dụng điều trị ghép tế bào gốc tạo máu, liệu pháp gen để điều trị bệnh XLA. Tuy nhiên, các kết quả này còn nhiều hạn chế. Do vậy, cho tới nay, điều trị Gammaglobulin vẫn là điều trị quan trọng nhất, giúp thay đổi chất lượng sống của hầu hết bệnh nhân suy giảm miễn dịch thể dịch.

1.7.1. Liệu pháp điều trị thay thế Globulin miễn dịch

Liệu pháp thay thế Immunoglobulin miễn dịch là điều trị cơ bản và xuyên suốt trong quá trình điều trị bệnh XLA. Mục đích của việc điều trị là cung cấp cho cơ thể liệu pháp miễn dịch thụ động, thay thế lượng Gammaglobulin mà cơ thể bệnh nhân không thể sản xuất, duy trì nồng độ ổn định trong máu nhằm bảo vệ cơ thể chống lại các tác nhân gây bệnh.

Liệu pháp thay thế Globulin miễn dịch ra đời từ năm 1952, sau khi bệnh nhân suy giảm miễn dịch thể XLA đầu tiên được Đại tá Bruton phát hiện [75]. Đầu thập niên 80, quy trình sản xuất mới đã được phát triển để tạo ra Immunoglobulin tinh sạch sử dụng đường truyền tĩnh mạch. Hiện nay đã có chế phẩm tiêm dưới da sử dụng ở nhiều nước trên thế giới [76]. Tuy nhiên, phương pháp này vẫn có một số nhược điểm nên điều trị Gammaglobulin bằng đường tĩnh mạch vẫn được duy trì và là chỉ định đầu tay cho bệnh nhân SGMD thể dịch nói chung và XLA nói riêng.

➤ Thành phần và cơ chế tác dụng của Immunoglobulin

Thành phần chính của Immunoglobulin là Immunoglobulin G (IgG), được chiết xuất từ huyết thanh của người cho khoẻ mạnh. Sau khi thu thập huyết thanh từ người cho, sàng lọc và loại trừ các bệnh truyền nhiễm, huyết thanh sạch của vài chục nghìn người được trộn chung và tiếp tục xử lý tại các nhà máy được, tinh chế để chỉ còn chủ yếu là IgG. Do đó, sản phẩm Gammaglobulin có chứa kháng thể đặc hiệu chống lại rất nhiều loại vi sinh vật khác nhau mà những người cho khoẻ mạnh đã sinh ra sau khi đáp ứng miễn dịch với vi sinh vật đó.

Trong đó, dạng đơn phân (monomeric) chiếm 90 – 99%, còn lại là dạng đồng phân đôi (dimeric). Thành phần IgG dưới nhóm (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) trong cả sản phẩm Gammaglobulin đường tiêm tĩnh mạch hay tiêm dưới da đều có tỷ lệ tương tự như trong huyết thanh người bình thường). Ngoài ra, còn có một lượng nhỏ IgA và IgM [77].

Các sản phẩm IgG không chỉ chứa các kháng thể vô hiệu hoá vi khuẩn và vi rút mà còn chứa các phân tử điều hòa miễn dịch có thể làm thay đổi chức năng miễn dịch, chẳng hạn như các kháng thể kháng tự kháng thể; T cell receptor, các tế bào T CD4, CD5, Fas, BAFF, và HLA tự do; các cytokine receptor như IL-1, IL-6; yếu tố hoại tử u (TNF-alpha), chemokine receptor, các phân tử sialic acid binding Ig-like lectin (Siglec)-8 and -9 hoặc các phân tử MHC (major histocompatibility complex); các kháng thể tự nhiên dưới nhóm của IgG chống lại FcγRIII (CD16) and FcγRII (CD32) và kháng thể trung hòa bổ thể và các cytokine tiền viêm [78],[79],[80]. Do đó, các sản phẩm IgG không những cung cấp IgG còn thiếu cho cơ thể mà còn là liệu pháp điều hòa chức năng miễn dịch.

➤ Immunoglobulin đường tiêm tĩnh mạch (IVIG)

Ngay từ đầu thập niên 80, các quy trình sản xuất đã phải tuân thủ nghiêm ngặt để tạo ra Immunoglobulin tinh sạch có thể truyền trực tiếp vào tĩnh mạch và đảm bảo không truyền bệnh cho bệnh nhân. Chế phẩm IVIG sẽ nhanh chóng cung cấp một lượng lớn Gammaglobulin vào cơ thể bệnh nhân, giúp cơ thể chống lại các căn nguyên nhiễm trùng.

Một nhược điểm chung của các sản phẩm IVIG là có hàm lượng IgA, IgM rất thấp do các nhà sản xuất IVIG cố gắng loại bỏ IgA và IgM của người cho để tránh khi vào cơ thể bệnh nhân sẽ nhanh chóng tạo thành các phức hợp miễn dịch, gây ra các phản ứng quá mẫn, dị ứng và các phản ứng phụ nghiêm trọng [81],[82]. Hơn nữa, IgA huyết thanh của người hiến tặng chủ yếu là dạng đơn phân - monomeric, trong khi chỉ có IgA ở phổi và niêm mạc dưới dạng đa phân - polyme mới có tác dụng bảo vệ bề mặt niêm mạc [83]. Vì vậy, mặc dù chế phẩm IVIG có chứa nhiều IgG, giúp bảo vệ cơ thể khỏi các bệnh nhiễm khuẩn xâm lấn, nhưng do sự thiếu hụt của IgA và IgM, nhiều bệnh nhân vẫn bị nhiễm trùng niêm mạc thường xuyên [84].

✓ *Liều lượng*

Hầu hết các hướng dẫn thực hành đều khuyến cáo liều khởi đầu của IgG từ 0,4 đến 0,6 g/kg cân nặng/mỗi 3-4 tuần. Nồng độ IgG đáy là nồng độ IgG đo được trong máu bệnh nhân trước mỗi chu kỳ truyền IVIG.

Thông thường, cứ mỗi 0,1 g/kg cân nặng IVIG truyền vào cơ thể sẽ nâng được nồng độ IgG huyết thanh lên 2,5 g/L [85]. IgG thay thế có thể được truyền 1 lần sau mỗi 3 đến 4 tuần (dạng tiêm tĩnh mạch).

Trước đây vào những năm 1980, nồng độ IgG đáy được khuyến cáo là 5 g/L vì các nghiên cứu chỉ ra rằng nồng độ IgG như vậy có thể đủ để chống lại các đợt nhiễm trùng nghiêm trọng [86]. Nhiều nghiên cứu cho thấy số lượng và thời gian nhiễm trùng cải thiện đáng kể khi IgG được cho liều cao

hơn (0,6 g/kg cân nặng đối với người lớn và 0,8 g/kg cân nặng đối với trẻ em) so với liều chuẩn [87]. Một số người có thể cần liều IgG cao hơn để duy trì nồng độ IgG trong huyết thanh cao hơn, ví dụ, lớn hơn 8 g/L, đặc biệt ở những người có nồng độ IgG rất thấp, viêm phổi tái phát hoặc tổn thương phổi cấu trúc (ví dụ như giãn phế quản). Phân tích cộng gộp cho thấy tỷ lệ mắc bệnh viêm phổi ở bệnh nhân có nồng độ đáy IgG là 10 g/L giảm gấp 5 lần so với bệnh nhân có IgG đáy là 5 g/L [88],[89].

Một số trường hợp cần IVIG liều cao hơn là những bệnh nhân SGMD thể dịch có kèm theo giãn phế quản. Trong thực hành lâm sàng, những bệnh nhân SGMD tiên phát có giãn phế quản thường được điều trị liều Gammaglobulin cao hơn so với các bệnh nhân khác, mặc dù có rất ít dữ liệu chỉ ra rằng mức độ IgG huyết thanh kết hợp với việc dự phòng có thể thay đổi tiến triển của sự phá hủy đường thở nhỏ trong SGMD tiên phát. Bệnh nhân XLA bị giãn phế quản có thể cần liều thay thế Globulin miễn dịch gấp đôi so với bệnh nhân không có giãn phế quản, để đạt được mức IgG huyết thanh tương đương. Nguyên nhân có thể do tăng mất hoặc tăng dị hóa tại chỗ của IgG [90].

Gần đây, khái niệm về nồng độ IgG sinh học cá thể hoá, là mức IgG huyết thanh tối thiểu cần thiết để ngăn ngừa nhiễm khuẩn ở từng bệnh nhân, đã được đề cập [91]. Y học cá thể hóa là một xu hướng phát triển và sáng tạo trong y học hiện đại. Khái niệm này dựa trên việc nhận ra rằng nồng độ IgG huyết thanh bình thường khác nhau giữa các cá thể, và nồng độ IgG máu có hiệu quả chống nhiễm khuẩn cũng khác nhau. Để xác định mức IgG sinh học, bệnh nhân SGMD thể dịch được dùng 0,4-0,6 g/kg cân nặng mỗi 4 tuần để đạt được nồng độ IgG huyết thanh đáy 6,5 g/L. Sau đó, bằng cách thiết lập mức IgG để chống lại nhiễm trùng, nếu bệnh nhân ổn định không bị nhiễm khuẩn, liều thuốc đó sẽ được duy trì cho bệnh nhân. Nếu trẻ vẫn còn nhiều các đợt nhiễm khuẩn, liều IVIG sẽ được tăng dần lên để đạt được mức IgG sinh học mong

muốn để giảm thiểu tối đa nhiễm khuẩn. Có những bệnh nhân phải giữ nồng độ IgG sinh học lên tới 9 g/L mới đảm bảo sức khoẻ [92],[93]. Tuy nhiên phương pháp điều trị cá thể hoá này khó áp dụng trong điều kiện đông bệnh nhân.

✓ Hiệu quả điều trị IVIG

Hiệu quả điều trị IVIG thay đổi nhiều giữa các nghiên cứu, phụ thuộc vào thời điểm bệnh nhân được chẩn đoán, biến chứng đã có khi được chẩn đoán, chăm sóc và liều lượng Gammaglobulin được sử dụng.

Nghiên cứu tiền cứu theo dõi 201 bệnh nhân SGMD trong đó 101 bệnh nhân XLA trong vòng 5 năm của nhóm tác giả người Ý cho thấy khi được truyền IVIG đều đặn, 24% bệnh nhân XLA không bị các đợt nhiễm trùng, tần suất viêm phổi giảm rõ rệt và ổn định theo thời gian [94].

Nghiên cứu so sánh trước điều trị 1 năm và sau điều trị 29 bệnh nhân bị suy giảm miễn dịch thể dịch tại Thổ Nhĩ Kỳ cho thấy rằng: với nồng độ IgG đáy trong máu từ 4,1 tới 9 g/L, số đợt nhiễm khuẩn đường hô hấp trung bình trên mỗi bệnh nhân giảm đáng kể từ 10,2 xuống còn 2,5 đợt/bệnh nhân/năm. Số đợt và thời gian nằm viện điều trị nhiễm khuẩn giảm tương ứng từ 1,36 đợt/năm đến 0,21 đợt/năm và 16,35 ngày/bệnh nhân/năm đến 6,33 ngày/bệnh nhân/năm. Trong số mười hai bệnh nhân đã có biểu hiện giãn phế quản trước khi bắt đầu IVIG; 3 bệnh nhân đã được chữa khỏi tình trạng này. Tuy nhiên, các biểu hiện đường tiêu hoá do các nguyên nhân không nhiễm khuẩn không cải thiện đáng kể sau khi điều trị thay thế IVIG [95].

Một số nghiên cứu đã so sánh hiệu quả điều trị của IVIG liều thường qui và liều cao. Một nghiên cứu mù đôi đa trung tâm tại Hà Lan trên 49 bệnh nhân SGMD thể dịch đã so sánh hai nhóm điều trị IVIG: nhóm một sử dụng 0,4 g/kg/mỗi 4 tuần và nhóm hai sử dụng 0,8 g/kg/mỗi 4 tuần. Kết quả thấy rằng nhóm sử dụng liều cao có tỷ lệ và độ nặng của nhiễm khuẩn giảm một cách rõ rệt so với nhóm sử dụng liều thường quy. Ngoài ra, tác dụng phụ của IVIG ở hai nhóm không có sự khác biệt [87].

➤ Immunoglobulin đường tiêm dưới da (SCIG)

Ngày nay, nhiều nước đã sử dụng tiêm Immunoglobulin đường dưới da. Phương pháp này dễ thực hiện, thao tác tiêm đơn giản, bản thân bệnh nhân và người nhà có thể tiến hành định kỳ mỗi một tới hai tuần một lần tại nhà. Chế phẩm Immunoglobulin dưới da sẽ được hấp thu vào máu một cách từ từ, giúp duy trì được nồng độ IgG ổn định trong máu hơn so với truyền Immunoglobulin đường tĩnh mạch [96]. Tuy nhiên, do sử dụng tại nhà nên nhiều bệnh nhân không tuân thủ điều trị, quên thuốc, bỏ thuốc. Hơn nữa, giá thành của sản phẩm mới này còn cao, ít công ty có khả năng sản xuất nên việc sử dụng immunoglobulin đường tiêm dưới da vẫn còn chưa phổ biến. Hơn nữa, chế phẩm hiện chưa sẵn có tại Việt Nam nên việc tiếp cận điều trị theo phương pháp này còn khó khăn.

1.7.2. Điều trị nhiễm trùng

Mặc dù các phương pháp điều trị SGMD tiên phát có nhiều thay đổi, các thuốc kháng sinh, kháng nấm, và thuốc kháng virus vẫn đóng một vai trò quan trọng trong các phác đồ điều trị. Kháng sinh dự phòng được chỉ định cho những thể SGMD tiên phát với thiếu hụt miễn dịch nhẹ, chẳng hạn như thiếu hụt kháng thể chọn lọc, IgG dưới nhóm và/hoặc sự thiếu hụt IgA và chứng gammaglobulin máu thoáng qua của trẻ sơ sinh. Những nhóm bệnh nhân nặng như SGMD tiên phát có tổn thương NK tái diễn dù đã điều trị IVIG, giãn phế quản, sau ghép tế bào gốc tạo máu... cũng cần điều trị kháng sinh dự phòng. Cho tới nay, vẫn không có sự đồng thuận về sử dụng kháng sinh trong điều trị suy giảm miễn dịch, nhưng khảo sát năm 2009 của Viện Nghiên cứu dị ứng, hen, và miễn dịch học Hoa Kỳ cho thấy 90,2% các nhà miễn dịch học lâm sàng sử dụng các kháng sinh dự phòng như là một thuốc hỗ trợ cho IVIG ở một số bệnh nhân SGMD tiên phát. Chỉ định phổ biến nhất của việc dùng kháng sinh là giãn phế quản và viêm xoang. Trong thập kỷ gần đây, nhiều

nghiên cứu đã chỉ ra việc điều trị dự phòng macrolid cho bệnh nhân giãn phế quản làm giảm đáng kể tần suất nhiễm trùng ở một số bệnh nhân. Tuy nhiên, sự kháng kháng sinh vẫn là một vấn đề phức tạp. Tỷ lệ kháng Macrolid ở bệnh nhân có giãn phế quản dạng xơ hóa không có nang ở nhóm bệnh nhân được điều trị 250 mg azithromycin hàng ngày trong 1 năm lên tới 80% so với 26% ở nhóm dùng giả được [97].

1.7.3. Điều trị bệnh lý tự miễn

Các cơ chế gây bệnh tự miễn ở bệnh nhân SGMD XLA cũng như các bệnh SGMD tiên phát khác vẫn còn chưa được hiểu biết đầy đủ. Một số nghiên cứu cho rằng đó là do các bất thường ở quá trình dung nạp trong đáp ứng miễn dịch tự nhiên (khiếm khuyết trong sự tạo dung nạp của tế bào T, khiếm khuyết trong cả quá trình hoạt hoá và quá trình gây ra chết theo chương trình của các tế bào T; cùng với khiếm khuyết trong quá trình nhân lên và hoạt động chức năng của T điều hoà – Treg. Quá trình nhiễm trùng và viêm mạn tính liên tục làm tăng tạo ra các phức hợp miễn dịch khiến cho cơ thể tiếp tục tạo ra các tự kháng thể để cố gắng loại bỏ các phức hợp này [98],[99].

Mặc dù bệnh nhân có XLA thường được coi là có nguy cơ mắc bệnh tự miễn thấp hơn so với các bệnh SGMD tiên phát khác, nhưng nhiều nghiên cứu gần đây đã cho thấy một tỷ lệ đáng kể bệnh nhân XLA bị viêm khớp, bệnh lý ruột viêm hoặc một bệnh tự miễn khác. Vì vậy, bên cạnh việc giám sát, theo dõi điều trị Gammaglobulin, điều trị nhiễm trùng, cần thực hiện giám sát cẩn thận bệnh nhân với XLA các triệu chứng sớm của bệnh lý tự miễn. Viêm khớp và viêm khớp thiếu niên là biểu hiện tự miễn thường được nhắc tới nhất trong bệnh XLA.

Các thuốc điều trị bệnh lý tự miễn ở bệnh nhân SGMD thường không khác biệt với bệnh tự miễn đơn thuần. Tuy nhiên, cách thức điều trị này cần được cân nhắc kỹ lưỡng do các thuốc ức chế miễn dịch có thể gây ra rối loạn

chức năng miễn dịch thứ phát và dẫn tới các đợt nhiễm trùng nặng, đe dọa đến tính mạng của bệnh nhân [100].

Theo nghiên cứu USIDNET, 9% bệnh nhân XLA bị bệnh Crohn. Điều trị viêm đường ruột ở bệnh nhân SGMD tiên phát nói chung và XLA nói riêng còn nhiều khó khăn. Mặc dù điều trị kéo dài với steroid không được khuyến cáo trong các bệnh nhân SGMD tiên phát do nguy cơ nhiễm trùng, các thuốc điều biến miễn dịch như 6-mercaptopurine (6-MP) hoặc Azathioprin cũng có thể được sử dụng bên cạnh liệu pháp thay thế Gammaglobulin. Trong trường hợp không đáp ứng được với 6-MP hay Azathioprin, cần phải dùng budesonid đường uống cho đến khi cải thiện triệu chứng. Trong những trường hợp kém hấp thu nghiêm trọng, có thể sử dụng chất ức chế TNF (ví dụ infliximab) [101].

1.7.4. Chăm sóc bệnh nhân XLA

✓ Đảm bảo vệ sinh, phòng nhiễm khuẩn cho trẻ

Bệnh nhân SGMD thể XLA rất nhạy cảm với các tác nhân gây bệnh, đặc biệt vi khuẩn có vỏ, Giardia lamblia và Enterovirus. Trẻ có thể mắc bệnh khi tiếp xúc gần với nguồn lây. Vì vậy, một trong những việc quan trọng là tư vấn cho bệnh nhân vệ sinh cá nhân tốt, tránh tiếp xúc với người đang mắc bệnh nhiễm khuẩn.

Vệ sinh cá nhân: tắm và rửa tay thường xuyên. Các dụng cụ đồ ăn và chăm sóc trẻ phải được khử khuẩn hoặc tiệt trùng trước khi sử dụng.

Đồ ăn: thức ăn, uống của trẻ phải đảm bảo tươi mới, không có vi khuẩn gây bệnh. Nhân viên y tế chăm sóc trẻ, người nhà trực tiếp chăm sóc trẻ phải đảm bảo điều kiện sạch, mặc quần áo và găng vô khuẩn trong giai đoạn chăm sóc trẻ bệnh nặng hoặc những bệnh nhân bị SGMD kết hợp nguy kịch.

✓ Tiêm phòng vaccine

Đối với trẻ có hệ miễn dịch bình thường, việc tiêm phòng là cần thiết, giúp trẻ em chống lại các tác nhân gây bệnh thông thường. Tuy nhiên, trẻ suy

giảm miễn dịch bẩm sinh cần phải tránh tất cả các với khả năng thiếu hụt về đáp ứng miễn dịch, những vaccin có vi khuẩn hoặc virus sống giảm độc lực là một chống chỉ định tuyệt đối với trẻ. Rất nhiều trẻ được chẩn đoán bệnh SGMD và tử vong do xuất hiện biến chứng nhiễm khuẩn nặng sau tiêm phòng, đặc biệt là tiêm phòng lao. Các vaccine cần tránh tuyệt đối là: sởi – quai bị - rubella; bại liệt, thủy đậu, vaccine BCG và rotavirus. Vì vậy, việc chẩn đoán sớm trẻ bị SGMD tiên phát là rất quan trọng, để có thể đưa ra lời khuyên và khuyến cáo cho trẻ, tránh để trẻ mắc phải biến chứng do sử dụng vaccine.

Nhiều khuyến cáo cho rằng bệnh nhân XLA không cần tiêm các vaccine khác do cơ thể không thể tự sản xuất được kháng thể. Thay vào đó, những người thân, tiếp xúc gần gũi và thường xuyên với trẻ cần được tiêm phòng để tránh mắc bệnh và lây cho trẻ XLA.

1.7.5. Một số phương pháp điều trị mới

✓ Ghép tế bào gốc tạo máu

Ghép tế bào gốc tạo máu là một lĩnh vực khoa học có bề dày lịch sử trên 75 năm qua. Ghép tế bào gốc tạo máu đã cứu sống rất nhiều bệnh nhân bị bệnh suy giảm miễn dịch bẩm sinh và các bệnh liên quan tới hệ tạo máu khác. Tuy nhiên, ghép tế bào gốc tạo máu còn gặp nhiều khó khăn do tìm người cho phù hợp HLA và những biến chứng nặng nề trước và sau ghép.

Ứng dụng ghép tế bào gốc tạo máu đối với bệnh nhân XLA còn ít được nhắc đến. Năm 2003, Porpiglia và cộng sự đã báo cáo thành công trường hợp ghép TBG tạo máu ở chuột bị đột biến gen *BTK* mà không cần dùng thuốc chiếu xạ hoặc thuốc diệt tủy [102]. Những quan sát thực nghiệm này là nền tảng của các thử nghiệm được thực hiện trên người. Howard và cộng sự đã tiến hành ghép tế bào gốc tạo máu trên sáu bệnh nhân XLA, nguồn TBG tạo máu là từ anh chị em ruột phù hợp HLA. Tuy nhiên, tất cả 6 bệnh nhân đều không mọc mảnh ghép [103].

Năm 2015, Rolla Abu đã công bố ghép TBG trên bệnh nhân XLA bị bạch cầu cấp. Một năm sau ghép, số lượng tế bào lympho B trở về bình thường, bệnh nhân có khả năng đáp ứng sinh kháng thể chống lại kháng nguyên polysaccharide phế cầu sau khi tiêm chủng. Hai năm sau khi ghép, bệnh bạch cầu cấp của bệnh nhân vẫn ở giai đoạn ổn định và nồng độ IgG cũng như số lượng CD19 nằm trong giới hạn bình thường [104].

Năm 2016, nhóm nghiên cứu của Kazuhiro Ikegame, Nhật Bản công bố trường hợp ghép TBG đầu tiên cho bệnh nhân XLA không có bệnh lý ác tính, sử dụng tủy của chị gái phù hợp HLA và phác đồ điều kiện hoá giảm cường độ. Bệnh nhân đã bắt đầu tăng dần số lượng tế bào lympho B 10 ngày sau ghép, và tăng dần sau 1 năm. Chức năng sản xuất kháng thể sau khi tiêm chủng được phục hồi hoàn toàn. Tuy nhiên, đây mới chỉ là kết quả điều trị ban đầu, trong thời gian ngắn. Vì vậy cần tiếp tục theo dõi diễn biến lâm sàng cũng như các xét nghiệm sau ghép [105].

➤ *Liệu pháp gen*

Liệu pháp gen được ra đời vào năm 1980 do bác sỹ người Mỹ Martin Cline đã lần đầu tiên biến đổi được ADN của người [44]. Tuy nhiên, công nghệ gen thực sự nở rộ với sự chuyển đổi thành công gen retrovirus sang tế bào tạo máu.

Liệu pháp gen (gene therapy) là kỹ thuật đưa gen lành vào cơ thể thay thế cho gen bệnh hay đưa gen cần thiết nào đó thay vào vị trí gen bị sai hỏng để đạt được mục tiêu của liệu pháp [106].

Liệu pháp gen đã được áp dụng cho nhiều nhóm bệnh suy giảm miễn dịch tiên phát nặng như: thể trầm trọng kết hợp (SCID), u hạt mạn tính, hội chứng Wiskott Aldrich. Một số nghiên cứu thử nghiệm đã thành công trên động vật thực nghiệm và cả con người. Tuy nhiên, còn nhiều biến chứng sau ghép, đặc biệt là ung thư [107] [108] [109].

Gần đây, với nỗ lực nhằm chữa khỏi hoàn toàn bệnh XLA, các nhà khoa học cũng đã bước đầu áp dụng liệu pháp gen cho bệnh suy giảm miễn

dịch thể không có Gammaglobulin máu liên kết nhiễm sắc thể X. Các thử nghiệm liệu pháp gen trên chuột sử dụng chuyển gen genmaretroviral và lentiviral đã chứng minh khả năng sửa chữa thành công tế bào lympho B [110]. Tuy nhiên, cho tới nay, vẫn chưa có thử nghiệm nào đủ chứng cứ an toàn và hiệu quả để có thể áp dụng trên người.

1.8. Tình hình nghiên cứu bệnh XLA

1.8.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới

Bệnh không có Gammaglobulin máu liên kết nhiễm sắc thể X (XLA) lần đầu tiên được bác sĩ Ogden Bruton người Mỹ mô tả vào năm 1952 trên tạp chí “Pediatrics” [75]. Trong thập niên 80 tới 90, rất nhiều các tác giả, các nhóm nghiên cứu đã nghiên cứu về bệnh. Tuy nhiên, đây đều là các nghiên cứu về mô tả các triệu chứng lâm sàng [56].

Năm 1993, nghiên cứu của David Vetrie và cộng sự sử dụng phương pháp lai ghép tại chỗ đã vẽ bản đồ gen *BTK* tại vị trí Xq22.1, phát hiện tyrosine kinase trong tế bào chất có liên quan đến tiến trình tăng trưởng và biệt hóa của tế bào B, sự thiếu hụt *BTK* đã được quan sát ở các bệnh nhân mắc bệnh XLA [3].

Năm 1996 đến 2006, nghiên cứu của Vihinen và cộng sự đã xây dựng một cơ sở dữ liệu về các đột biến gen *BTK* bao gồm các đột biến xảy ra trên hầu hết các exon của gen *BTK* bao gồm các đột biến xảy ra trên cả 5 vùng của gen *BTK* thường gặp nhất là đột biến sai nghĩa. Các đột biến xuất hiện rải rác trong toàn bộ gen và thường ảnh hưởng đến các vị trí CpG tạo thành Arginine. Các đột biến đều ảnh hưởng đến quá trình dịch mã. Các đột biến được phát hiện trên hầu hết các exon của gen *BTK*, phần lớn các đột biến là dạng đột biến lệch khung dịch mã và đột biến vô nghĩa ở đầu 5', đột biến sai nghĩa ở đầu 3' của gen. Tuy nhiên, các nghiên cứu chưa đánh giá mối liên quan giữa kiểu gen và kiểu hình [67].

Các nghiên cứu về điều trị bệnh XLA liên tục được công bố. Tuy nhiên, điều trị chính vẫn xoay quanh điều trị thay thế Gammaglobulin miễn

dịch [24] [111]. Bắt đầu từ năm 2013, một số nghiên cứu đã đề cập tới điều trị cá thể hoá, sử dụng liệu truyền Gammaglobulin miễn dịch riêng cho mỗi bệnh nhân dựa theo nhu cầu sinh học của bệnh nhân để đạt mục tiêu ngăn ngừa nhiễm khuẩn [91]. Tuy nhiên, phương pháp này đòi hỏi theo dõi chặt chẽ và khó áp dụng cho số đông bệnh nhân.

Gần đây, một số nghiên cứu trên thế giới đã áp dụng kỹ thuật ghép tế bào gốc tạo máu hay liệu pháp gen cho bệnh nhân XLA. Tuy nhiên, kết quả đạt được còn rất khiêm tốn và chưa thể áp dụng rộng rãi cho bệnh nhân [103],[104],[110].

1.8.2. Tình hình nghiên cứu tại Việt Nam

Tại Việt nam, bệnh suy giảm miễn dịch bẩm sinh còn ít được nghiên cứu và chưa có một dữ liệu thống kê nào về số lượng và tỷ lệ mắc bệnh. Nếu lấy theo ước tính tỷ lệ mắc bệnh XLA ở Mỹ là 11,25 trên 100.000 dân, với số dân của Việt nam là trên 90 triệu, có thể ước tính được khoảng 10.125 người Việt Nam mắc bệnh XLA.

Năm 2011, tác giả Lâm Thị Mỹ báo cáo đặc điểm lâm sàng, xét nghiệm miễn dịch của 4 bệnh nhân XLA và đưa ra các dấu hiệu cảnh báo ban đầu [112],[112].

Năm 2013, tác giả Hoàng Anh Vũ đã tiến hành nghiên cứu đột biến gen *BTK* trên 22 bệnh nhân nam nghi ngờ bệnh XLA. Tuy nhiên, nghiên cứu đề cập đến phân tích đột biến ở mức mRNA mà không khảo sát vùng promoter và vùng intron nên tỷ lệ phát hiện được đột biến là 59,1 % (13/22 bệnh nhân). phát hiện được 13 đột biến, 9 bệnh nhân không tìm thấy đột biến [65].

Năm 2014, tác giả Vũ Văn Quang và Lê Thị Minh Hương đã công bố về 4 bệnh nhân XLA được chẩn đoán xác định bằng phân tích gen *BTK* trên tạp chí quốc tế BioMed Central [113].

CHƯƠNG 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

2.1.1. Tiêu chuẩn chọn bệnh nhân

- 31 bệnh nhân đủ tiêu chuẩn chẩn đoán bệnh không có Gammaglobulin máu liên kết nhiễm sắc thể X (XLA) theo tiêu chuẩn của Hội suy giảm miễn dịch châu Âu - European Society for Immunodeficiencies (ESID) và Hội suy giảm miễn dịch Pan-American (PAGID) năm 1999 [12]. Cho đến nay, đây vẫn là tiêu chuẩn được sử dụng phổ biến nhất trong các nghiên cứu trên thế giới.

➤ *Tiêu chuẩn chẩn đoán xác định:* bệnh nhân nam có số lượng tế bào lympho B CD19+ $\leq 2\%$ và ít nhất một tiêu chuẩn sau:

- + Tìm thấy đột biến trên gen *BTK*.
- + Anh, em trai cùng mẹ của bệnh nhân, cậu và bác trai bên mẹ, hoặc cháu trai bên mẹ có số lượng tế bào lympho B CD19+ $\leq 2\%$.
- + Không có BTK mRNA trong bạch cầu hạt trung tính hoặc bạch cầu mono theo phương pháp phân tích Northern blot.
- + Không có protein BTK trong tế bào bạch cầu mono hoặc tiểu cầu.

➤ *Tiêu chuẩn chẩn đoán nhiều khả năng:* Bệnh nhân nam có số lượng tế bào lympho B CD19 $\leq 2\%$ và có đủ các tiêu chuẩn sau:

- + Xuất hiện các đợt nhiễm vi khuẩn tái diễn trong năm năm đầu đời.
- + Nồng độ IgG, IgM, và IgA ≤ -2 SD với nồng độ ở trẻ bình thường cùng lứa tuổi.
- + Không có kháng thể kháng hồng cầu Anti-A và Anti-B trong máu và/hoặc đáp ứng kém với vaccine.
- + Đã loại trừ các nguyên nhân giảm Gammaglobulin máu khác.

- 26 mẹ và 10 chị hoặc em gái của 27 bệnh nhân tìm thấy đột biến gen *BTK* cũng được phân tích gen *BTK*.

- Bệnh nhân và người nhà đồng ý tham gia nghiên cứu.

2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ

- Bệnh nhân bị các thể bệnh suy giảm miễn dịch khác gây giảm Gammaglobulin máu: hội chứng tăng IgM (Hyper IgM syndrome), giảm Gammaglobulin thoáng qua ở trẻ nhũ nhi (transient hypogammaglobulinemia of infancy).

- Bệnh nhân và người nhà không đồng ý tham gia nghiên cứu.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu

- Phương pháp nghiên cứu: nghiên cứu một loạt ca bệnh.

- Các chỉ tiêu nghiên cứu được thu thập theo một mẫu bệnh án thống nhất.

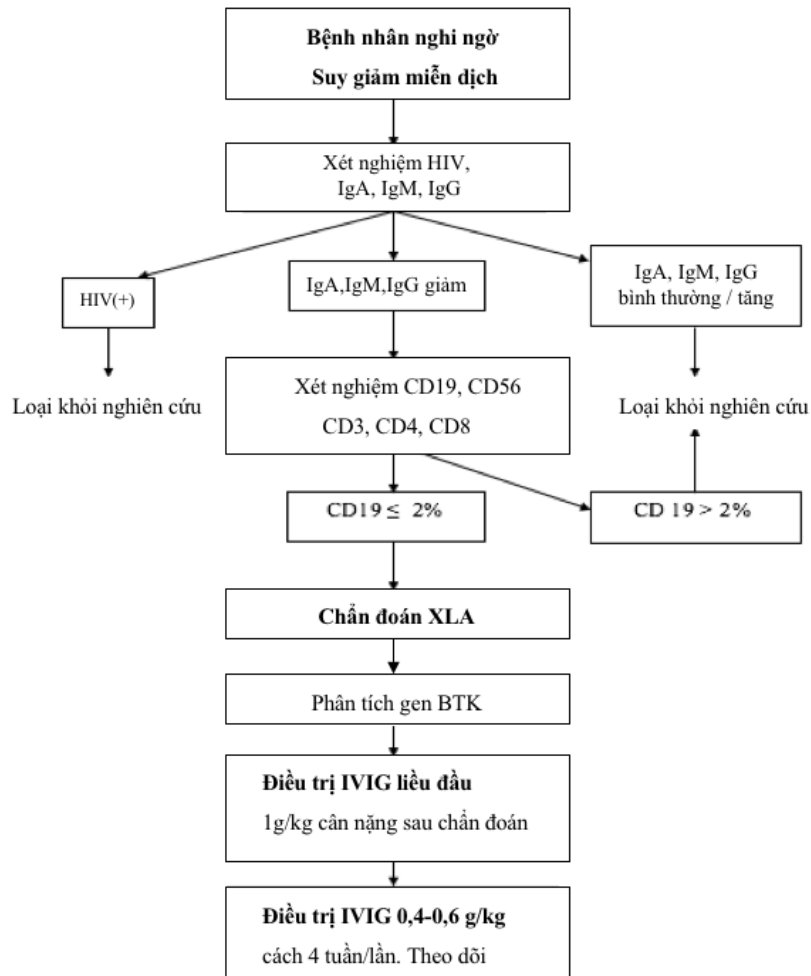
2.2.2. Cỡ mẫu nghiên cứu: lựa chọn tất cả các bệnh nhân đủ tiêu chuẩn chẩn đoán chắc chắn hoặc tiêu chuẩn chẩn đoán có thể theo tiêu chuẩn của ESID và PAGID năm 1999; chấp thuận tham gia nghiên cứu.

2.2.3. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

- Địa điểm nghiên cứu: Bệnh viện Nhi Trung Ương.

- Thời gian nghiên cứu: từ tháng 10/2015 đến tháng 10/2018.

2.2.4. Quy trình nghiên cứu



Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu

Bệnh nhân đủ tiêu chuẩn đều được mời tham gia nghiên cứu và khám, điền thông tin theo bệnh án nghiên cứu riêng cho từng bệnh nhân.

- Lần đầu tiên được chẩn đoán bệnh:
- + Khai thác tiền bệnh.

+ Khám phát hiện các cơ quan nhiễm trùng, biến chứng và di chứng nhiễm khuẩn.

+ Xét nghiệm loại trừ SGMD do virus HIV; định lượng nồng độ kháng thể trong máu ngoại vi, số lượng các tế bào lympho dưới nhóm.

+ Phân tích gen *BTK* cho bệnh nhân.

+ Điều trị IVIG liều 1 g/kg cân nặng ngay khi bệnh nhân được chẩn đoán.

- Tái khám định kì 4 tuần/lần trong vòng 6 tháng:

+ Khai thác các triệu chứng nhiễm khuẩn trong thời gian giữa hai đợt truyền.

+ Khám phát hiện các ổ nhiễm khuẩn, đánh giá mức độ nặng của nhiễm khuẩn khi bệnh nhân tới điều trị IVIG định kỳ.

+ Xét nghiệm nồng độ IgG, IgA, IgM trong máu ngoại vi (và công thức máu nếu trẻ có biểu hiện nhiễm khuẩn) trước mỗi đợt truyền. Nếu trẻ có biểu hiện nhiễm khuẩn nặng (nhiễm khuẩn huyết, viêm phổi nặng thở máy, viêm não, viêm màng não, áp xe da, cơ) hoặc có tổn thương các cơ quan khác: vàng da, suy gan, suy thận...bệnh nhân sẽ được xét nghiệm chức năng gan, thận, xét nghiệm tìm căn nguyên nhiễm khuẩn: nuôi cấy vi khuẩn, nấm, lao. Xét nghiệm PCR tìm một số loại vi khuẩn, virus, lao....

+ Điều trị: IVIG liều 0,4-0,6 g/kg cân nặng. Liều IVIG được tính theo tổng số gram IVIG trong lọ thuốc.

+ Xét nghiệm nồng độ IgG, IgA, IgM trong máu ngoại vi trong vòng 24 giờ sau truyền IVIG.

+ Ngoài ra, nghiên cứu sẽ phân tích gen *BTK* cho người thân của bệnh nhân: mẹ, chị, em gái nếu bệnh nhân có đột biến gen *BTK*.

2.2.5. Các chỉ số nghiên cứu

2.2.5.1. Các chỉ số lâm sàng

- Tuổi, giới.

- Chiều cao, cân nặng.

- Tiền sử sản khoa và tiêm chủng:

+ Tiền sử sản khoa

- Sinh đủ tháng/thiếu tháng
- Cân nặng khi sinh

+ Tiền sử tiêm chủng: tiêm phòng các vaccine virus sống giảm độc lực như: sởi - quai bị - rubella; bại liệt, sốt vàng, thủy đậu, rotavirus và 2 loại vaccin vi khuẩn sống giảm độc lực: BCG và thương hàn uống.

+ Biến chứng sau tiêm chủng vaccine: có mắc bệnh do virus hoặc vi khuẩn đó gây ra hay không.

- Tiền sử bệnh trước khi được chẩn đoán: khai thác chi tiết: thời gian, cơ quan và mức độ nhiễm khuẩn, ở từng cơ quan trước khi trẻ được chẩn đoán bệnh.

- Tiền sử gia đình

+ Xây dựng phả hệ chi tiết của tối thiểu 3 thế hệ (kể từ thế hệ ông bà của bệnh nhân).

+ Khai thác kỹ tiền sử có người trong gia đình được chẩn đoán suy giảm miễn dịch thể XLA; tiền sử tử vong sớm vì nhiễm khuẩn tái diễn, hoặc tử vong sớm sau dùng vaccine.

+ Đặc biệt lưu ý: tiền sử các anh, em trai ruột của bệnh nhân, và tất cả các con trai trong họ của mẹ bệnh nhân: anh, em trai của bà, của mẹ, các cháu trai con các chị em gái của mẹ...

+ Tiền sử gia đình nghi ngờ có người mắc bệnh: là những bệnh nhân có:

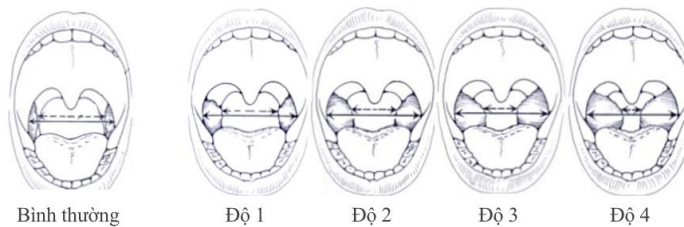
- Họ hàng bậc 1: anh/em trai ruột của bệnh nhân đã được chẩn đoán giảm Gammaglobulin máu nặng (còn sống hoặc đã tử vong).
- Họ hàng bậc 2: anh/em trai của mẹ đã tử vong do nhiễm khuẩn nặng, nhiễm khuẩn tái diễn (không tính tới các trường hợp tử

vong do tai nạn hoặc bệnh khác không liên quan như tim mạch, tai biến mạch máu não...).

- Họ hàng bậc 3: con trai của dì ruột hoặc bác gái ruột bên mẹ đã được chẩn đoán bệnh XLA hoặc đã tử vong do nhiễm khuẩn nặng, nhiễm khuẩn tái diễn.

- Triệu chứng thực thể:

+ Khám Amidan: đánh giá kích thước Amidan theo phân độ Brodsky và Friedman [114]:



Hình 2.2: Kích thước Amidan theo phân độ Brodsky và Friedman

- Amidan bình thường: tổ chức Amidan không vượt quá trụ trước và trụ sau, không gây hẹp eo họng.
- Độ 1: hẹp eo họng < 25%
- Độ 2: hẹp eo họng 25 – 50%
- Độ 3: hẹp eo họng 50 - 75%
- Độ 4: hẹp eo họng > 75%
- Không thấy Amidan hoặc Amidan nhỏ: giữa hai trụ trước và trụ sau không thấy tổ chức Amidan hoặc có nhưng rất nhỏ.

+ Xác định vị trí nhiễm khuẩn: viêm đường hô hấp trên, viêm tai giữa, viêm đường hô hấp dưới, viêm phổi có tràn mủ màng phổi, viêm da, nhiễm trùng tiết niệu, áp xe dưới da, áp xe cơ, viêm não, viêm màng não, nhiễm khuẩn huyết...

+ Nhiễm khuẩn nặng: trong nghiên cứu này, chúng tôi tính nhiễm khuẩn nghiêm trọng khi bệnh nhân: viêm não, viêm màng não, áp xe dưới da, áp xe cơ, nhiễm khuẩn huyết.

- **Tính tuổi khởi phát, tuổi chẩn đoán, thời gian chẩn đoán muộn:** trong nghiên cứu, chúng tôi tính theo cách sau:

+ Tuổi khởi phát bệnh: được tính là lần đầu tiên bệnh nhân có biểu hiện nhiễm khuẩn như: ho, sốt, hoặc viêm tai giữa, viêm phế quản, viêm phổi, nhiễm khuẩn máu, viêm khớp...; không tính những trường hợp trẻ bị viêm long đường hô hấp hoặc sốt do tiêm phòng, do mọc răng hoặc được chẩn đoán xác định là sốt do nhiễm virus.

+ Bệnh khởi phát: đợt bệnh nhiễm khuẩn đầu tiên trẻ mắc phải trong đời: viêm tai giữa, viêm phổi, viêm xoang, viêm khớp mủ và viêm kết mạc, ỉa chảy nhiễm khuẩn...

+ Tuổi chẩn đoán: được tính vào lần đầu tiên bệnh nhân được phát hiện giảm IgA, IgM, IgG và số lượng tế bào lympho dưới nhóm. Thời điểm đó bệnh nhân chưa được điều trị truyền Gammaglobulin máu.

+ Thời gian chẩn đoán muộn: được tính bằng hiệu giữa tuổi được chẩn đoán và tuổi khởi phát đợt nhiễm trùng đầu tiên – là thời gian từ khi khởi phát đến khi được chẩn đoán nghi ngờ bệnh XLA.

2.2.5.2. Các chỉ số cận lâm sàng

- Số lượng bạch cầu, bạch cầu trung tính, bạch cầu lympho, nồng độ Hemoglobin: tính theo trung bình và trung vị (do đa số phân bố không chuẩn)

- Các xét nghiệm khác để tìm và đánh giá mức độ nhiễm khuẩn như chụp X-quang tim phổi, tổng phân tích nước tiểu; nuôi cấy các dịch, máu để tìm vi khuẩn gây bệnh.

- Nồng độ Immunoglobulin: IgA, IgG, IgM huyết thanh. Nồng độ các kháng thể đều được so sánh với giá trị tham chiếu theo lứa tuổi của từng bệnh nhân theo chỉ số tham chiếu (phụ lục 1) [115] [116].

- Số lượng các tế bào lympho dưới nhóm: lympho T: TCD3, TCD4, TCD8, lympho B (CD19), tế bào NK (CD56): theo giá trị tham chiếu (phụ lục 1) [115] [116].

- Phân tích gen *BTK*:

+ Phương pháp phát hiện đột biến trên gen *BTK*:

- Kỹ thuật giải trình tự 19 Exon của gen *BTK*: phát hiện các dạng đột biến: đột biến mất đoạn, thêm đoạn, lặp đoạn, chuyển đoạn, đảo đoạn.
- Kỹ thuật MLPA: phát hiện các mất đoạn lớn trên gen *BTK*.

+ Các thông tin về đột biến gen *BTK*:

- Đột biến gen được mã hoá theo quy ước trình tự gen trên ngân hàng gen.
- Trình tự đối chứng của gen *BTK* (Assess number của gen *BTK*) là U78027.1.
- Các kiểu đột biến được ghi nhận là:
 - Kiểu đột biến nhỏ (đột biến điểm): mất, thêm, thay, đảo một vài cặp nucleotide.
 - Đột biến lớn: mất, lặp, chuyển, đảo một đoạn gen.
 - Kiểu đột biến: đột biến vô nghĩa, đột biến sai nghĩa, đột biến dịch khung.
- Vị trí đột biến: xác định vị trí đột biến trên 19 và các vùng tiếp nối exon/intron.

2.2.5.2. Các chỉ số đánh giá điều trị

- Triệu chứng cơ năng giữa các đợt điều trị IVIG: số ngày bệnh nhân ho, sốt, chảy mũi mủ, viêm tai, viêm da, ỉa chảy, viêm khớp...; thời gian, loại kháng sinh, đường dùng kháng sinh kể từ ngày truyền IVIG trước tới ngày truyền IVIG đợt tiếp theo.

- Xác định vị trí và mức độ nhiễm khuẩn: viêm đường hô hấp trên, viêm tai giữa, viêm đường hô hấp dưới, viêm phổi có tràn mủ màng phổi, viêm da, nhiễm trùng tiết niệu, áp xe dưới da, áp xe cơ, viêm não, viêm màng não, nhiễm khuẩn huyết...

- Nhiễm khuẩn nặng: trong nghiên cứu này, chúng tôi tính nhiễm khuẩn nặng khi bệnh nhân: viêm não, viêm màng não, áp xe dưới da, áp xe cơ, nhiễm khuẩn huyết.

- Liều điều trị IVIG: tính bằng gram/kg cân nặng của bệnh nhân (tính bằng tổng khối lượng lọ thuốc IVIG).

- Khoảng cách giữa hai đợt truyền: khoảng cách giữa thời điểm vào truyền đợt sau và thời điểm vào truyền đợt ngay trước đó; tính bằng đơn vị ngày sau đó tính toán, quy đổi ra tuần.

- Nồng độ kháng thể IgA, IgG, IgM trước mỗi đợt truyền và trong vòng 24 giờ sau truyền. Tính bằng g/L.

2.2.6. Các quy trình xét nghiệm

2.2.6.1. Quy trình định lượng Immunoglobulin trong máu

- Thời điểm xét nghiệm:
 - + Tại thời điểm chẩn đoán (trước lần đầu truyền Gammaglobulin đường tĩnh mạch (IVIG).
 - + Mỗi đợt truyền IVIG xét nghiệm hai lần:
 - Lần 1: trước truyền IVIG (để xác định nồng độ IgG đáy – IgG trough level).
 - Lần 2: trong vòng 24 giờ sau truyền IVIG.
- Mỗi lần lấy 2ml máu vào ống xét nghiệm sinh hoá máu và gửi xét nghiệm tại khoa Sinh hoá - Bệnh viện Nhi Trung Ương.
- Mục đích: định lượng nồng độ Immunoglobulin G, Immunoglobulin A, Immunoglobulin M.

- Nguyên tắc của quy trình này là sử dụng phản ứng kết hợp kháng nguyên - kháng thể. Khi bệnh phẩm (huyết thanh, huyết tương) được trộn với dung dịch đệm (R1) và dung dịch kháng huyết thanh (R2), IgA hoặc IgG hoặc IgM trong bệnh phẩm sẽ kết hợp đặc hiệu với kháng thể IgA hoặc IgG hoặc IgM của người tạo thành một phức hợp. Sự thay đổi mật độ quang (độ đục) của phức hợp này phản ánh nồng độ các kháng thể IgA, IgG, IgM trong bệnh phẩm.

- Hoá chất: dung dịch đệm (R1) và dung dịch kháng huyết thanh (R2).

- Trang thiết bị: máy sinh hoá tự động AU 2700 (Đã được chuẩn hóa theo ISO).

- Quy trình thực hiện: sau khi Ly tâm mẫu bệnh phẩm 5 phút với tốc độ 3000v/phút, nạp bệnh phẩm vào Rack và đặt vào máy, máy sẽ chạy tự động để đưa ra kết quả.

- Quy trình đã được công nhận đạt tiêu chuẩn ISO 15189.

2.2.6.2. Quy trình định lượng tế bào lympho dưới nhóm

- Thời điểm xét nghiệm:

- + Tại thời điểm chẩn đoán: 2 mẫu
- + Sau 6 tháng điều trị

- Mỗi lần lấy 2ml máu vào ống xét nghiệm công thức máu và gửi xét nghiệm tại khoa Huyết học - Bệnh viện Nhi Trung Ương.

- Mục đích: định lượng các tế bào lympho trong máu ngoại vi:

- + Lympho T (TCD3): ở máu ngoại vi mang dấu màng đặc trưng CD3+. Có 2 dưới nhóm chính của Lympho T
 - Lympho T helper (TCD4): mang các dấu ấn CD3+CD4+CD8-
 - Lympho T toxic (TCD8): mang các dấu ấn CD3+CD4-CD8+
- + Lympho B: mang dấu ấn màng đặc trưng CD19+ ở tất cả các giai đoạn biệt hóa, không có trên tế bào T, tế bào dòng hạt và tế bào Mono.

+ Tế bào NK (natural killer): còn gọi là tế bào diệt tự nhiên mang các dấu ấn màng đặc trưng CD16+CD56+.

- Nguyên tắc định lượng các tế bào lympho huyết thanh: sử dụng kỹ thuật phân tích tế bào dòng chảy. Người ta ủ mẫu máu với các kháng thể đơn dòng gắn huỳnh quang. Các kháng thể này sẽ gắn đặc hiệu với các kháng nguyên đặc trưng (CD) trên bề mặt của từng loại bạch cầu. Các tế bào bạch cầu đã gắn huỳnh quang sau đó được cho đi qua các đầu đọc laser trên máy đo dòng chảy tế bào. Dựa vào kích thước, đậm độ nhân, màu huỳnh quang để nhận diện và xác định số lượng từng quần thể tế bào.

- Bộ Kit BD Multitest 6 Color TBNK, bao gồm:

+ Lọ hỗn dịch các kháng thể đơn dòng gắn màu huỳnh quang trong nước muối sinh lý: CD3-FITC; CD16,56-PE; CD45-PerCP Cy5.5; CD4-PE Cy7; CD19-APC; CD8-APC Cy7.

+ Ống BD Trucount

+ Dung dịch BD FACS Lysing Solution: dung dịch phá vỡ hồng cầu

+ PBS

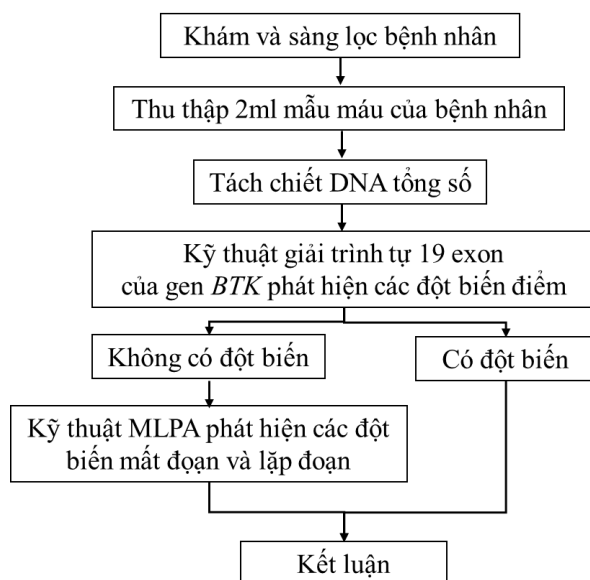
- Trang thiết bị: máy đo dòng chảy tế bào: BD FACS Canto II (đã được chuẩn hóa theo ISO).

- Quy trình đã được công nhận đạt tiêu chuẩn ISO 15189 (phụ lục 2).

2.2.6.3. Quy trình phân tích gen BTK

➤ *Sơ đồ quy trình phân tích gen*

Quy trình tiến hành phân tích gen *BTK* tại Khoa Di truyền và Sinh học phân tử, bệnh viện Nhi Trung Ương theo các bước sau:



Hình 2.3. Sơ đồ quy trình xác định đột biến gen *BTK* gây bệnh *XLA*

➤ Kỹ thuật tách ADN tổng số từ máu ngoại vi

- Quy trình tách ADN tổng số từ máu ngoại vi được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất kit tách ADN (Qiagen-DNA blood mini kit).

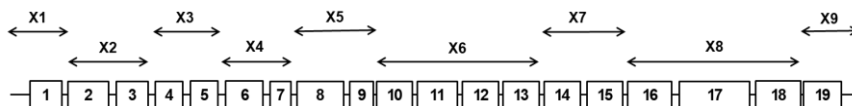
- Sau khi tách ADN, tiến hành xác định nồng độ ADN tổng số để tính toán thành phần phản ứng PCR đạt hiệu quả tốt.

- Phương pháp điện di ADN theo quy trình để thu được ADN tinh sạch và đảm bảo nồng độ ADN phù hợp (phụ lục 3).

➤ Kỹ thuật giải trình tự gen Sanger bằng máy ABI 3130

Phản ứng PCR khuếch đại toàn bộ gen *BTK*

- Gen *BTK* gồm 19 exon được chia thành 9 đoạn nhỏ như hình 2.3



Hình 2.4. Sơ đồ nhân đoạn gen *BTK*

- Phản ứng PCR khuếch đại 19 exon của gen *BTK* bao gồm các thành phần:

Bảng 2.1. Thành phần phản ứng PCR

Thành phần phản ứng	Thể tích /mẫu (μl)
PCR multiplex master mix 2X	25
Primer 10X	5
dH ₂ O	15
DMSO (10%)	3
ADN	2
Tổng thể tích	50

- Trình tự môi: được thực hiện theo quy trình tại khoa Di truyền – bệnh viện Nhi Trung Ương - phụ lục 4.

- Chu trình nhiệt của phản ứng PCR khuếch đại:

95°C	5 phút	30 chu kỳ
94 °C	30 giây	
58 °C	1 phút	
72 °C	2 phút	
72 °C	5 phút	

- Phản ứng PCR khuếch đại được thực hiện trên máy PCR Eppendoff (Eppendoff, Đức).

- Kết quả quy trình: sau mỗi chu kỳ phản ứng, từ 1x đoạn ADN cần nhân sẽ có 2x đoạn được tổng hợp, sau n chu kỳ sẽ có 2n bản sao đoạn ADN mong muốn, chiều dài thực tế của đoạn ADN được nhân bản bằng đúng khoảng cách giữa hai đầu xuất phát của hai đoạn môi.

Tinh sạch sản phẩm phản ứng PCR khuếch đại.

Kiểm tra sản phẩm PCR sau khi điện di trên gel agarose bằng phương pháp điện di. Sau đó, sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit tinh sạch của QIAGEN (QIAquick PCR Purification Kit, Đức) trước khi tiến hành giải trình tự gen.

Phản ứng PCR mỗi đơn

- Trình tự đoạn gen quan tâm được xác định dựa trên nguyên tắc của phương pháp Sanger: tạo ra các đoạn ADN một sợi hơn kém nhau một nucleotide, kết thúc bởi các dNTP đã được đánh dấu huỳnh quang. Để tạo ra các đoạn kết thúc bằng các loại dNTP khác nhau, chúng tôi tiến hành phản ứng PCR sử dụng hoá chất BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit đã có chứa sẵn các hoá chất cần thiết của phản ứng nhân gen để xác định trình tự như dNTPs, DNA polymerase... Do đó chỉ cần bổ sung thêm ADN khuôn (là sản phẩm PCR tinh sạch) và mỗi phù hợp. Trình tự mỗi và các thành phần phản ứng PCR mỗi đơn theo phụ lục 5.

Chu trình nhiệt của phản ứng mỗi đơn như sau:

96 °C	1 phút	25 chu kỳ
96 °C	10 giây	
50 °C	05 giây	
60 °C	4 phút	
Giữ lạnh ở nhiệt độ 4°C		

Tinh sạch sản phẩm PCR mỗi đơn: phản ứng PCR mỗi đơn sau khi được tiến hành xong sẽ được tinh sạch bằng kit tinh sạch của ABI (BigDye X Terminator v3.1 cycle sequencing kit) để chạy giải trình tự gen.

Giải trình tự gen bằng máy ABI PRISM 3130 tại khoa Di truyền và sinh học phân tử, bệnh viện Nhi Trung Ương: sản phẩm PCR mỗi đơn sau khi được tinh sạch bằng kit BigDye X-terminator v3.1 cycle sequencing kit được sử dụng để giải trình tự gen trực tiếp trên máy ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer machine (Applied Biosystem, Hoa Kỳ).

Các cặp mồi được thiết kế bởi trung tâm Gen, Bệnh viện Queen Mary, Hồng Kông.

Xử lý số liệu và phân tích đột biến trên gen BTK.

- Các trình tự gen được thu thập bằng phần mềm Sequencing analysis v3.1 và phân tích trên phần mềm Chromas để chắc chắn rằng trình tự mỗi xuôi và mỗi ngược của mỗi exon có thể ghép được hoàn toàn với nhau. Trình tự thu được sẽ được ghép nối thành trình tự của gen *BTK* bằng phần mềm ChromasPro v2.1.8 và đưa lên chương trình Blast để so sánh với trình tự chuẩn GenBank U78027.1.

- Đột biến đã công bố được viết theo đúng danh pháp quốc tế “Sequence Variant Nomenclature” (<http://varnomen.hgvs.org>) và so sánh với dữ liệu được công bố trên thế giới Human Gen Mutation database (HGMD - <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/all.php>) và nguồn dữ liệu đột biến gen mở Leiden (LOVD) (<http://www.lovd.nl/3.0/home>).

- Các đột biến (novel mutation) chưa được công bố sẽ tiếp tục được so sánh với các dữ liệu trên ngân hàng gen quốc tế và phân tích để dự đoán liệu đột biến đó là đột biến gây bệnh (mutation) hay chỉ là một đột biến đa hình (polymorphism).

➤ ***Kỹ thuật Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)***

- Kỹ thuật MLPA dựa trên nguyên lý của sự kết nối đa mồi-probe lai với vùng gen đích, mà vùng gen này thường có kích thước lớn, tiếp theo là chạy PCR định lượng sử dụng cặp mồi PCR universal-tag cho tất cả các cặp probe, rồi sau đó là phân tích đoạn. Theo cách thức này MLPA có thể phát hiện các mất đoạn và nhân đoạn xảy ra trong vùng gen phân tích, là một phương pháp chẩn đoán thay thế có giá trị, hoặc là phương pháp bổ sung cho kỹ thuật giải trình tự gen khi khảo sát các đột biến mất đoạn đã biết hoặc chưa biết của bệnh XLA. Đối với bệnh XLA, Probe MRC Holland SALSA P210 được thiết kế để phát hiện những thay đổi về số bản sao của 29 trình tự khác nhau trong vùng gen

BTK, chủ yếu được sử dụng để phát hiện các đột biến xóa đoạn, lặp đoạn của một hoặc nhiều trình tự, trong hoặc gần vùng gen *BTK*. Các đột biến mất đoạn dị hợp tử sẽ có các đầu tín hiệu giảm từ 35-50% so với mức bình thường.

- Hỗn hợp đầu dò trong kit MLPA bao gồm 19 đầu dò cho 19 exon của gen *BTK*. Ngoài ra, hỗn hợp đầu dò này còn bao gồm 10 đầu dò đặc hiệu cho bộ gen người để làm mẫu đối chứng, 1 đầu dò đặc biệt cho nhiễm sắc thể X và 2 đầu dò đặc biệt cho nhiễm sắc thể Y (UTY gene). Kit MLPA được thiết kế để sàng lọc các mất đoạn, lặp đoạn của một hoặc nhiều exon trên gen *BTK*. Sự mất đoạn sẽ được biểu hiện bằng hình ảnh các đỉnh (peak) không xuất hiện so với mẫu đối chứng bình thường.

- + Quy trình phân tích MLPA: phụ lục 6.
- + Phân tích kết quả MLPA bằng phần mềm Coffalyser.

2.2.7. Xử lý số liệu

- Số liệu được phân tích bằng phần mềm Stata 14.0.
- Thống kê mô tả:
 - + Đối với biến định tính: sử dụng tần số và tỷ lệ phần trăm để mô tả.
 - + Đối với biến định lượng: sử dụng trị số trung bình và độ lệch chuẩn khi biến số có phân bố chuẩn; sử dụng giá trị trung vị và khoảng khi biến số không có phân bố chuẩn.
- Thống kê suy luận:
 - + Sử dụng kiểm định Khi bình phương để phân tích mối liên quan giữa các biến định tính.
 - + Sử dụng kiểm định phi tham số Mann-Whitney và Kruskal-Wallis khi so sánh trung vị giữa các nhóm trong trường hợp biến định lượng không có phân bố chuẩn.
- Ngoài ra, nghiên cứu sử dụng phân tích đa tầng - multilevel analysis
- để phân tích các yếu tố ảnh hưởng đến các biến đầu ra quan tâm vì đây là số liệu lặp lại (một bệnh nhân được theo dõi và lấy số liệu nhiều lần).
- Các kiểm định được thực hiện với mức ý nghĩa 5%.

2.2.8. Kỹ thuật khắc phục sai số và nhiễu

- Các sai số có thể gặp:
 - + Sai số nhớ lại: do đối tượng phỏng vấn nhầm lẫn thông tin khi trả lời những câu hỏi về những sự việc trong quá khứ, nhất là trong các câu hỏi về số lần nhiễm khuẩn như viêm phổi, viêm tai giữa, nhiễm trùng huyết...trước đó.
 - + Sai số do nội dung trả lời về tiền sử gia đình của bệnh nhân, đặc biệt thể hệ trước do nhớ lại của người thân.
 - + Sai số do cha mẹ bệnh nhân: không hiểu nội dung câu hỏi hoặc do tâm lý lo lắng mà cố tình nói quá lên hoặc giảm đi.
 - + Sai số khi nhập liệu: Khi nhập số liệu và xử lý được tiến hành 2 lần để đối chiếu kết quả
- Biện pháp khắc phục sai số:
 - + Sử dụng sổ Y bạ hoặc giấy tờ liên quan đến việc trẻ đã được khám và chẩn đoán xác định căn nguyên và mức độ nặng của nhiễm khuẩn trước đó.
 - + Bảng câu hỏi phỏng vấn được sắp xếp hợp lý về trình tự logic, cách diễn đạt và từ ngữ dễ hiểu.
 - + Thử nghiệm bộ câu hỏi trước khi đưa vào thu thập thông tin chính thức.
 - + Trong quá trình phân tích, đối chiếu kết quả với thực tế.

2.2.9. Đạo đức của đề tài

- Nghiên cứu được tiến hành sau khi thông qua hội đồng y đức của Viện nghiên cứu sức khỏe trẻ em, bệnh viện Nhi Trung Ương (QĐ 71/BVNTW ngày 29/01/2016).
- Bệnh nhân và gia đình bệnh nhân được giải thích về nguy cơ và lợi ích của việc tham gia vào nghiên cứu, bệnh nhân tự nguyện tham gia vào nghiên cứu.
- Thông tin nghiên cứu của bệnh nhân và người nhà được bảo mật.
- Chi phí phân tích gen của bệnh nhân và người nhà được đề tài chi trả, không ảnh hưởng đến bệnh nhân.

- Bệnh nhân tham gia nghiên cứu được chẩn đoán xác định, phát hiện đột biến gây bệnh. Từ đó trẻ sẽ được điều trị, chăm sóc, theo dõi và quản lý theo phác đồ và chương trình điều trị của bệnh viện.

- Gia đình trẻ sẽ được tư vấn di truyền, tránh sinh ra những bé mắc bệnh suy giảm miễn dịch bẩm sinh như trẻ.

- Những bệnh nhân không đủ tiêu chuẩn nghiên cứu hoặc từ chối nghiên cứu vẫn được khám, điều trị đầy đủ.

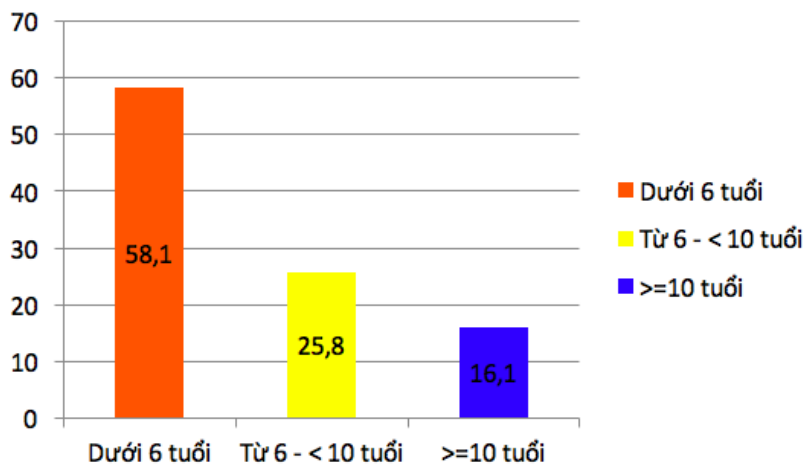
CHƯƠNG 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đặc điểm lâm sàng và xét nghiệm miễn dịch

3.1.1. Đặc điểm chung của bệnh nhân

3.1.1.1. Phân bố tuổi



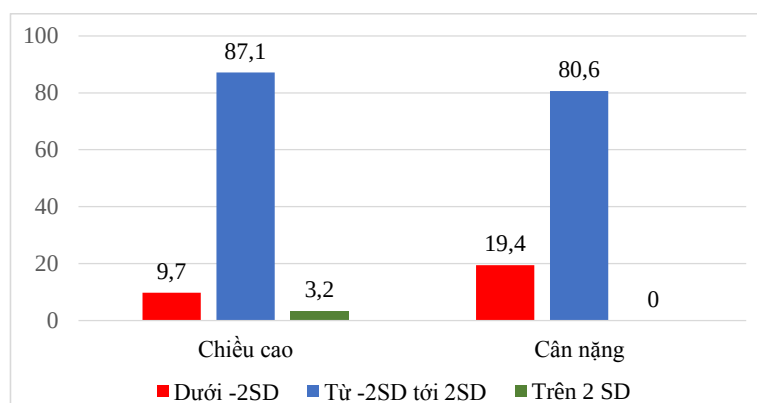
Biểu đồ 3.1. Phân bố tuổi vào thời điểm tham gia nghiên cứu

Nhận xét: Tại thời điểm bắt đầu nghiên cứu, tuổi trung bình của bệnh nhân XLA là $6,27 \pm 3,76$ tuổi (trung vị là 5,55 tuổi, nhỏ nhất là 11 tháng, lớn nhất là 15,3 tuổi). Có 26/31 bệnh nhân (83,9%) trẻ dưới 10 tuổi.

3.1.1.2. Giới

100% bệnh nhân trong nghiên cứu là bệnh nhân nam.

3.1.1.3. Chiều cao, cân nặng

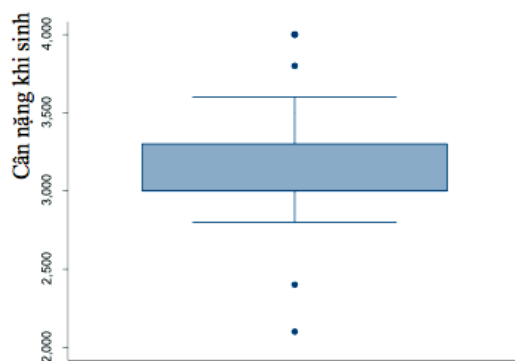


Biểu đồ 3.2. Sự phát triển thể chất tại thời điểm phát hiện

Nhận xét: Tại thời điểm chẩn đoán bệnh, 3/31 bệnh nhân (9,7%) có chiều cao dưới -2SD; có 6/31 bệnh nhân (19,4%) trẻ có cân nặng dưới -2SD. Không có bệnh nhân nào có chiều cao, cân nặng dưới -3SD.

3.1.2. Tiền sử bệnh nhân

3.1.2.1. Cân nặng khi sinh



Biểu đồ 3.3. Phân bố cân nặng khi sinh

Nhận xét: Cân nặng khi sinh trung bình của 31 bệnh nhân là $3132,3 \pm 385,5$ gram. Trong 31 bệnh nhân, chỉ có 2 bệnh nhân có cân nặng khi sinh dưới 2500 gram.

3.1.2.1. Tuổi khởi phát đợt nhiễm khuẩn đầu tiên

Bảng 3.1. Tuổi khởi phát đợt nhiễm khuẩn đầu tiên

Tuổi	n	%
Dưới 6 tháng	9	29,03
≥ 6 tháng - < 12 tháng	14	45,16
≥ 12 tháng	8	25,81
Tổng	31	100,00

Nhận xét: tuổi khởi phát nhiễm khuẩn đầu tiên: trung bình: $9,30 \pm 6,31$ tháng. Tuổi khởi phát sớm nhất là 3 tháng, muộn nhất là 27 tháng. Có 74,19% bệnh nhân có triệu chứng nhiễm khuẩn lần đầu trước 1 tuổi, trong đó 29,03% bệnh nhân khởi phát sớm trước 6 tháng tuổi.

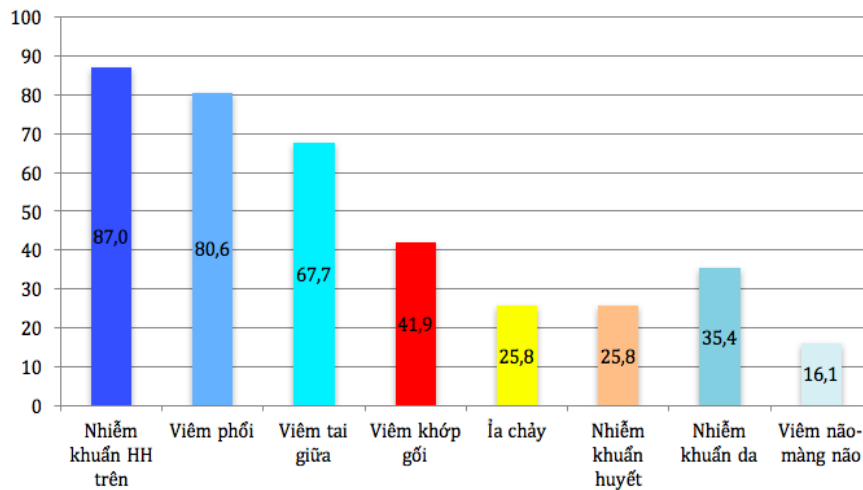
3.1.2.2. Bệnh nhiễm khuẩn lần đầu tiên

Bảng 3.2. Bệnh đợt nhiễm khuẩn đầu tiên của bệnh nhân

Vị trí nhiễm khuẩn	n	%
Viêm đường hô hấp trên	3	10,34
Viêm phổi	12	41,38
Viêm tai giữa	8	27,59
Ỉa chảy nhiễm khuẩn	3	10,34
Viêm não-màng não	1	3,45
Áp xe dưới da, cơ	2	6,90
Tổng:	29	100

Nhận xét: Viêm đường hô hấp là các bệnh nhiễm trùng thường gặp nhất của bệnh nhân XLA, đặc biệt viêm phổi chiếm 41,38%, tiếp đó là viêm tai giữa (24,14%). Có 2 bệnh nhân ngay đợt nhiễm trùng đầu tiên đã biểu hiện nhiễm khuẩn nặng là áp xe dưới da, cơ; 1 bệnh nhân viêm não- màng não. Ngoài ra tiêu chảy cũng là dấu hiệu gặp ở 10,34% bệnh nhân XLA.

3.1.2.3. Tiền sử nhiễm khuẩn trước khi chẩn đoán

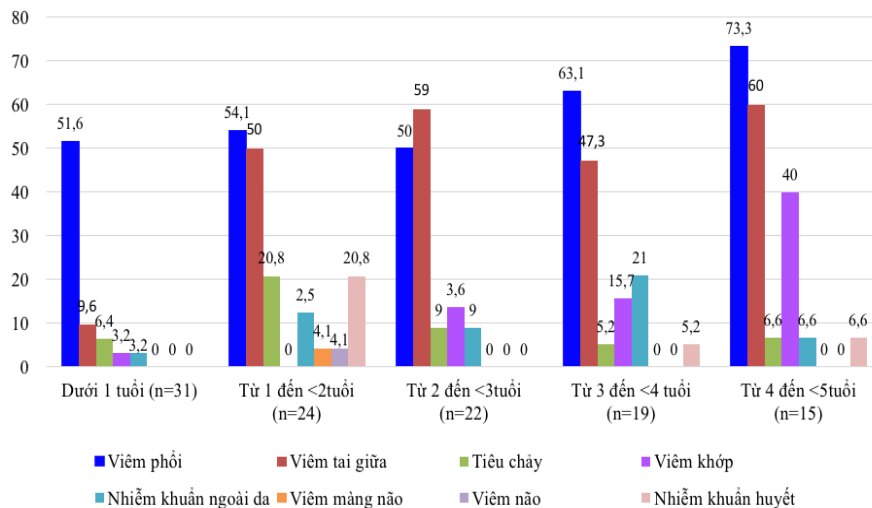


Biểu đồ 3.4. Tỷ lệ mắc các loại nhiễm trùng thường gặp trước khi chẩn đoán

Nhận xét: Khai thác tiền sử 31 bệnh nhân XLA cho thấy: các bệnh nhiễm trùng thường gặp nhất của bệnh nhân XLA là viêm đường hô hấp trên 87,0% (n=27), viêm phổi 80,6% (n=25), viêm tai giữa 67,7% (n=21). Ngoài ra viêm khớp cũng là dấu hiệu gặp trong 41,9% (n=13). Có 25,8% (n=8) bệnh nhân từng mắc nhiễm khuẩn huyết và 16,1% (n=5) bị viêm não – màng não.

Có 2 bệnh nhân được chẩn đoán chủ động khi chưa có biểu hiện nhiễm trùng do tiền sử có anh trai mắc bệnh XLA.

3.1.2.4. Tiền sử nhiễm khuẩn theo từng nhóm tuổi trước khi chẩn đoán



Biểu đồ 3.5. Tỷ lệ mắc các loại nhiễm khuẩn trước khi được chẩn đoán theo từng nhóm tuổi

Nhận xét: Tỷ lệ mắc các loại nhiễm khuẩn trước khi được chẩn đoán thay đổi theo từng độ tuổi của bệnh nhân. Bệnh viêm phổi là nhiễm khuẩn thường gặp nhất, sau đó tới viêm tai giữa trên bệnh nhân XLA trước khi được chẩn đoán bệnh ở tất cả các nhóm tuổi. Tỷ lệ viêm tai giữa trong giai đoạn dưới 1 tuổi thấp sau đó tăng cao trên 50% ở trẻ lớn hơn 1 tuổi. Tỷ lệ nhiễm khuẩn huyết trước khi được chẩn đoán cao nhất ở giai đoạn 1 tới 2 tuổi 20,8%. Biểu hiện viêm khớp gặp nhiều ở giai đoạn trẻ lớn hơn – 3-5 tuổi. Các nhiễm khuẩn nặng như viêm não, viêm màng não, nhiễm khuẩn huyết xuất hiện muộn hơn sau khi trẻ 1 tuổi.

3.1.2.5. Tiền sử nhiễm khuẩn trong giai đoạn trẻ dưới 1 tuổi

Bảng 3.3. Tần suất nhiễm khuẩn trước khi được chẩn đoán trong giai đoạn trẻ dưới 1 tuổi

STT	Loại nhiễm khuẩn	Số BN nhiễm khuẩn/tổng BN	Số lần mắc
1	Viêm phổi	16/31 (51,6%)	Thấp nhất: 1 lần (10 trẻ) Cao nhất: 11 lần (1 trẻ)
2	Viêm tai giữa	3/31 (9,6%)	Thấp nhất: 5 lần (1 trẻ) Cao nhất: 6 lần (2 trẻ)
3	Tiêu chảy	2/31 (6,4%)	Thấp nhất: 3 lần Nhiều nhất: 4 lần
4	Viêm khớp	1/31 (3,2%)	1 lần
5	Nhiễm khuẩn da – tổ chức dưới da	1/31 (3,2%)	1 lần

Nhận xét: Trong giai đoạn bệnh nhân dưới 1 tuổi và chưa được chẩn đoán bệnh XLA, viêm phổi là bệnh nhiễm khuẩn thường gặp nhất chiếm 51,6%, tiếp đó là viêm tai giữa chiếm 9,6%. Trong đó có hai trẻ viêm tai giữa 6 lần/năm. Không có trường hợp nào mắc nhiễm khuẩn nặng như nhiễm trùng huyết, viêm não – màng não, áp xe dưới da, cơ.

3.1.2.6. Tiền sử nhiễm khuẩn trong giai đoạn trẻ từ 1 tới 2 tuổi

Bảng 3.4. Tần suất nhiễm khuẩn trước khi được chẩn đoán trong giai đoạn trẻ từ 1 tới 2 tuổi

STT	Loại nhiễm khuẩn	Số BN nhiễm khuẩn/tổng BN	Số lần mắc
1	Viêm phổi	13/24 (54,1%)	Thấp nhất: 1 lần (4 trẻ) Cao nhất: 12 lần (1 trẻ)
2	Viêm tai giữa	12/24 (50%)	Thấp nhất: 1 lần (3 trẻ) Cao nhất: 9 lần (1 lần)
3	Viêm màng não	1/24 (4,1%)	1 lần
4	Viêm não	1/24 (4,1%)	1 lần
5	Tiêu chảy	5/24 (20,8%)	Thấp nhất 1 lần: 2 trẻ Cao nhất 5 lần: 1 trẻ
6	Nhiễm khuẩn huyết	5/24 (20,8%)	1 lần
7	Nhiễm khuẩn da – tổ chức dưới da	3/24 (12,5%)	Thấp nhất 1 lần: 2 trẻ Cao nhất 2 lần: 1 trẻ

Nhận xét: Trong số 24 bệnh nhân được chẩn đoán sau 1 tuổi, giai đoạn 1 tới 2 tuổi: viêm phổi vẫn là nhiễm khuẩn thường gặp nhất chiếm 54,1%. Tỷ lệ viêm tai giữa tăng cao chiếm 50%, trong đó có bệnh nhân bị 9 lần/năm. 7/24 bệnh nhân có biểu hiện nhiễm trùng nặng bao gồm: nhiễm khuẩn huyết chiếm 20,8%, viêm não 4,1%, viêm màng não 4,1%. Không có trường hợp nào có biểu hiện nhiễm khuẩn khớp trong giai đoạn này.

3.1.2.7. Tiền sử nhiễm khuẩn trong giai đoạn trẻ từ 2 tới 3 tuổi

Bảng 3.5. Tần suất nhiễm khuẩn trước khi được chẩn đoán trong giai đoạn trẻ từ 2 tới 3 tuổi

STT	Loại nhiễm khuẩn	Số BN nhiễm khuẩn/tổng BN	Số lần mắc
1	Viêm phổi	11/22(50%)	Thấp nhất: 1 lần (3 trẻ) Cao nhất: 12 lần (1 trẻ)
2	Viêm tai giữa	13/22 (59%)	Thấp nhất: 1 lần (4 trẻ) Cao nhất: 11 lần (1 lần)
3	Tiêu chảy	2/22 (9%)	Thấp nhất 1 lần Cao nhất 4 lần
4	Viêm khớp	3/22 (13,6%)	Thấp nhất 1 lần (2 trẻ) Cao nhất 5 lần (1 trẻ)
5	Nhiễm khuẩn da – tổ chức dưới da	2/22 (9%)	1 lần

Nhận xét: Trong số 22 bệnh nhân được chẩn đoán sau 2 tuổi, giai đoạn từ 2-3 tuổi: viêm tai giữa chiếm tỷ lệ cao nhất 59%, tiếp đó là viêm phổi chiếm 50%. Có 13,6% bắt đầu có viêm khớp, trong đó có 1 bệnh nhân viêm khớp 5 lần/năm đó. Không có trường hợp nào có biểu hiện nhiễm khuẩn huyết hoặc viêm não – màng não trong giai đoạn này.

3.1.2.8. Tiền sử nhiễm khuẩn trong giai đoạn trẻ từ 3 tới 4 tuổi

Bảng 3.6. Tần suất nhiễm khuẩn trước khi được chẩn đoán trong giai đoạn trẻ từ 3 tới 4 tuổi

STT	Loại nhiễm khuẩn	Số BN nhiễm khuẩn/tổng BN	Số lần mắc
1	Viêm phổi	12/19 (63,1%)	Thấp nhất: 1 lần (4 trẻ) Cao nhất: 8 lần (1 trẻ)
2	Viêm tai giữa	9/19 (47,3%)	Thấp nhất: 1 lần (1 trẻ) Cao nhất: 11 lần (1 lần)
3	Tiêu chảy	1/19 (5,2%)	4 lần
4	Viêm khớp	3/19 (15,7%)	Thấp nhất: 1 lần (2 trẻ) Cao nhất: 6 lần (1 lần)
5	Nhiễm khuẩn huyết	1/19 (5,2%)	1 lần
6	Nhiễm khuẩn da – tổ chức dưới da	4/19 (21,0%)	Thấp nhất 1 lần: 3 trẻ Cao nhất 5 lần: 1 trẻ

Nhận xét: Trong số 19 bệnh nhân được chẩn đoán sau 3 tuổi, giai đoạn từ 3-4 tuổi: viêm phổi và viêm tai giữa chiếm tỷ lệ cao nhất chiếm 63,1% và 47,3%, tiếp đó là nhiễm khuẩn da gây mủ chiếm 21%, viêm khớp chiếm 15,7%.

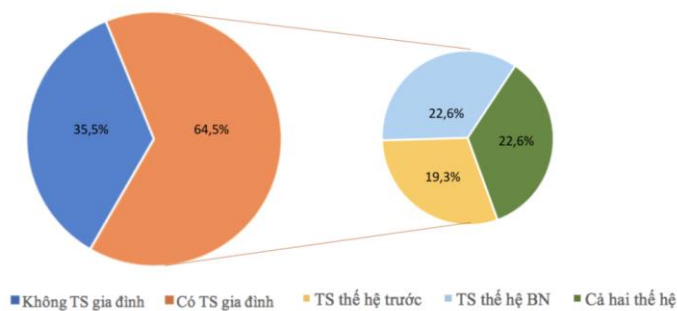
3.1.2.9. Tiền sử nhiễm khuẩn trong giai đoạn trẻ từ 4 tới 5 tuổi

Bảng 3.7. Tần suất nhiễm khuẩn trước khi được chẩn đoán trong giai đoạn trẻ từ 4 tới 5 tuổi

STT	Loại nhiễm khuẩn	Số BN nhiễm khuẩn/tổng BN	Số lần mắc
1	Viêm phổi	11/15 (73,3%)	Thấp nhất: 1 lần (5 trẻ) Cao nhất: 5 lần (1 trẻ)
2	Viêm tai giữa	9/15 (60%)	Thấp nhất: 1 lần (1 trẻ) Cao nhất: 11 lần (1 lần)
3	Tiêu chảy	1/15 (6,6%)	1 lần
4	Viêm khớp	6/15 (40%)	Thấp nhất: 1 lần (2 trẻ) Cao nhất: 3 lần (2 lần)
5	Nhiễm khuẩn huyết	1/15 (6,6%)	1 lần
6	Nhiễm khuẩn da – tổ chức dưới da	1/15 (6,6%)	1 lần

Nhận xét: Trong số 15 bệnh nhân được chẩn đoán sau 4 tuổi, giai đoạn từ 4-5 tuổi: viêm phổi và viêm tai giữa chiếm tỷ lệ cao nhất chiếm 73,3% và 60%, tiếp đó là viêm khớp chiếm 40%.

3.1.3. Tiền sử gia đình



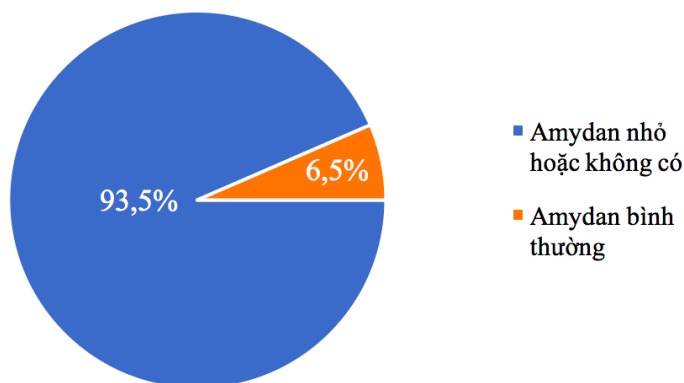
Biểu đồ 3.6. Tiền sử gia đình

Nhận xét: Trong nghiên cứu có 31 bệnh nhân nghiên cứu thuộc 28 gia đình (một gia đình hai con trai bệnh, một gia đình khác có hai con trai bệnh và một anh họ - con dì ruột bệnh nhân bị bệnh). Tính theo từng bệnh nhân, có 20 bệnh nhân (64,5%) có tiền sử gia đình. Trong đó, 45,2% bệnh nhân (14/31) có anh/em trai hoặc anh/em trai họ mẹ được chẩn đoán bệnh XLA (còn sống hoặc đã tử vong) hoặc đã tử vong từ bé do nhiễm khuẩn; 19,3% bệnh nhân (6/31) có cậu/bác trai bên họ mẹ tử vong do nhiễm khuẩn mà không có các anh/em cùng thế hệ mắc bệnh.

Tính theo gia đình, có 60,7% (17/28 gia đình) có tiền sử gia đình có người mắc bệnh. Không có bệnh nhân nào có bố mẹ kết hôn cận huyết.

3.1.4. Đặc điểm lâm sàng thời điểm chẩn đoán bệnh

3.1.4.1. Đặc điểm Amidan tại thời điểm chẩn đoán



Biểu đồ 3.7. Đặc điểm kích thước Amidan

Nhận xét: 93,5% (29/31 bệnh nhân) có Amidan nhỏ hoặc không thấy tổ chức Amidan; chỉ có 6,5% có Amidan bình thường. Không có bệnh nhân nào Amidan quá phát.

3.1.4.2. Tình trạng nhiễm khuẩn tại thời điểm chẩn đoán

Bảng 3.8. Bệnh nhiễm khuẩn tại thời điểm chẩn đoán bệnh XLA

Vị trí nhiễm khuẩn	n	%
Viêm phổi	8	25,8
Nhiễm khuẩn huyết	8	25,8
Viêm khớp	6	19,4
Viêm tai giữa	4	12,9
Viêm đường hô hấp trên	2	6,5
Viêm phổi tràn mủ màng phổi	1	3,2
Áp xe cơ	1	3,2
Viêm não	1	3,2
Không xác định nhiễm khuẩn (Xét nghiệm vì tiền sử anh trai bị XLA)	2	6,5

Nhận xét: Trong số 31 bệnh nhân XLA, có 2 bệnh nhân được chẩn đoán chủ động (do anh trai mắc bệnh), không có nhiễm khuẩn; 29 bệnh nhân (93,5%) được chẩn đoán do nhiễm khuẩn. Trong đó, viêm phổi, nhiễm trùng huyết đều chiếm 25,8%; viêm khớp chiếm 19,4%. 35,5% bệnh nhân (n=11) đến viện được chẩn đoán trong tình trạng nhiễm khuẩn nặng (nhiễm khuẩn huyết, viêm phổi tràn mủ màng phổi, áp xe dưới da, cơ, viêm não). Đặc biệt có 3 bệnh nhân nhiễm khuẩn cùng lúc hai hoặc ba cơ quan.

3.1.4.3. Tuổi chẩn đoán

Bảng 3.9. Phân bố tuổi tại thời điểm bệnh nhân chẩn đoán bệnh XLA

Đặc điểm	Tần số	Tỷ lệ (%)
<i>Tuổi chẩn đoán (n=31)</i>		
Trung bình (tuổi)	5,2	
Trung vị (tuổi)	5,0	
Nhỏ nhất (tuổi)	0,5	
Lớn nhất (tuổi)	14,2	
<i>Nhóm tuổi chẩn đoán (n=31)</i>		
Dưới 2 tuổi	7	22,6
Từ 2 tới < 6 tuổi	13	41,9
≥ 6 tuổi	11	35,5

Nhận xét: Tuổi chẩn đoán trung bình là 5,2 tuổi (62,4 tháng). Tuy nhiên, tuổi chẩn đoán không có phân bố chuẩn. Do đó, chúng tôi báo cáo kết quả trung vị của tuổi chẩn đoán là: 5 tuổi (60 tháng). Chỉ có 22,6% bệnh nhân được chẩn đoán trước 2 tuổi, 64,5% bệnh nhân chẩn đoán trước 6 tuổi.

3.1.4.4. Thời gian chẩn đoán muộn

Bảng 3.10. Thời gian chẩn đoán muộn và tiền sử gia đình

Thời gian chẩn đoán muộn (năm)	Chung	Có tiền sử gia đình	Không có tiền sử gia đình
n	31	20	11
Trung bình	4,43	4,50	4,31
Trung vị	3,67	3,01	4,58
Giá trị nhỏ nhất	0	0	0,85
Giá trị lớn nhất	12,20	12,20	7,52

Nhận xét: Thời gian chẩn đoán muộn được tính bằng khoảng cách từ khi có triệu chứng nhiễm khuẩn đầu tiên tới thời điểm được chẩn đoán. Trung vị thời gian chẩn đoán muộn ở những bệnh nhân có tiền sử gia đình là 3,01 năm, ngắn hơn so với nhóm không có tiền sử gia đình là 4,58 năm. Tuy nhiên, có những bệnh nhân có tiền sử gia đình nhưng vẫn bị chẩn đoán muộn 12,2 năm.

3.1.4.5. Mối liên quan giữa bệnh lúc chẩn đoán và tuổi chẩn đoán

Bảng 3.11. Mối liên quan giữa mức độ nhiễm khuẩn nặng thời điểm chẩn đoán bệnh và tuổi chẩn đoán

Mức độ nhiễm khuẩn Tuổi chẩn đoán	NK nặng n (%)	NK không nặng hoặc chủ động xét nghiệm n (%)
Dưới 6 tuổi	5 (23,8)	15 (76,2)
Trên 6 tuổi	6 (54,5)	5 (45,5)
OR = 0,3, KTC 95%: 0,04-1,7, p= 0,1		

Nhận xét: Bệnh nhân được chẩn đoán bệnh XLA sau 6 tuổi có nguy cơ bị nhiễm khuẩn nặng (nhiễm khuẩn huyết hoặc áp xe dưới da, cơ hoặc viêm màng não hoặc viêm phổi màng phổi - tràn mủ màng phổi) tăng lên 0,3 lần so với nhóm chẩn đoán trước 6 tuổi. Tuy nhiên, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với p = 0,1.

3.1.4.5. Mối liên quan tiền sử gia đình và thời gian chẩn đoán

Bảng 3.12. Mối liên quan giữa tiền sử gia đình và thời gian được chẩn đoán

Đặc điểm	Chung (n=31)	Có tiền sử gia đình (n=20)	Không có tiền sử gia đình (n=11)
<i>Tuổi chẩn đoán (tuổi)</i>			
Trung bình	5,21	5,20	5,22
Trung vị	4,99	4,02	5,19
Giá trị nhỏ nhất	0,49	0,49	1,18
Giá trị lớn nhất	14,21	14,21	9,52
<i>p (Kruskal – Wallis test) = 0,54 (so sánh trung vị của hai nhóm)</i>			
<i>Thời gian chẩn đoán muộn (năm)</i>			
Trung bình	4,54	4,64	4,36
Trung vị	3,74	3,44	4,57
Giá trị nhỏ nhất	0	0	0,85
Giá trị lớn nhất	12,21	12,21	7,52
<i>p (Kruskal – Wallis test) = 0,8 (so sánh trung vị của hai nhóm)</i>			

Nhận xét: Chưa thấy có sự khác biệt về thời gian chẩn đoán và thời gian chẩn đoán muộn giữa hai nhóm có tiền sử gia đình và không có tiền sử gia đình với với p lần lượt là 0,8 và 0,54.

3.1.5. Nồng độ kháng thể

Bảng 3.13. Nồng độ kháng thể tại thời điểm chẩn đoán

Nồng độ kháng thể (g/L) (n=31)	Trung bình	Trung vị	Tối thiểu	Tối đa
IgG	0,673	0,19	0	4,67
IgA	0,043	0,01	0	0,54
IgM	0,214	0,17	0	0,82

Nhận xét: Đa số nồng độ IgG, IgA, IgM của bệnh nhân đều giảm nặng so với chỉ số bình thường của bệnh nhân. Có những bệnh nhân có nồng độ IgG > 2 g/L.

3.1.6. Công thức máu

3.1.6.1. Số lượng bạch cầu

Bảng 3.14. Số lượng bạch cầu tại thời điểm chẩn đoán

Số lượng bạch cầu (n=31)	Trung bình	Trung vị	Tối thiểu	Tối đa
Bạch cầu (G/L)	11,08 ± 6,12	10,7	0,9	21,56
Bạch cầu trung tính (G/L)	5,20 ± 4,94	3,7	0,03	16,8
Bạch cầu lympho (G/L)	3,78 ± 2,25	4,1	0,16	9,5

Nhận xét: Số lượng bạch cầu của bệnh nhân tại thời điểm chẩn đoán dao động nhiều. Số lượng tổng bạch cầu, bạch cầu trung tính hoặc bạch cầu lympho đều có thể giảm nặng trong đợt chẩn đoán bệnh.

3.1.6.2. Số lượng bạch cầu trung tính

Bảng 3.15. Số lượng bạch cầu trung tính tại thời điểm chẩn đoán

Bạch cầu trung tính	n	%
< 0,5 G/L	6	19,35
0,5-1,0 G/L	0	0
> 1,0 G/L	25	80,65
Tổng	31	100

Nhận xét: Có 19,35% bệnh nhân có giảm bạch cầu trung tính tại thời điểm chẩn đoán và đều giảm ở mức độ nặng < 0,5 G/L.

3.1.6.3. Nồng độ Hemoglobin

Bảng 3.16. Nồng độ Hemoglobin của bệnh nhân tại thời điểm được chẩn đoán

Nồng độ Hemoglobin	n	%
< 100 g/dl	5	16,13
100- < 120 g/dl	12	38,71
> 120 g/dl	14	45,16
Tổng	31	100

Nhận xét: Tại thời điểm chẩn đoán, có 54,84% bệnh nhân bị thiếu máu. Trong đó, đa số thiếu máu nhẹ (38,71%). Nồng độ Hemoglobin tối thiểu là 84 g/dL và tối đa là 151 g/dL.

3.1.7. Số lượng tế bào lympho dưới nhóm

Bảng 3.17. Số lượng các tế bào lympho dưới nhóm tại thời điểm chẩn đoán

Lympho dưới nhóm (n=31)		Trung bình	Trung vị	Tối thiểu	Tối đa
Lympho T (TCD3)	Số lượng tế bào/ μ L	4420 $\pm$ 2205	4103	427	9631
	%	90,96 $\pm$ 8,63	93,85	50	97,17
Lympho Th (TCD4)	Số lượng tế bào/ μ L	1952 $\pm$ 1025	1615	128	3926
	%	40,18 $\pm$ 13,11	40,14	19,00	64,90
Lympho Tc (TCD8)	Số lượng tế bào/ μ L	2339 $\pm$ 1490	2459	29	6290
	%	46,89 $\pm$ 15,31	47,30	0,58	72,45
Lympho B (CD19)	Số lượng tế bào/ μ L	8,21 $\pm$ 14,49	1,94	0	52
	%	0,15 $\pm$ 0,30	0	0	1
Nature Killer (CD56)	Số lượng tế bào/ μ L	305 $\pm$ 224	243	11	850
	%	5,99 $\pm$ 3,59	5,20	1,92	18

Nhận xét: Số lượng tế bào lympho T, Th và Tc đa số trong giới hạn bình thường. Số lượng tế bào lympho B (CD19) giảm nặng, trung vị là 2 tế bào/ μ L, tối đa 52 tế bào/ μ L. Tỷ lệ tế bào lympho B đều dưới 1%.

3.1.8. Căn nguyên gây bệnh

Bảng 3.18. Phân bố căn nguyên vi khuẩn gây bệnh trong đợt chẩn đoán

Vị trí nhiễm khuẩn	Số mẫu dương tính	Các vi khuẩn phân lập được
Viêm tai giữa	3/4	Escherichia coli Candida albicans Stenotrophomonas maltophilia
Viêm phổi	1/8	Mycoplasma pneumonia
Viêm khớp	1/6	Pseudomonas aeruginosa
Nhiễm khuẩn huyết	4/8	Staphylococcus aureus Pseudomonas aeruginosa x 2 bệnh nhân Candida albicans
Viêm phổi tràn mủ màng phổi	1/1	Haemophilus influenzae

Nhận xét: Trong số 29 bệnh nhân được chẩn đoán trong đợt nhiễm khuẩn, có 11 bệnh nhân (37,9%) phát hiện được căn nguyên nhiễm khuẩn. Trong đó, 20,7% nhiễm vi khuẩn Gram âm, 3,5% bệnh nhân nhiễm vi khuẩn Gram dương. Bên cạnh đó còn có nấm Candida albicans và Mycoplasma pneumonia.

3.2. Phân tích gen BTK

3.2.1. Tỷ lệ phát hiện đột biến

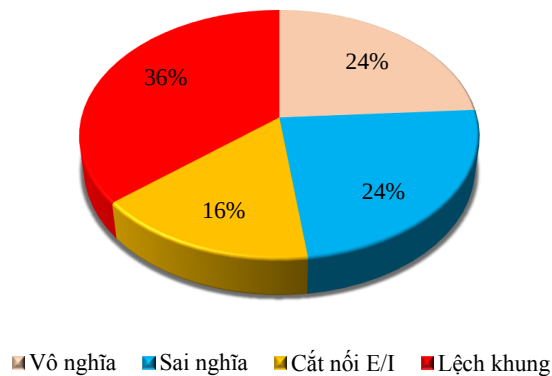
Tất cả 31 bệnh nhân thuộc 28 gia đình được tiến hành xác định đột biến gen BTK. Kỹ thuật MLPA được áp dụng để xác định đột biến mất đoạn và kỹ thuật giải trình tự gen được áp dụng để phát hiện đột biến điểm.

Bảng 3.19. Kết quả xác định đột biến gen BTK bằng phương pháp giải trình tự

Kiểu gen	Số bệnh nhân	Tỷ lệ (%)
Đột biến điểm	25	80,65
Đột biến mất đoạn	2	6,45
Không phát hiện đột biến	4	12,90
Tổng	31	100

Nhận xét: Phân tích gen *BTK* của 31 bệnh nhân, phát hiện 27 bệnh nhân có đột biến (87,1%), trong đó 25 bệnh nhân (80,65%) mang đột biến điểm, 2 bệnh nhân (6,45%) đột biến mất đoạn. Bốn bệnh nhân (trong đó có 3 bệnh nhân cùng gia một gia đình) (12,90%) không phát hiện đột biến trên gen *BTK*.

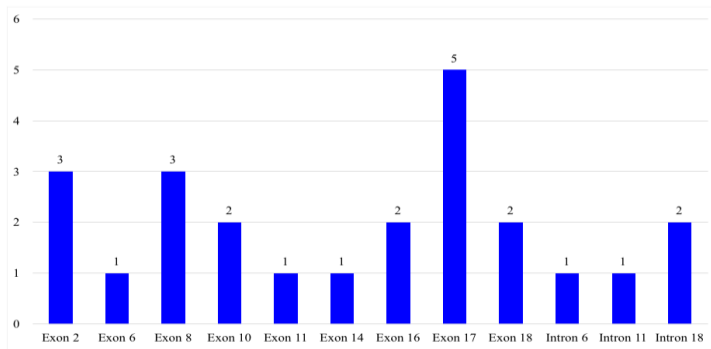
3.2.2. Kiểu đột biến điểm



Biểu đồ 3.8. Kiểu đột biến gen BTK

Nhận xét: Trong số 25 đột biến điểm được xác định, tỷ lệ đột biến dạng lạch khung chiếm tỷ lệ cao nhất với 36% (9/25), đứng thứ 2 là các đột biến sai nghĩa và đột biến vô nghĩa đều chiếm tỷ lệ 24% (6/25). Tiếp đó là đột biến vùng cắt nối exon/intron 16% (4/25).

3.2.3. Phân bố đột biến trên gen *BTK*

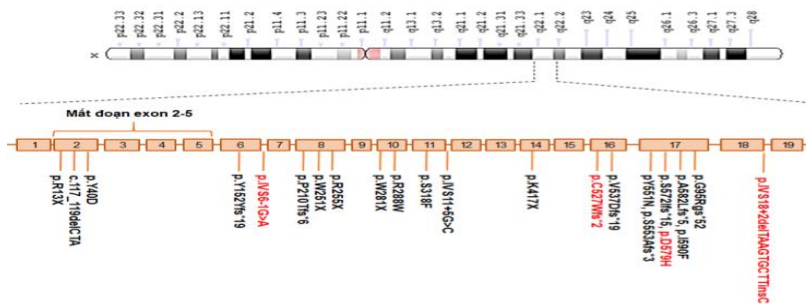


Biểu đồ 3.9. Phân bố đột biến trên gen *BTK*

Nhận xét: Nghiên cứu phát hiện ra 24 đột biến điểm trên gen *BTK* (của 25 bệnh nhân). Các đột biến phân bố trên toàn bộ chiều dài gen. Trong đó, tỷ lệ phát hiện đột biến cao nhất trên exon 17 là 20,8% (5/24 đột biến điểm), tiếp đó là đột biến trên exon 2 là 12,5% (3/24 đột biến). Trên exon 8 cũng có 3 đột biến (chiếm 12,5%), trong đó có 1 đột biến tìm thấy ở hai bệnh nhân không cùng huyết thống.

3.2.4. Vị trí các đột biến trên gen *BTK*

Commented [VANT2]: Sửa theo 27 bệnh nhân có đột biến



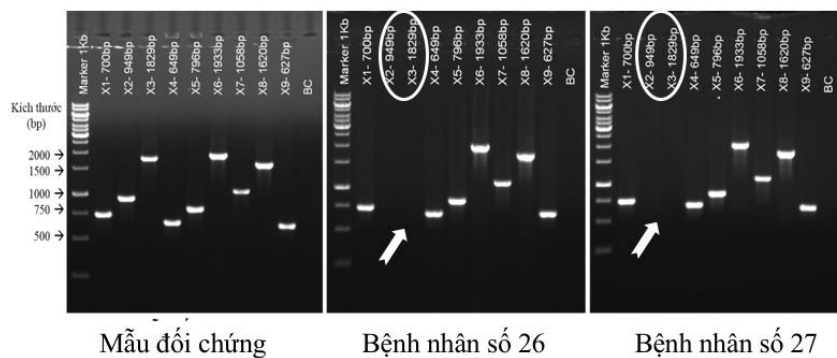
Ghi chú: Chữ màu đen chỉ đột biến đã được công bố trong các nghiên cứu.

Chữ màu đỏ chỉ đột biến mới phát hiện trong nghiên cứu

Hình 3.1. Vị trí các đột biến gen *BTK*

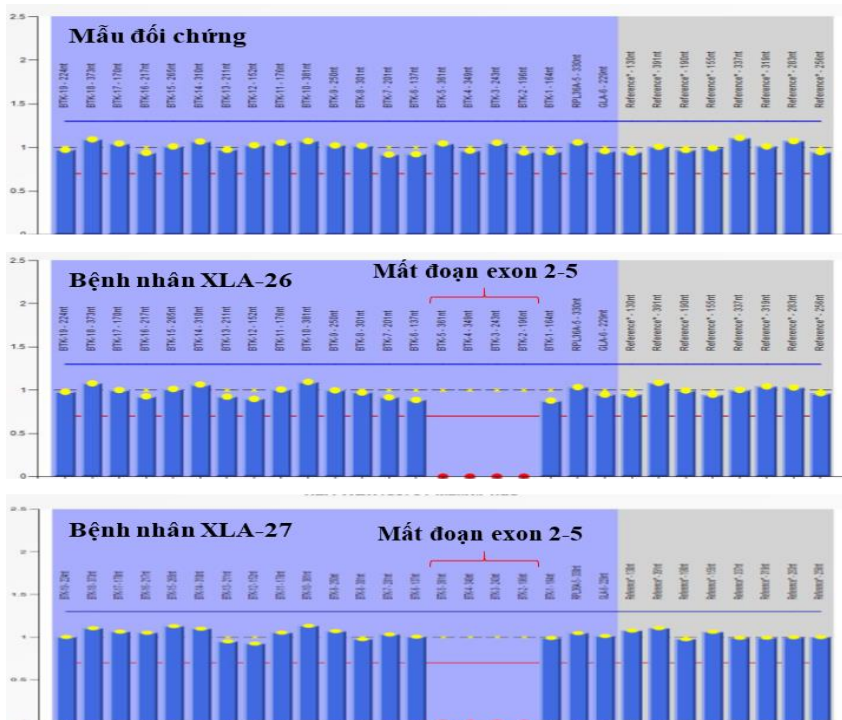
Nhận xét: Trong số 27 bệnh nhân phát hiện được đột biến gen *BTK*, có một cặp anh em có cùng đột biến mất đoạn Exon 2-5 và hai bệnh nhân không cùng huyết thống có đột biến giống nhau ở Intron 18 (c.1908+2_11delinsC) làm thay đổi protein p.IVS18+2_11delinsC. Hai bệnh nhân không cùng huyết thống khác có hai đột biến khác nhau tại Exon 8 lần lượt ở vị trí Nucleotide 752 và 753 nhưng cùng làm thay đổi một kiểu Protein p.Trp251Ter.

3.2.5. Đột biến mất đoạn



Hình 3.2. Ảnh điện di bệnh nhân số 26 và số 27 gen *BTK*

Nhận xét: Trên hình ảnh điện di ADN, hai bệnh nhân số 26 và số 27 (hai anh em trong một gia đình) không xuất hiện băng có kích thước 949 bp (tương ứng với exon 2-3) và 1829 bp (tương ứng với exon 4-5). Khi so sánh với mẫu chứng bình thường, nghi ngờ bệnh nhân số 26 và số 27 mang đột biến mất đoạn lớn trên gen *BTK*. Vì vậy, chúng tôi sử dụng kỹ thuật MLPA để xác định chính xác đột biến mất đoạn hoặc lặp đoạn trên gen *BTK*.



Marker1kb; BC: mẫu không có ADN; 1-9: sản phẩm PCR của exon 1 đến 19

Hình 3.3. Kết quả phân tích MLPA của bệnh nhân số 26 và số 27

Nhận xét: Khi sử dụng kỹ thuật MLPA, bệnh nhân số 26 và số 27 không xuất hiện các đầu dò BTK-2, BTK-3, BTK-4, BTK-5 (tương ứng với exon 2 đến exon 5) của gen *BTK* khi so sánh với mẫu chứng bình thường. Từ đó, khẳng định chắc chắn bệnh nhân số 26 và số 27 bị đột biến mất đoạn từ exon 2 đến exon 5 gen *BTK*.

3.2.6. Phân bố đột biến trên các vùng chức năng

Bảng 3.20. Vị trí đột biến trên các vùng chức năng

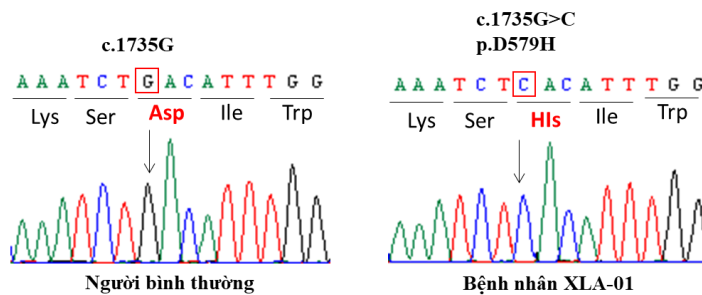
STT	Exon/ Intron	Các đột biến gen <i>BTK</i>		Vùng chức năng	Số lượng BN
		c.DNA	Protein		
1	Exon 2-5	Mất đoạn exon 2-5		PH	2
2	Exon 2	c.37C>T	p.Arg13Ter	PH	1
3	Exon 2	c.117_119del CTA	p.Tyr39Tyrfs*	PH	1
4	Exon 2	c.118T>G	p.Tyr40Asp	PH	1
5	Exon 6	c.456delT	p.Y152Yfs*9	TH	1
6	Intron 6	c.521-1G>A	p.IVS6-1G>A	TH	1
7	Exon 8	c.628_629insA	p.Pro210Thrfs*6	TH	1
8	Exon 8	c.752G>A	p.Trp251Ter	SH3	1
9	Exon 8	c.753G>A	p.Trp251Ter	SH3	1
10	Exon 8	c.763C>T	p.Arg255Ter	SH3	1
11	Exon 10	c.843G>A	p.Trp281Ter	SH2	1
12	Exon 10	c.862C>T	p.Arg288Trp	SH2	1
13	Exon 11	c.953C>T	p.Ser318Phe	SH2	1
14	Intron 11	c.649+5G>C	p.IVS11+5G>C	SH2	1
15	Exon 14	c.1249A>T	p.Lys417Ter	SH1	1
16	Exon 16	c.1578_1581del	p.Cys527Trpfs*2	SH1	1
17	Exon 16	c.1610delT	p.Val537Aspfs*2	SH1	1
18	Exon 17	c.1651T>A	p.Tyr551Asn	SH1	1
19	Exon 17	c.1657delA	p.Ser553Alafs*3	SH1	1
20	Exon 17	c.1714_1715insTA	p.Ser572Ilefs*15	SH1	1
21	Exon 17	c.1735G>C	p.Asp579His	SH1	1
22	Exon 17	c.1744delG	p.Ala582Leufs*5	SH1	1
23	Exon 18	c.1768A>T	p.Ile590Phe	SH1	1
24	Exon 18	c.1782del G	p.Gly594Glyfs*52	SH1	1
25	Intron 18	c.1908+2_11delinsC	p.IVS18+2_11delinsC	SH1	2

Nhận xét: 25 kiểu đột biến được phát hiện trên 27 bệnh nhân. Trong đó có 2 bệnh nhân mất đoạn Exon 2-5 là hai anh em ruột trong một gia đình; 2 bệnh nhân đột biến Intron 18 là hai bệnh nhân thuộc hai gia đình không cùng huyết thống.

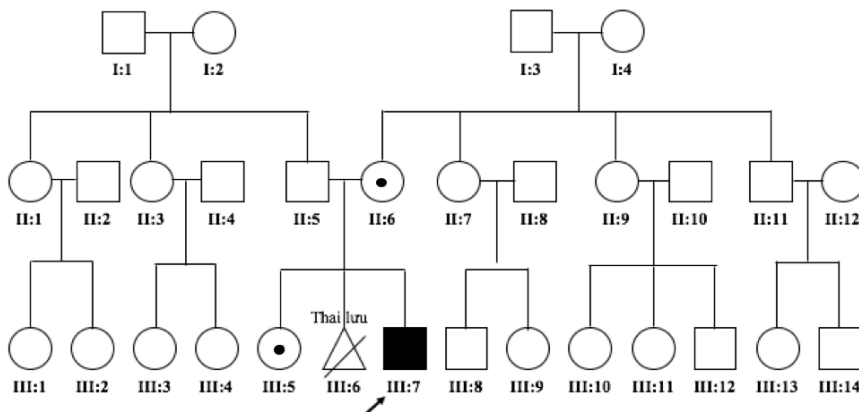
3.2.7. Đột biến mới

So sánh kết quả giải trình tự gen thu được với các nguồn dữ liệu đột biến gen người (HGMD) (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>) và nguồn dữ liệu đột biến gen mở Leiden (LOVD) (<http://www.lovd.nl/3.0/home>), nghiên cứu phát hiện 04 đột biến mới ở gen *BTK* chưa được công bố.

➤ Đột biến *c.1735G>C* (*p.Asp579His*) trên gen *BTK*:



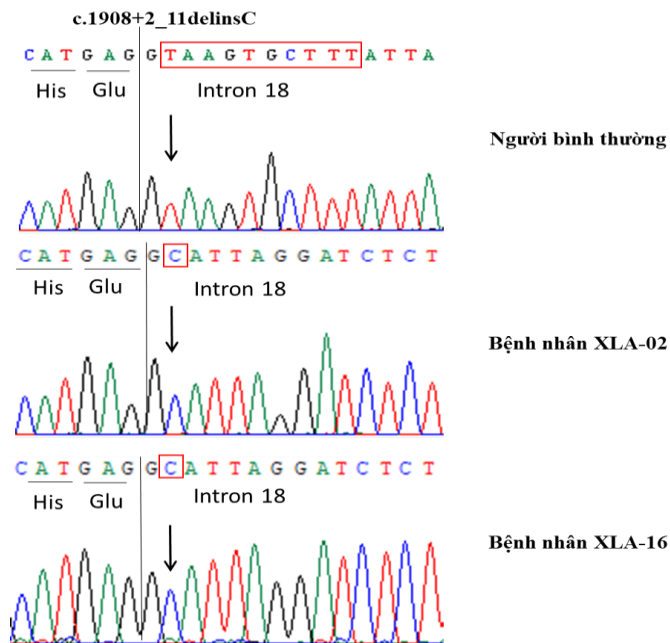
Hình 3.4. Ảnh đột biến *c.1735G>C* (*p.Asp579His*) trên gen *BTK*



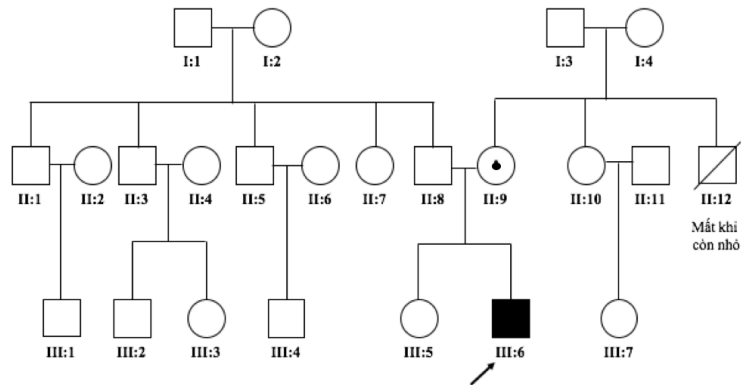
Hình 3.5. Phả hệ của bệnh nhân số 01

Nhận xét: Giải trình tự gen bệnh nhân số 01 phát hiện đột biến c.1735G>C (p.Asp579His) trên exon 17 gen *BTK*. Đột biến c.1735G>C (p.Asp579His) là đột biến sai nghĩa, xảy ra tại vị trí 1735 nucleotide G thay thế bằng nucleotide C dẫn đến bộ ba thứ 579 GAC mã hóa acid amin Aspartic chuyển thành CAC mã hóa acid amin Histidine. Mẹ và chị gái bệnh nhân phát hiện được đột biến giống bệnh nhân.

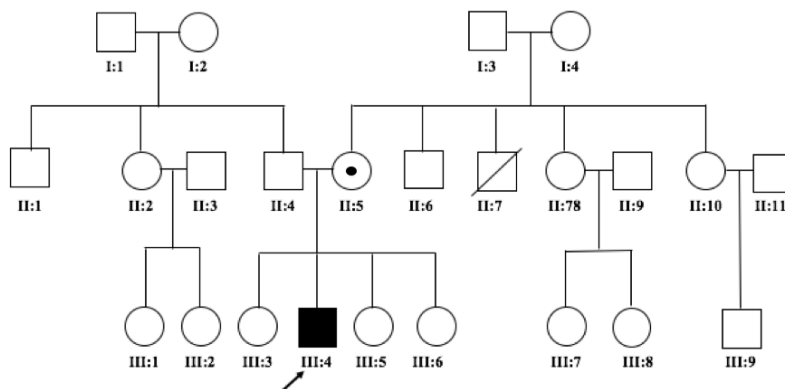
➤ Đột biến c.1908+2_11delinsC trên gen *BTK*:



Hình 3.6. Ảnh đột biến c.1908+2_11delinsC trên gen *BTK*



Hình 3.7. Phả hệ của bệnh nhân số 02

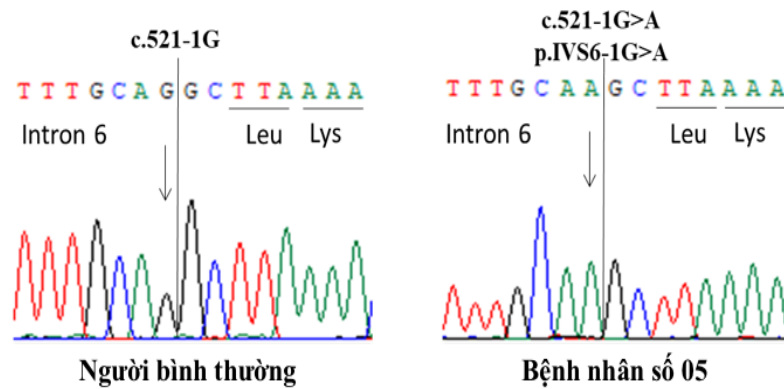


Hình 3.8. Phả hệ của bệnh nhân số 16

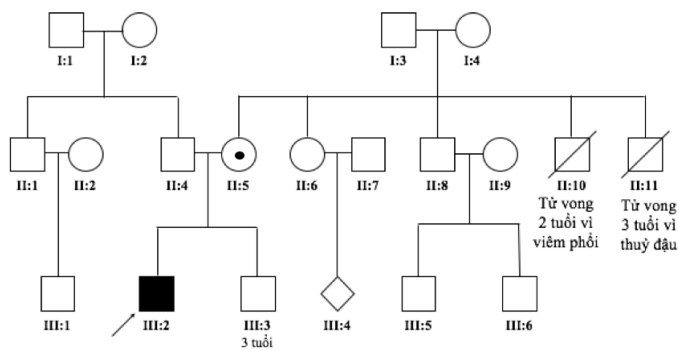
Nhận xét: Hai bệnh nhân số 02 và số 16 không có quan hệ huyết thống. Giải trình tự gen *BTK* của hai bệnh nhân này đều phát hiện đột biến c.1908+2_11delinsC (p.IVS18+2_11delinsC) trên intron 18 gen *BTK*. Đột biến p.IVS18+2_11delinsC là đột biến vùng cắt nối trên intron 18, xảy ra tại vị trí 1908+2 xóa 10 nucleotide TAAGTGCTTT và thêm một nucleotide C do đó làm thay đổi các vị trí báo hiệu cho việc cắt chính xác các đoạn intron.

Cả hai mẹ bệnh nhân số 02 và số 16 có đột biến giống con trai.

➤ Đột biến c.521-1G>A (p.IVS6-1G>A) trên gen BTK:



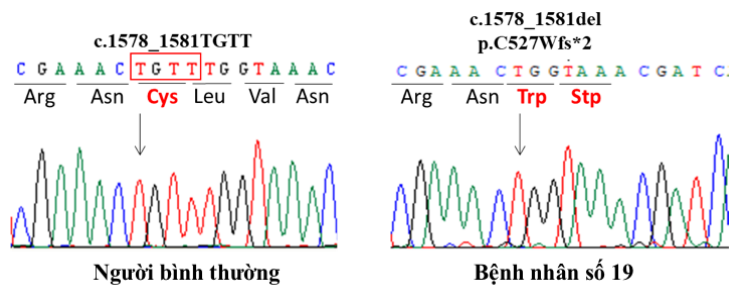
Hình 3.9. Ảnh đột biến c.521-1G>A (p.IVS6-1G>A) trên gen BTK



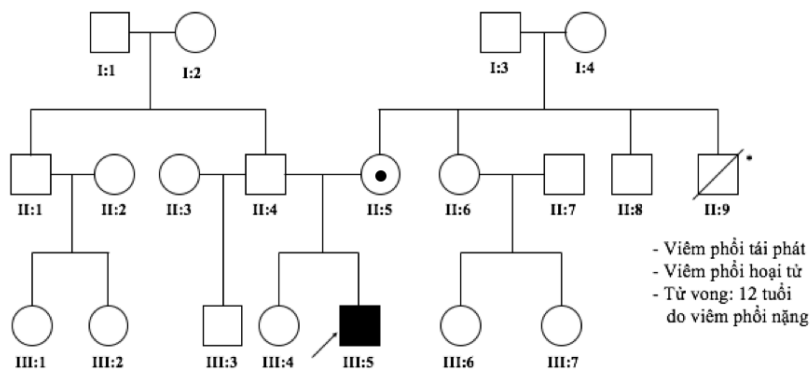
Hình 3.10. Phả hệ của bệnh nhân 05

Nhận xét: Giải trình tự gen BTK bệnh nhân số 05 phát hiện đột biến c.521-1G>A (p.IVS6-1G>A) trên intron 6 gen BTK. Đột biến p.IVS6-1G>A là đột biến vùng cắt nối trên intron 6, xảy ra tại vị trí 521-1 nucleotide G thay thế bằng nucleotide A do đó làm thay đổi các vị trí báo hiệu cho việc cắt chính xác các đoạn intron. Mẹ bệnh nhân mang đột biến giống của bệnh nhân.

➤ Đột biến c.1578_1581del (p.Cys527Trpfs*2) trên gen BTK:



Hình 3.11. Ảnh đột biến c.1578_1581del (p.Cys527Trpfs*2) trên gen BTK



Hình 3.12. Phả hệ của bệnh nhân số 19

Nhận xét: Giải trình tự gen BTK bệnh nhân số 19 phát hiện đột biến c.1578_1581del (p.Cys527Trpfs*2) trên exon 17 của gen BTK. Đột biến c.1578_1581del (p.Cys527Trpfs*2) là đột biến dịch khung, xảy ra tại vị trí 1578 đến 1581 xóa 04 nucleotide TGTT dẫn đến bộ ba TGT mã hóa acid amin Cysteine ở vị trí 527 chuyển thành TGG mã hóa acid amin Tryptophan và tạo mã kết thúc TAA tại vị trí 528. Mẹ của bệnh nhân mang đột biến giống bệnh nhân.

3.2.8. Đặc điểm của bệnh nhân có đột biến mới

Bảng 3.21. Đặc điểm lâm sàng, xét nghiệm miễn dịch của những bệnh nhân có đột biến mới chưa được công bố trên gen BTK

Bệnh nhân	Đột biến	Tháng tuổi khởi phát	Triệu chứng lâm sàng trước khi được chẩn đoán	IgG (g/L)	IgA (g/L)	IgM (g/L)	CD19 (TB/ μ L)	CD 19 (%)
BN 1	c.1735G>C	4	Viêm tai giữa, Nhiễm khuẩn huyết, nhiễm khuẩn ngoài da	3,17	0,03	0,07	5,0	0,0
BN 2	c.1908+2_11delinsC	6	Viêm phổi	0,01	0,01	0,09	1,0	0,0
BN 16	c.1908+2_11delinsC	3	Viêm phổi, nhiễm khuẩn huyết	0,21	0,01	0,23	1,94	0,0
BN 5	c.521-1G>A	5	Viêm tai giữa, viêm phổi, nhiễm khuẩn huyết, nhiễm khuẩn ngoài da, viêm não	0,07	0,00	0,14	8,0	0,00
BN 19	c.1578_1581del	7	Viêm phổi	0,03	0,54	0,24	4,9	0,08

Ghi chú: IgG, IgA, IgM, CD19 tại thời điểm chẩn đoán

Nhận xét: 5 bệnh nhân có đột biến mới chưa được công bố, trong đó bệnh nhân số 2 và số 16 không có quan hệ huyết thống nhưng có đột biến giống nhau là c.1908+2_11delinsC. Những bệnh nhân này có triệu chứng lâm sàng nhiễm khuẩn tái diễn hoặc nhiễm khuẩn nặng trước khi được chẩn đoán bệnh. Số lượng tế bào lympho B trong máu ngoại vi đều gần bằng 0. Chỉ có bệnh nhân số 01 có nồng độ IgG > 2 g/L, các bệnh nhân còn lại đều có IgG, IgM, IgA giảm nặng dưới – 2SD so với tuổi.

3.2.9. Đặc điểm của bệnh nhân không tìm thấy đột biến

Bảng 3.22. Đặc điểm điểm lâm sàng, xét nghiệm miễn dịch của những bệnh nhân không tìm thấy đột biến

Gia đình	Bệnh nhân	Tháng tuổi khởi phát	Triệu chứng lâm sàng trước khi chẩn đoán	IgG (g/L) *	IgA (g/L)	IgM (g/L)	CD19 (TB/ μ L)	CD 19 (%)
1	BN 9	2	Viêm tai giữa, ỉa chảy nhiễm khuẩn, viêm khớp	1,28	0,18	0,23	1,00	0,00
	BN 10	4	Viêm tai giữa, viêm khớp	0,2	0,02	0,39	0,00	0,00
	BN 30	24	Viêm phổi, viêm màng não, nhiễm khuẩn huyết, nhiễm khuẩn da	0,05	0,00	0,07	46,00	1,00
2	BN 20	9	Viêm phổi, nhiễm khuẩn da	0,62	0,01	0,82	0,00	0,00

*Ghi chú *: IgG, IgA, IgM, CD19 tại thời điểm chẩn đoán*

Nhận xét: Bốn bệnh nhân (thuộc hai gia đình khác nhau) không tìm thấy đột biến trên gen *BTK*. Những bệnh nhân này có triệu chứng lâm sàng nhiễm khuẩn tái diễn hoặc nhiễm khuẩn nặng trước khi được chẩn đoán bệnh. Nồng độ kháng thể IgG, IgA, IgM và số lượng tế bào lympho B trong máu ngoại vi đều giảm nặng, đủ tiêu chuẩn chẩn đoán có thể mắc bệnh XLA.

3.2.10. Kiểu gen của mẹ và chị em gái bệnh nhân

Nghiên cứu đã tiến hành phân tích gen *BTK* cho tất cả 26 mẹ (1 mẹ có hai con trai mắc bệnh) và 10 chị em gái của 27 bệnh nhân đã tìm thấy đột biến.

Bảng 3.23. Kết quả đột biến gen BTK của mẹ và các chị em gái

STT	Exon/ Intron	Đột biến bệnh nhân (n=27)	Đột biến của mẹ BN (n=26)	Đột biến của chị/em gái BN (n=10)
1	Exon 2-5	Mất đoạn exon 2-5	Mất đoạn exon 2-5	
2	Exon 2	c.37C>T	c.37C>T	
3	Exon 2	c.117_119del CTA	c.117_119del CTA	
4	Exon 2	c.118T>G	c.118T>G	c.118T>G
5	Exon 6	c.456delT	c.456delT	Không phát hiện đột biến
6	Intron 6	c.521-1G>A	c.521-1G>A	
7	Exon 8	c.628_629insA	c.628_629insA	Chị gái 1: c.628_629insA Chị gái 2: Không phát hiện đột biến
8	Exon 8	c.752G>A	Không phát hiện đột biến	
9	Exon 8	c.753G>A	c.753G>A	c.753G>A
10	Exon 8	c.763C>T	c.763C>T	
11	Exon 10	c.843G>A	Không phát hiện đột biến	
12	Exon 10	c.862C>T	c.862C>T	c.862C>T
13	Exon 11	c.953C>T	c.953C>T	
14	Intron 11	c.649+5G>C	c.649+5G>C	Không phát hiện đột biến
15	Exon 14	c.1249A>T	c.1249A>T	

STT	Exon/ Intron	Đột biến bệnh nhân (n=27)	Đột biến của mẹ BN (n=26)	Đột biến của chị/em gái BN (n=10)
16	Exon 16	c.1578_1581del	c.1578_1581del	
17	Exon 16	c.1610delT	c.1610delT	Không phát hiện đột biến
18	Exon 17	c.1651T>A	c.1651T>A	
19	Exon 17	c.1657delA	c.1657delA	
20	Exon 17	c.1714_1715insTA	c.1714_1715insTA	
21	Exon 17	c.1735G>C	c.1735G>C	c.1735G>C
22	Exon 17	c.1744delG	c.1744delG	
23	Exon 18	c.1768A>T	c.1768A>T	
24	Exon 18	c.1782del G	c.1782del G	c.1782del G
25	Intron 18	c.1908+2_11delinsC	c.1908+2_11delinsC	
26	Intron 18	c.1908+2_11delinsC	c.1908+2_11delinsC	

Nhận xét: 24/26 mẹ bệnh nhân có dị hợp tử đột biến trên gen *BTK*, 2 mẹ không phát hiện đột biến: mẹ bệnh nhân số 03 (đột biến c.752G>A) và mẹ bệnh nhân số 18 (đột biến c.843G>A). Trong số 10 chị, em gái của bệnh nhân được phân tích gen *BTK*, có 6 người có đột biến giống như bệnh nhân, 4 người không có đột biến.

3.3. Điều trị

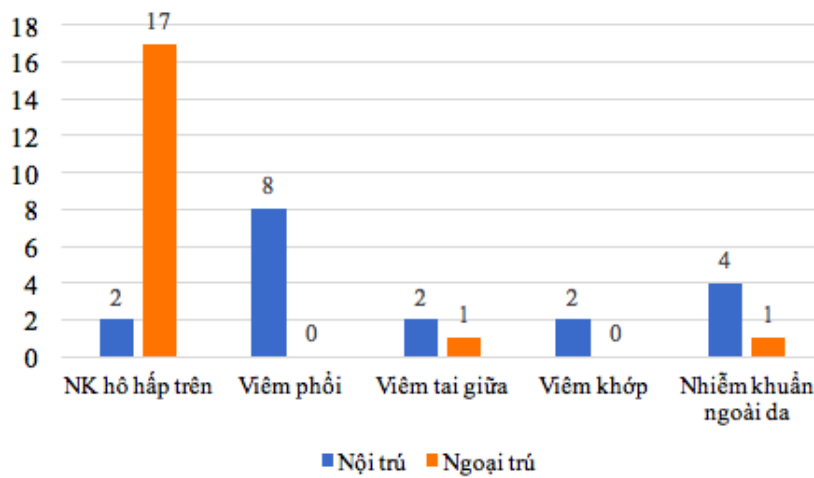
Trong số 31 bệnh nhân đã tham gia nghiên cứu, 2 bệnh nhân tử vong ngay sau khi được chẩn đoán và điều trị lần đầu, 1 bệnh nhân dừng điều trị do bệnh nặng, 28 bệnh nhân sống được điều trị IVIG mỗi 4 tuần một lần trong vòng 6 tháng, 27 bệnh nhân hoàn thành quá trình điều trị, 1 bệnh nhân dừng điều trị ở lần thứ tư do gia đình không có khả năng chi trả kinh phí điều trị.

3.3.1. Liều điều trị

Liều điều trị IVIG trung bình mỗi đợt truyền là $0,58 \pm 0,10$ g/kg/lần.
Khoảng cách trung bình giữa các đợt truyền là $4,13 \pm 0,59$ tuần.

3.3.2. Triệu chứng lâm sàng trong thời gian điều trị

3.3.2.1. Tình trạng nhiễm khuẩn chung



Biểu đồ 3.10. Tình trạng nhiễm khuẩn trong 6 tháng điều trị

Nhận xét: Trong thời gian theo dõi 6 tháng, có 11 bệnh nhân phải nhập viện điều trị nhiễm khuẩn ít nhất 1 lần. Viêm đường hô hấp trên là thường gặp nhất, sau đó tới viêm phổi, nhiễm khuẩn ngoài da. Tổng số lượt điều trị nội trú là 19 lượt (tương đương 0,7 lượt/bệnh nhân/6 tháng).

3.3.2.2. Viêm phổi

Bảng 3.24. So sánh tần suất viêm phổi trung bình trong 6 tháng trước điều trị và 6 tháng điều trị

Chỉ số	Trước điều trị (n=27)	Sau điều trị (n=27)
Trung bình	$1,2 \pm 1,95$	$0,24 \pm 0,80$
Trung vị	0,29	0
Tối thiểu	0	0
Tối đa	7,4	4
Kiểm định so sánh 2 trung vị (Wilcoxon signed-rank test)	p =0,003	

Nhận xét: trung vị tần suất viêm phổi trung bình mỗi 6 tháng trước điều trị của bệnh nhân là 0,29 lần, cao hơn một cách có ý nghĩa thống kê so với tần suất viêm phổi trong vòng 6 tháng điều trị với p=0,003. Bệnh nhân có số lần viêm phổi nhiều nhất trước điều trị là 7,4 lần/6 tháng.

3.3.2.3. Viêm tai giữa

Bảng 3.25. So sánh tần suất viêm tai giữa trung bình trong 6 tháng trước điều trị và 6 tháng điều trị

Chỉ số	Trước điều trị (n=27)	Sau điều trị (n=27)
Trung bình	$0,23 \pm 0,30$	$0,11 \pm 0,32$
Trung vị	0,08	0
Tối thiểu	0	0
Tối đa	1,11	1,00
Kiểm định so sánh 2 trung vị (Wilcoxon signed-rank test)	p =0,013	

Nhận xét: trung vị tần suất viêm tai giữa trong mỗi 6 tháng trước điều trị của bệnh nhân là 0,08 lần, cao hơn một cách có ý nghĩa thống kê so với tần suất viêm tai giữa trong vòng 6 tháng điều trị là 0 lần với p=0,013.

3.3.2.4. Các nhiễm khuẩn khác

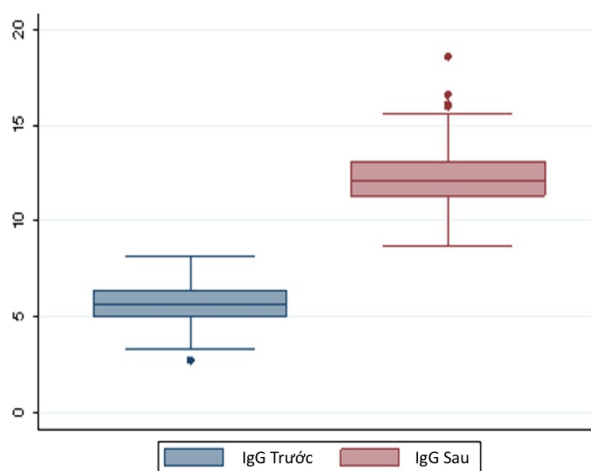
Bảng 3.26. Các loại nhiễm khuẩn khác trong 6 tháng điều trị

Loại nhiễm khuẩn	Tháng đầu	Tháng thứ 2	Tháng thứ 3	Tháng thứ 4	Tháng thứ 5	Tháng thứ 6
Viêm khớp	1	1	1	0	0	1
Nhiễm khuẩn da	2	0	1	1	1	0
Nhiễm khuẩn nặng	0	0	0	0	0	0

Nhận xét: Trong thời gian 6 tháng điều trị IVIG, bệnh nhân vẫn còn một vài đợt nhiễm khuẩn khác như viêm da, viêm khớp. Không có bệnh nhân nào bị nhiễm khuẩn nặng (viêm não, viêm màng não, nhiễm khuẩn huyết).

3.3.3. Nồng độ kháng thể trong thời gian điều trị

3.3.3.1. Nồng độ Immunoglobulin G



Biểu đồ 3.11. Nồng độ IgG trước và sau mỗi đợt điều trị

Nhận xét: Trong 161 lượt điều trị của 27 bệnh nhân, nồng độ IgG trung bình trước truyền là $5,65 \pm 1,20$ g/L. Nồng độ IgG trung bình sau truyền là $12,37 \pm 1,63$ g/L.

3.3.3.2. Mối liên quan giữa liều điều trị và nồng độ IgG trong máu

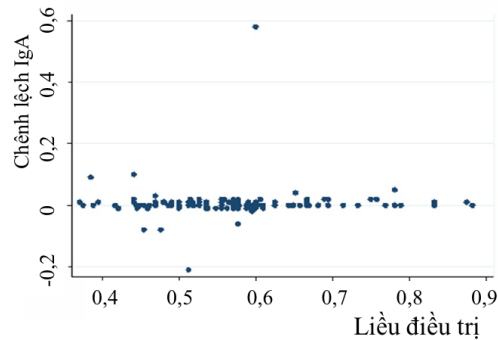
Bảng 3.27. Mối liên quan giữa liều điều trị và sự cải thiện IgG

Yếu tố cố định	Sự thay đổi của IgG sau so với trước	Khoảng tin cậy 95%		Giá trị p
Hằng số	3,15	1,87	4,43	<0,001
Liều	6,23	4,09	8,37	<0,001
Yếu tố ngẫu nhiên				
Bệnh nhân	ICC=0,241			
ICC: Intraclass Correlation Coefficiene				

Nhận xét: Do có nhiều quan sát trên cùng 1 bệnh nhân nên để đánh giá mối liên quan giữa liều điều trị (của các lần điều trị) và sự cải thiện IgG trong các lần điều trị đó, phân tích đa tầng (multilevel model/mixed effect model/random-fixed effect model) đã được sử dụng. Sự cải thiện IgG được đánh giá bằng hiệu số IgG sau truyền so với IgG trước truyền ở từng bệnh nhân tại từng thời điểm điều trị. Kết quả phân tích đa tầng cho thấy có mối liên quan giữa liều điều trị và sự cải thiện IgG.

Ở liều điều trị trung bình là 0,58 g/kg cân nặng, IgG của bệnh nhân sẽ cải thiện trung bình là 3,15 g/L. Sau đó, khi liều điều trị tăng lên 1 đơn vị (1 g/kg cân nặng), nồng độ IgG sau truyền tăng lên 6,23 đơn vị (6,23 g/L). Kết quả phân tích cũng cho thấy sự đáp ứng với liều điều trị của từng bệnh nhân là không giống nhau. Các yếu tố bản thân người bệnh có thể đóng góp 24,1% vào việc giải thích sự chênh lệch IgG trước và sau khi truyền.

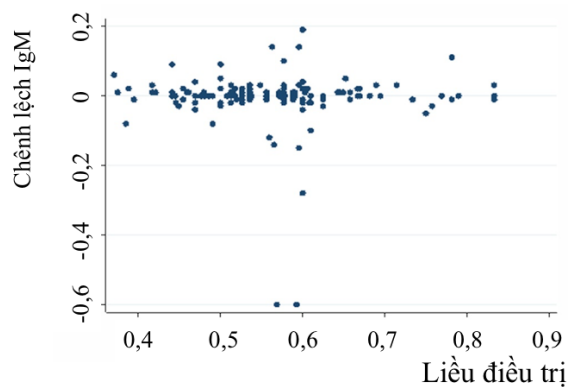
3.3.3.3. Mối liên quan giữa liều điều trị và sự chênh lệch nồng độ IgA trước và sau điều trị



Biểu đồ 3.12. Mối liên quan giữa liều điều trị và sự chênh lệch nồng độ IgA trước và sau điều trị

Nhận xét: Sự chênh lệch nồng độ IgA trước và sau truyền không liên quan tới liều IVIG dao động ($p=0,733$). Nghĩa là nồng độ IgA sau điều trị không thay đổi so với trước khi điều trị dù liều IVIG thay đổi.

3.3.3.4. Mối liên quan giữa liều điều trị và sự chênh lệch nồng độ IgM trước và sau điều trị



Biểu đồ 3.13. Mối liên quan giữa liều điều trị và sự chênh lệch nồng độ IgM trước và sau điều trị

Nhận xét: Sự chênh lệch nồng độ IgM trước và sau truyền không liên quan tới liều IVIG dao động ($p=0,975$). Nghĩa là nồng độ IgM sau điều trị không thay đổi so với trước khi điều trị dù liều IVIG thay đổi.

3.3.4. Mối liên quan giữa triệu chứng lâm sàng và nồng độ IgG đáy

Bảng 3.28. Mối liên quan giữa nồng độ IgG đáy và tình trạng nhiễm khuẩn

Yếu tố	OR	KTC 95% của OR		p
IgG đáy	0,76	0,46	1,24	0,267
Giá trị Rho	Rho = 0,376			

Nhận xét: Tình trạng nhiễm khuẩn là có bất cứ một triệu chứng nhiễm khuẩn (bao gồm tất cả các loại nhiễm khuẩn: viêm đường hô hấp, viêm khớp...). Nồng độ IgG đáy trung bình trước mỗi đợt truyền là $5,65 \pm 1,20$ g/L. Kết quả phân tích đa tầng cho thấy mối liên quan giữa nồng độ IgG đáy và tình trạng nhiễm khuẩn có OR là 0,76, nghĩa là khi nồng độ IgG đáy tăng lên 1 g/L, nguy cơ bị nhiễm khuẩn của trẻ giảm 24%. Tuy nhiên sự thay đổi này không có ý nghĩa thống kê vì $p=0,267$.

3.3.4.1. Mối liên quan giữa triệu chứng nhiễm khuẩn đường hô hấp và nồng độ IgG đáy

Bảng 3.29. Mối liên quan giữa nồng độ IgG đáy và tần suất bị nhiễm khuẩn hô hấp của trẻ

Yếu tố	Hệ số hồi quy	KTC 95% của hệ số hồi quy		p
IgG-Trough	0,015	-0,014	0,17	0,846
Giá trị ICC	ICC xấp xỉ bằng 0			

Nhận xét: Tần suất nhiễm khuẩn hô hấp được tính bằng số lần nhiễm khuẩn hô hấp (bao gồm: viêm phổi, viêm tai giữa, viêm đường hô hấp trên) trong vòng 6 tháng. Kết quả phân tích đa tầng cho thấy tần suất bị nhiễm khuẩn hô hấp của trẻ không có mối liên quan giữa nồng độ IgG đáy và tần suất bị nhiễm khuẩn hô hấp của trẻ vì $p=0,846$.

CHƯƠNG 4

BÀN LUẬN

Trong nghiên cứu, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu các đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng, chẩn đoán xác định và điều trị cho 31 bệnh nhân thuộc 28 gia đình khác nhau tại bệnh viện Nhi Trung Ương. Đây là báo cáo về bệnh không có Gammaglobulin máu liên kết nhiễm sắc thể giới tính X có số lượng bệnh nhân lớn nhất tại Việt Nam cho tới nay.

4.1. Triệu chứng lâm sàng và xét nghiệm miễn dịch

4.1.1. Đặc điểm chung của nhóm nghiên cứu

Tuổi

Bệnh XLA mặc dù là bệnh suy giảm miễn dịch bẩm sinh nhưng không có các bất thường về hình thái dễ có thể dễ dàng nhận biết ngay khi trẻ ra đời. Bệnh thường chỉ được phát hiện khi trẻ nhiễm khuẩn nhiều đợt hoặc nhiễm khuẩn nặng cần điều trị kháng sinh mạnh hoặc kéo dài.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, tuổi trung bình của bệnh nhân là 6,27 tuổi. Trong đó trẻ nhỏ nhất là 11 tháng tuổi, lớn nhất là 15,3 tuổi. Chỉ có 16,13% bệnh nhân trên 10 tuổi. Như vậy, nhóm bệnh nhân XLA của chúng tôi còn khá trẻ so với các nước trên thế giới. Nguyên nhân là do bệnh XLA mới được chẩn đoán xác định và theo dõi điều trị trong khoảng 10 năm tại Việt Nam [117] [118] [65].

Trên thế giới, bệnh nhân XLA đã được chẩn đoán và phát hiện và điều trị IVIG từ vài chục năm trước nên rất nhiều bệnh nhân XLA sống đến tuổi trưởng thành; độ tuổi bệnh nhân dao động rất lớn. Tại Mỹ, có những bệnh nhân trên 50 tuổi, của Trung Quốc, Hồng Kong có những bệnh nhân trên 30 tuổi [17-119-120]. Tại Ấn Độ, cũng có những bệnh nhân trên 18 tuổi [121].

Giới

Tất cả bệnh nhân trong nhóm nghiên cứu của chúng tôi đều là nam giới do dựa trên tiêu chuẩn chẩn đoán của Hội suy giảm miễn dịch châu Âu – và Pan – American năm 1999 [12]. Đây là tiêu chuẩn được sử dụng rộng rãi nhất cho hầu hết tất cả các nghiên cứu về bệnh XLA trên toàn thế giới do đặc điểm đột biến gen nằm trên nhiễm sắc thể X nên thường gặp ở trẻ trai. Tuy nhiên, cho tới nay đã có một vài trường hợp bệnh nhân nữ mắc bệnh được báo cáo như bệnh nhân nữ người Nhật bản do đột biến trên một nhiễm sắc thể X nhưng nhiễm sắc thể X bình thường lại bất hoạt [122].

Phát triển thể chất

Cân nặng khi sinh là một trong những yếu tố ảnh hưởng tới mức độ nhiễm khuẩn sau sinh của trẻ em. Một số nghiên cứu còn cho thấy rằng những người có cân nặng lúc sinh thấp mang nguy cơ nhiễm trùng đường hô hấp và suy hô hấp cao hơn so 83% so với những người có cân nặng khi sinh bình thường [123].

Cân nặng trung bình của bệnh nhân trong nhóm nghiên cứu của chúng tôi là 3132,3 gram. Chỉ có hai bệnh nhân có cân nặng khi sinh dưới 2500 gram. Như vậy, khi sinh ra, trẻ suy giảm miễn dịch bẩm sinh không có biểu hiện bên ngoài cũng như cân nặng bất thường để có thể gợi ý mắc bệnh có tính chất bẩm sinh, di truyền.

Mặc dù trẻ bị nhiễm khuẩn tái diễn nhưng thể trạng của bệnh nhân trong nghiên cứu của chúng tôi ít bị ảnh hưởng. Tại thời điểm được chẩn đoán bệnh, chỉ có 9,7% bệnh nhân có chiều cao dưới -2SD và 19,4% bệnh nhân có cân nặng dưới -2SD. Những bệnh nhân có chiều cao, cân nặng thấp nhưng không dưới -3SD.

Kích thích Amidan

Ở người bình thường, tế bào lympho B sau khi được sinh ra tại tủy xương sẽ biệt hoá thành các tế bào có đầy đủ các kháng thể bề mặt (sIgM,

sIgD, sIgA, sIgG) và các thụ thể Fc của globulin miễn dịch. Các tế bào này sẽ đến các mô lympho ngoại vi như hạch, tổ chức Amidan, VA... Tại cơ quan lympho ngoại vi, các tế bào này bị kích thích bởi kháng nguyên sẽ phân chia, biệt hoá thành các tương bào sản xuất các kháng thể IgG, IgM, IgE, IgA, IgD và để lại các tế bào có trí nhớ miễn dịch [124] [125]. Bên cạnh đó, khi các kháng nguyên xâm nhập vào cơ thể, các nang lympho nguyên phát sẽ phát triển rộng ra, xuất hiện các trung tâm mầm. Ở những bệnh nhân Suy giảm miễn dịch thể XLA, do có sự gián đoạn biệt hoá từ giai đoạn tế bào Pre B thành tế bào Pro B nên rất ít hoặc không có tế bào lympho B trưởng thành trong các hạch ngoại vi. Hạch lympho ngoại vi luôn nhỏ, ngay cả khi có các kích thích của các kháng nguyên xâm nhập vào cơ thể.



A/ Amidan bình thường



B/ Không thấy Amidan
(Bệnh nhân số 17 – 8 tuổi)

Hình 4.1. Hình ảnh Amidan bình thường và Amidan của bệnh nhân

Trong nghiên cứu của chúng tôi, 93,5% bệnh nhân có tổ chức Amidan nhỏ hoặc không thấy; chỉ 6,5% bệnh nhân có Amidan kích thước bình thường và không có bệnh nhân nào có Amidan quá phát mặc dù đa số bệnh nhân đều nhiễm khuẩn hô hấp trên tái phát nhiều đợt. Kết quả này tương tự như các nghiên cứu khác của các tác giả Conley, Lee, Basile, 80%-86% bệnh nhân XLA không tìm thấy tổ chức Amidan [35] [120] [126]. Như vậy, trái ngược

với các bệnh nhân XLA, những trẻ có hệ miễn dịch bình thường nếu nhiễm khuẩn hô hấp trên nhiều lần Amidan và tổ chức lympho vùng hầu họng phát triển mạnh và có thể quá phát. Vì vậy, tổ chức Amidan nhỏ ở bệnh nhân nhiễm khuẩn tái diễn là một trong các dấu hiệu cảnh báo sớm, phát hiện rất dễ dàng và có thể giúp các bác sĩ lâm sàng nghĩ tới trẻ có khả năng bị bệnh XLA.

4.1.2. Tiền sử bệnh

4.1.2.1. Tuổi khởi phát

Bệnh nhân suy giảm miễn dịch thể dịch nói chung và thể XLA nói riêng do giảm số lượng kháng thể nên dẫn đến tình trạng nhiễm trùng. Tuổi khởi phát nhiễm trùng được coi là tuổi khởi phát bệnh và có sự khác biệt giữa các nghiên cứu trên thế giới liên quan đến khu vực địa lý, khả năng cung cấp dịch vụ của hệ thống y tế của từng nước cũng như thời gian thực hiện nghiên cứu.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, tuổi khởi phát đợt nhiễm khuẩn đầu tiên trung bình là 9,3 tháng, sớm hơn so với các nghiên cứu khác của tác giả Natalia Basile tại Argentina, của Chun tại Hàn Quốc và của Plebani tại Ý với tuổi khởi phát trung bình lần lượt là 1 tuổi, 1,5 tuổi và 2 tuổi [6] [126] [127]. Nghiên cứu của chúng tôi không có bệnh nhân nào khởi phát trước 3 tháng và 74,19% trẻ biểu hiện trước 1 tuổi. Kết quả này phù hợp với đặc điểm sinh lý miễn dịch của trẻ. Trong 3 tháng đầu đời, trẻ sẽ được bảo vệ bởi kháng thể do mẹ truyền. Tuy nhiên, trong nghiên cứu của Winkelstein và cộng sự trên 175 bệnh nhân, có 10% bệnh nhân có các triệu chứng trong 3 tháng sau sinh và 50% nhiễm khuẩn trước 1 tuổi [17].

Trong số 31 bệnh nhân được chẩn đoán bệnh XLA, không có bệnh nhân nào khởi phát sau 27 tháng tuổi. Điều này khác biệt so với nghiên cứu của Winkelstein tại Mỹ: có 3/201 bệnh nhân khởi phát sau 5 tuổi; nghiên cứu tại Hồng Kong có bệnh nhân khởi phát lúc 8,5 tuổi và tại Trung Quốc có bệnh nhân khởi phát muộn nhất là 13 tuổi [5] [17] [120].

Có thể giải thích do Việt Nam là nước đang phát triển, lại nằm trong vùng nhiệt đới nên tỷ lệ mắc nhiễm khuẩn cao, trẻ em tiếp xúc với nguồn vi sinh vật sớm và nhiều hơn so với các nước ôn đới.

Tuy nhiên, bệnh XLA là một bệnh hiếm, sinh lý bệnh học và tiến triển còn chưa được hoàn toàn hiểu rõ. Các nghiên cứu di truyền phân tử đã chứng minh có nhiều kiểu hình trái ngược và biến thiên giữa các cá thể trong cùng một gia đình hoặc khác gia đình mặc dù cùng một kiểu gen. Những kiểu hình đặc biệt có thể liên quan tới dạng của đột biến hoặc vị trí hoặc cũng có thể một vài yếu tố khác. Ngoài những trường hợp điển hình khởi phát nhiễm khuẩn sớm, có thể có những bệnh nhân biểu hiện nhiễm khuẩn muộn hoặc rất muộn. Nghiên cứu tại Tây Ban Nha của tác giả Granados năm 2005, tuổi khởi phát thường gặp nhất là 1 tuổi nhưng lại có bệnh nhân khởi phát nhiễm khuẩn rất muộn ở tuổi 41 [8]. Vì vậy, cũng cần phải cảnh giác phát hiện bệnh, tránh phủ nhận chẩn đoán ở những trẻ lớn hoặc người lớn khi chưa làm xét nghiệm loại trừ bệnh.

4.1.2.2. Các bệnh nhiễm trùng thường gặp khi khởi phát bệnh

Do thiếu hụt nặng tất cả các kháng thể, đặc biệt Immunoglobulin G nên bệnh nhân XLA rất dễ nhiễm khuẩn, đặc biệt là các vi khuẩn có vỏ như Phế cầu và *Haemophilus influenza*. Điều này phản ánh vai trò quan trọng của kháng thể trong quá trình kháng lại các vi khuẩn có vỏ.

Trong 31 bệnh nhân XLA của chúng tôi chỉ có hai bệnh nhân (bệnh nhân số 7 và số 27) mặc dù chưa bị nhiễm khuẩn nhưng do có tiền sử anh trai bị mắc bệnh nên gia đình đã chủ động tới khám để xét nghiệm chẩn đoán sàng lọc. 29/31 bệnh nhân còn lại đều được chẩn đoán do tiền sử nhiễm khuẩn nhiều lần hoặc nhiễm khuẩn nặng.

Kết quả bảng 3.4 cho thấy viêm phổi và viêm tai giữa là hai bệnh nhiễm khuẩn thường gặp nhất trong đợt khởi phát bệnh, lần lượt là 41,38%

(12/29 bệnh nhân) và 27,59% (8/29 bệnh nhân). Kết quả này tương tự như nghiên cứu của tác giả Basile 71,73% bệnh nhân có triệu chứng nhiễm khuẩn là nhiễm khuẩn đường hô hấp (đường hô hấp trên và dưới) [126].

Ngoài ra, có 10,34% khởi phát đợt nhiễm khuẩn đầu tiên bằng một đợt nhiễm khuẩn nặng: 1 bệnh nhân viêm não - màng não và 2 bệnh nhân áp xe dưới da, cơ. Nghiên cứu của Basile cũng báo cáo 4 trường hợp (7,7%) bị nhiễm khuẩn lần đầu là: viêm màng não [126]. Hai trong ba bệnh nhân nhiễm khuẩn nặng ngay trong đợt bệnh đầu tiên trước 6 tháng tuổi. Có thể đây là một dấu hiệu cảnh báo khiến cho các nhà lâm sàng cần rà soát tình trạng miễn dịch ở những trẻ khởi phát nhiễm khuẩn nặng ngay trong những tháng đầu sau sinh.

4.1.2.3. Tiền sử nhiễm khuẩn

Tiền sử nhiễm khuẩn của bệnh nhân trước khi được chẩn đoán bệnh được so sánh với kết quả của các nghiên cứu khác thông qua bảng sau:

Bảng 4.1. So sánh tiền sử nhiễm khuẩn trước chẩn đoán bệnh XLA của nghiên cứu này với các nghiên cứu khác

Loại nhiễm khuẩn	Nghiên cứu này (n=31, 2018)	Plebani et al (n=73, 2002) [6]	Winkelstein et al (n=201, 2006) [17]	Lee et al (n=62, 2010) [120]	Esenboga et al (n=32, 2018) [60]
Viêm đường hô hấp trên tái phát	27 (87,0%)		Không đề cập	53 (85,5%)	
Viêm tai giữa mạn tính	21 (67,7%)	50 (68,5%)	140 (70%)	23 (37,1%)	23 (71,8%)
Viêm xoang	n/a		119 (59%)	14 (22,6%)	
Viêm phổi	25 (80,6%)	39 (53%)	125 (62%)	45 (72,6%)	17 (53,1%)
Ỉa chảy tái phát	8 (25,8%)	8 (13%)	42 (21%)	18 (29,1%)	17 (53,1%)

Loại nhiễm khuẩn	Nghiên cứu này (n=31, 2018)	Plebani et al (n=73, 2002) [6]	Winkelstein et al (n=201, 2006) [17]	Lee et al (n=62, 2010) [120]	Esenboga et al (n=32, 2018) [60]
Nhiễm khuẩn da	11 (35,4%)	19 (27%)	36 (18%)	16 (25,8%)	1 (3,1%)
Viêm khớp	13 (41,9%)	7 (10%)	15 (7%)	18 (29,0%)	2 (6,2%)
Viêm xương	0	Không đề cập	6 (3%)	1 (1,6%)	Không đề cập
Viêm màng não/ Viêm não	5 (16,1%)	3 (4%)	25 (12%)	8 (12,9%)	3 (8,3%)
Nhiễm khuẩn huyết trên lâm sàng	8 (25,8%)	4 (6%)	21 (10%)	5 (8,1%)	Không đề cập
Biến chứng sau tiêm phòng bại liệt	0 (0%)	2 (3%)	2 (1%)	1 (3,2%)	Không đề cập

➤ **Nhiễm khuẩn đường hô hấp**

Trong nghiên cứu của chúng tôi, tiền sử viêm đường hô hấp trên (viêm mũi họng, viêm thanh quản, viêm tai giữa) chiếm gần tỷ lệ cao nhất chiếm 87,0%, trong đó có 67,7% viêm tai giữa. Kết quả này tương tự như nghiên cứu của tác giả Lee tại Hồng Kong và cao hơn so với các nghiên cứu của Plebani tại Ý và của Esenboga tại Thổ Nhĩ Kỳ [6],[60],[120] theo số liệu đã được trích dẫn trong bảng 4.1.

Một nghiên cứu khác tại Trung Quốc năm 2010 trên 26 bệnh nhân XLA, tiền sử viêm đường hô hấp là thường gặp nhất chiếm 95,2%. Trong đó có hai bệnh nhân bị bệnh phổi mạn tính vào thời điểm chẩn đoán bệnh [119]. Nghiên cứu tại Bắc Phi (bao gồm 40 bệnh nhân ở Algeria, Morocco và

Tunisia) năm 2016, triệu chứng lâm sàng thường gặp nhất cũng là nhiễm khuẩn hô hấp chiếm 92,5% [128].

Tỷ lệ bệnh nhân viêm phổi trong nghiên cứu của chúng tôi khá cao, chiếm 80,6%. Kết quả này tương tự như nghiên cứu tại Iran của tác giả Asghar Aghamohammadi: có 82,6% bệnh nhân từng viêm phổi [129] và tại Hồng Kong của tác giả Lee nhưng lại cao hơn so với nghiên cứu tại Mỹ, Ý, Thổ Nhĩ Kỳ [6],[17],[60],[120].

Nhóm bệnh suy giảm miễn dịch thể dịch nói chung và XLA nói riêng do suy giảm chủ yếu dòng tế bào lympho B mà ít ảnh hưởng tới số lượng và chức năng tế bào lympho T. Vì vậy, ít khi bệnh nhân nhiễm lao. Tuy nhiên, trong số 25 bệnh nhân có tiền sử viêm phổi trước khi được chẩn đoán bệnh, có bốn bệnh nhân đã được chẩn đoán và điều trị Lao hơn 1 năm (bệnh nhân số 03, số 06, số 16 và số 30). Cả 4 bệnh nhân được chẩn đoán Lao do viêm phổi tái diễn nhưng chỉ có 1 bệnh nhân tìm thấy vi khuẩn Lao trong đờm, 3 bệnh nhân còn lại không tìm thấy vi khuẩn Lao trong cả đờm và dịch nội soi phế quản. Sau điều trị hết phác đồ Lao, cả 4 bệnh nhân vẫn tiếp tục bị viêm phổi. Như vậy, có thể giả thiết rằng ba bệnh nhân đã bị chẩn đoán Lao không phù hợp. Điều này có thể giải thích do tỷ lệ lưu hành vi khuẩn Lao tại Việt Nam khá cao nên các bác sỹ có xu hướng chẩn đoán Lao cho những trẻ viêm phổi kéo dài. Hơn nữa, các bác sỹ còn ít biết tới bệnh Suy giảm miễn dịch bẩm sinh nói chung và suy giảm miễn dịch thể XLA nói riêng nên không chỉ định xét nghiệm miễn dịch để có thể chẩn đoán chính xác nguyên nhân gây viêm phổi tái diễn.

➤ Viêm khớp

Nghiên cứu 128 bệnh nhân XLA của mạng lưới SGMD tiên phát của Mỹ -USIDNET trên 149 bệnh nhân XLA, có tới 18% bệnh nhân viêm khớp

[130] [131]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, viêm khớp gối bao gồm các đợt nhiễm trùng (có sưng, nóng, đỏ, đau, hạn chế vận động, dịch khớp có tăng bạch cầu trung tính và mủ, nuôi cấy có thể thấy vi khuẩn) và không nhiễm trùng (khớp sưng đau, không nóng đỏ, không đáp ứng với điều trị kháng sinh). Tỷ lệ bệnh nhân có tiền sử viêm khớp trước khi được chẩn đoán trong nghiên cứu của chúng tôi khá cao, chiếm 41,9% (n=13). Kết quả này tương đương với nghiên cứu của tác giả Xian Qin tại Trùng Khánh - Trung Quốc (2013) là 45% [132] cao hơn một chút so với nghiên cứu của tác giả Lee tại Hồng Kong (2010) là 29% [120]. Tỷ lệ viêm khớp gối của chúng tôi cao hơn nhiều so với các nghiên cứu khác tại Ý của tác giả Plebani là 10% [6].

Tỷ lệ viêm khớp cao trong nghiên cứu của chúng tôi là một cảnh báo lâm sàng đối với các bác sỹ: bệnh suy giảm miễn dịch thể không có Gammaglobulin máu liên kết nhiễm sắc thể X là một trong những nguyên nhân gây viêm khớp gối ở trẻ em Việt Nam.

Tình trạng viêm khớp vô khuẩn đã được nhắc nhiều tới trong y văn cũng như các nghiên cứu về bệnh XLA. Trong nghiên cứu của chúng tôi, vào thời điểm chẩn đoán bệnh, có 3 bệnh nhân đã có tiền sử viêm khớp gối kéo dài trên 6 tháng (bệnh nhân số 09, bệnh nhân số 10, bệnh nhân số 31). Vào thời điểm chẩn đoán, bệnh nhân đã có biến chứng cứng khớp và hạn chế vận động khớp gối. Thời điểm đó, khớp gối của bệnh nhân có dịch nhưng không còn biểu hiện viêm cấp (nóng, đỏ, đau). Sau 6 tháng điều trị IVIG, khớp gối của bệnh nhân đỡ cứng, biên độ vận động cải thiện đáng kể.



A/ Nhìn thẳng – Trước điều trị: sưng, có dịch ở gối và cổ chân



C/ Nhìn thẳng – Sau điều trị 6 tháng: hết sưng, không có dịch



B/ Nhìn nghiêng – Trước điều trị - duỗi tối đa: góc duỗi = 100 độ



D/ Nhìn nghiêng – Sau điều trị 6 tháng - duỗi tối đa: góc duỗi = 150 độ

Hình 4.2. Viêm khớp gối và cổ chân phải của bệnh nhân số 31

Một số trường hợp của chúng tôi bị viêm khớp gối nhiễm khuẩn. Tuy nhiên, trong nghiên cứu, chúng tôi không xác định được chính xác các đợt nhiễm khuẩn do nhiều bệnh nhân không được chọc dịch khớp để xét nghiệm. Trong nghiên cứu của Esenboga tại Thổ Nhĩ Kỳ, tỷ lệ viêm khớp nhiễm khuẩn là 6,2% [60]. Nghiên cứu lớn của tác giả Winkelstein tại Mỹ cho thấy tỷ lệ viêm khớp nhiễm khuẩn là 7% [17]. Nghiên cứu của tác giả Lee và cộng sự tại Hồng Kong: thời điểm thường bị viêm khớp nhất (trung vị) là 7 tuổi, sáu bệnh nhân có biểu hiện viêm khớp đang hoạt động tại thời điểm chẩn đoán bệnh XLA [120].

➤ Viêm não và viêm màng não

Viêm não và viêm màng não là hai nhiễm khuẩn nặng cần phát hiện sớm và điều trị kịp thời nếu không sẽ để lại di chứng thần kinh nặng nề. Trong nghiên cứu của chúng tôi, các bệnh nhiễm khuẩn nặng như viêm não -

viêm màng não và nhiễm khuẩn huyết chiếm 16,1% và 25,8% tương tự như nghiên cứu của tác giả Chun tại Hàn Quốc và tác giả Basile tại Argentina với tỷ lệ viêm não – màng não lần lượt là 21,1% và 16% [126],[127]. Tuy nhiên tỷ lệ này cao hơn so với phần lớn các nghiên cứu khác tại Mỹ, Ý, Thổ Nhĩ Kỳ, Hồng Kong với tỷ lệ lần lượt là 12%, 4%, 8,3% và 12,9% [6],[17],[60],[120].

Trong nghiên cứu của chúng tôi, có 3 bệnh nhân bị viêm màng não (9,7%) đã từng nhiễm viêm màng não trước khi được chẩn đoán bệnh. Một trường hợp bệnh nhân số 21, biểu hiện nhiễm khuẩn viêm màng não ngay từ đợt khởi phát đầu tiên. Bệnh nhân này viêm não và màng não tái phát nhiều đợt, được chẩn đoán muộn với di chứng nặng nề, tổn thương thần kinh, chậm phát triển tâm thần và vận động. Bệnh nhân số 22 viêm màng não một lần, không xác định được căn nguyên lúc 22 tháng; bệnh nhân số 17 viêm màng não tái phát 2 lần lúc 5 tuổi, không xác định được căn nguyên; bệnh nhân số 30 viêm màng não tái phát 3 lần (khi trẻ 6 tuổi). Trong đó, một lần do Phế cầu.

Viêm não cũng là một nhiễm trùng nặng, với nguy cơ tổn thương thần kinh cấp tính và tổn thương thần kinh kéo dài, thoái triển thần kinh. Bệnh nhân suy giảm miễn dịch thể dịch nói chung và XLA nói riêng mặc dù ít bị nhiễm bệnh do các virus nhưng lại rất nhạy cảm với nhóm Enterovirus (EV): Poliovirus, echoviruses và coxsackievirus [42],[43]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, 2 bệnh nhân viêm não khi trẻ dưới 2 tuổi (bệnh nhân số 5 không xác định được căn nguyên; bệnh nhân số 21 do Enterovirus). Ngoài ra, hai bệnh nhân có biểu hiện thoái triển thần kinh từ từ sau 2 tuổi mà không được xét nghiệm dịch não tủy để chẩn đoán (bệnh nhân số 2 và bệnh nhân số 8). Trong nghiên cứu của Mỹ trên 175 bệnh nhân XLA, căn nguyên phổ biến nhất gây viêm màng não là Phế cầu, tiếp theo là H. influenza còn căn nguyên gây viêm não thường gặp nhất là Enteroviruses [17].

➤ Nhiễm khuẩn huyết

Nhiễm khuẩn huyết được xem là một trong những nhiễm khuẩn nghiêm trọng nhất cho bệnh nhân, đặc biệt là trẻ bị suy giảm miễn dịch bẩm sinh. Nghiên cứu tiền sử bệnh của bệnh nhân, chúng tôi thấy rằng có 25,8% bệnh nhân đã từng được chẩn đoán nhiễm khuẩn huyết. Tỷ lệ nhiễm khuẩn huyết của chúng tôi tương tự như nghiên cứu tại Hàn Quốc cũng có 21,1% bệnh nhân có tiền sử nhiễm khuẩn huyết [127]. Tuy nhiên tỷ lệ này cao hơn so với nhiều nước khác trên thế giới. Nghiên cứu của Winkelstein tại Mỹ và của Basile tại Argentina có tỷ lệ NKH lần lượt là 10% và 14,0% [17]. Trong nghiên cứu của Basile, có 6/7 bệnh nhân tìm thấy căn nguyên là *Pseudomonas* spp, *H. influenzae* và *Phế cầu* [126]. Nghiên cứu tại Châu Âu: tại Ý của Plebani, tỷ lệ này là 6% [6]. Tại Hồng Kong và Trung Quốc đại lục, tác giả Lee và của tác giả Chen báo cáo số liệu NKH tương tự nhau là 8,1% và 8,6% [5],[120].

Có thể tỷ lệ nhiễm khuẩn huyết của chúng tôi cao hơn nhiều so với các nước khác là do một số bệnh nhân của chúng tôi được chẩn đoán NHK dựa vào lâm sàng. Cũng có thể tỷ lệ nhiễm khuẩn huyết trong nghiên cứu của chúng tôi tại Việt Nam cao do liên quan số lượng lớn vi sinh vật gây bệnh, tỷ lệ đề kháng kháng sinh cao, cũng như việc bệnh nhân được chẩn đoán muộn.

➤ Những nhiễm khuẩn khác

Trong nghiên cứu của chúng tôi, không có trẻ nào bị nhiễm khuẩn tiết niệu trước khi được chẩn đoán bệnh, tương tự như các nghiên cứu khác tại Mỹ, Ý, Thổ Nhĩ Kỳ, Hồng Kong [6],[17],[60],[120]. Trong khi đó, nghiên cứu tại Châu Phi và Iran lại thấy tỷ lệ bệnh nhân có tiền sử nhiễm khuẩn tiết niệu đều là 5% và nghiên cứu của Plebani tại Ý là 1,3% [6],[128],[133].

Ngoài ra, một số nghiên cứu khác còn đề cập tới bệnh nhân bị viêm xương nhiễm khuẩn: nghiên cứu của tác giả Chun tại Hàn Quốc với tỷ lệ là 10,5% [127]; của tác giả Aadam tại Châu Phi với tỷ lệ là 8% [128]. Có thể giải

thích rằng nhiễm khuẩn tiết niệu và viêm xương là biểu hiện nhiễm trùng ít gặp ở bệnh nhân XLA hoặc có thể do số lượng bệnh nhân của chúng tôi còn nhỏ nên chưa gặp bệnh nhân nào.

4.1.3. Tiền sử gia đình

Gia đình có tiền sử mắc bệnh là những gia đình mà ngoài bệnh nhân còn có anh/em trai hoặc anh/em họ (con trai) – con của dì/bác gái bên mẹ hoặc cậu/bác trai ruột bên mẹ bị nhiễm khuẩn tái nhiễm được chẩn đoán bệnh XLA và hoặc tử vong vì nhiễm khuẩn nặng khi nhỏ. Chúng tôi nghiên cứu 31 trẻ từ 28 gia đình khác nhau (bệnh nhân số 26 và 27 là hai anh em; bệnh nhân số 9 và số 10 là hai anh em trai và là em họ của bệnh nhân số 30). Tiền sử gia đình có người mắc bệnh của chúng tôi là 60,7% (17 gia đình/28 gia đình).

Tỷ lệ bệnh nhân có tiền sử gia đình của chúng tôi cao hơn so với nghiên cứu của Winkelstein tại Mỹ là 41%, nghiên cứu của Esenboga ở Thổ Nhĩ Kỳ là 47%, của Zhang tại Trung Quốc là 34,71% [5],[17],[60]. Có thể giải thích điều này do đặc trưng của quần thể ở Việt nam hoặc do cỡ mẫu của chúng tôi chưa đủ lớn.

“Tuổi chẩn đoán trung vị” của bệnh nhân có tiền sử gia đình và không có tiền sử gia đình lần lượt là 4,02 tuổi và 5,19 tuổi. Tức là nhóm có tiền sử gia đình được chẩn đoán sớm hơn so với nhóm không có tiền sử 1,17 năm. Tuy nhiên, sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê. Điều này cho thấy rằng, tiền sử gia đình chưa được các bác sỹ cũng như gia đình người bệnh chú ý. Vì vậy, mặc dù có tiền sử gia đình nhưng những bệnh nhân XLA vẫn được điều trị nhiễm khuẩn nhiều đợt tại bệnh viện mà không được quan tâm phát hiện bệnh nền là suy giảm miễn dịch tiên phát.

Kết quả này cũng tương tự như nghiên cứu tại Trung Quốc năm 2010, nhóm có tiền sử gia đình được chẩn đoán lúc 6,8 tuổi trong khi nhóm không có tiền sử được chẩn đoán lúc 7,3 tuổi [119]. Tuy nhiên, kết quả này thấp hơn

so với nhiều nghiên cứu khác trên thế giới: tại Mỹ, những bệnh nhân có tiền sử gia đình được chẩn đoán sớm hơn so với những người không có tiền sử gia đình trung bình 2,59 năm, ở Thổ Nhĩ Kỳ là 2,48 năm [17],[60].

Nghiên cứu tại Thổ Nhĩ Kỳ (2018) cho thấy tuổi chẩn đoán ở bệnh nhân có tiền sử gia đình có người mắc bệnh là 2,08 tuổi (dao động 0,25-6 tuổi), ở nhóm không có tiền sử gia đình là 4,66 tuổi (dao động 0,91-14 tuổi) [60].

Nghiên cứu tại Bắc Phi năm 2016 (bao gồm bệnh nhân ở Algeria, Morocco và Tunisia), tiền sử gia đình 32%. Tuổi chẩn đoán trung bình của những bệnh nhân có tiền sử gia đình là 36,3 tháng, thấp hơn so với nhóm không có tiền sử gia đình là 47,31 tháng Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, tỷ lệ kết hôn cận huyết chiếm 32,1% [128].

4.1.4. Tình trạng nhiễm khuẩn giai đoạn chẩn đoán bệnh XLA

Tuổi chẩn đoán

Tuổi chẩn đoán có liên quan tới mức độ nặng cũng như các dấu hiệu nhận biết của bệnh. Đồng thời, tuổi chẩn đoán còn bị ảnh hưởng rất nhiều bởi kiến thức và thái độ tích cực và sự sẵn có của các xét nghiệm giúp chẩn đoán bệnh của bác sỹ và bệnh viện. Trong nghiên cứu của chúng tôi, tuổi chẩn đoán trung bình là 5,2 tuổi. Thời điểm chẩn đoán này sớm hơn so với một số nghiên cứu của tác giả Zhang tại Trung Quốc và tác giả Lee tại Hồng Kong những năm 2010 là 7 tuổi [119],[120]. Nghiên cứu tại Ấn Độ năm Ấn Độ năm 2017 cho thấy tuổi chẩn đoán tương tự là 5,1 tuổi [121].

Tuy nhiên, tuổi chẩn đoán của chúng tôi muộn hơn so với nghiên cứu của Chun và cộng sự tại Hàn Quốc năm 2008 là 4,9 tuổi; nghiên cứu của Aadam tại Bắc Phi năm 2016 là 3 tuổi và nghiên cứu của Esenboga tại Thổ Nhĩ Kỳ năm 2018 là 3,5 tuổi [60],[127],[128].

Bảng 3.9 cho thấy chỉ có 22,6% bệnh nhân được chẩn đoán bệnh XLA trước 2 tuổi, 64,5% bệnh nhân được chẩn đoán trước 6 tuổi. Trong khi đó,

nghiên cứu tại Mỹ, hơn 50% bệnh nhân được chẩn đoán trước 2 tuổi, hơn 80% được chẩn đoán trước 6 tuổi [17]. Như vậy, tỷ lệ bệnh nhân được chẩn đoán sớm trước 2 tuổi của chúng tôi còn rất thấp. Một trong những mục tiêu quan trọng trong chẩn đoán bệnh XLA là phát hiện sớm bệnh càng sớm càng tốt, khi trẻ chưa bị nhiễm khuẩn nặng, tái diễn. Vì vậy, chúng tôi sẽ tập trung phân tích các yếu tố liên quan tới khả năng phát hiện sớm bệnh nhân XLA.

Nghiên cứu của chúng tôi có 3 bệnh nhân (9,6%) được chẩn đoán muộn sau 10 tuổi, trong đó bệnh nhân được chẩn đoán muộn nhất là 14,2 tuổi. Một số nghiên cứu lớn khác tại Hồng Kong hay Argentina cũng có bệnh nhân được chẩn đoán muộn: nghiên cứu 62 bệnh nhân tại Hồng Kong năm 2010 có bệnh nhân chẩn đoán lúc 16 tuổi, nghiên cứu trên 49 bệnh nhân tại Argentina 17,5 tuổi [120],[126]. Tuy nhiên, nghiên cứu tại Mỹ trên 201 bệnh nhân, sau năm 2006, tất cả bệnh nhân đều được chẩn đoán trước 10 tuổi [17].

Theo y văn, những bệnh nhân XLA bị giảm nặng tất cả các kháng thể nên thường nhiễm khuẩn trong những năm đầu đời. Tuy nhiên, đã có một số nghiên cứu báo cáo bệnh nhân XLA được chẩn đoán rất muộn, vào giai đoạn trưởng thành. Những bệnh nhân này mang đột biến gen *BTK* nhưng các triệu chứng không đủ nghiêm trọng để gợi ý xét nghiệm và chẩn đoán; hoặc có các đợt nhiễm khuẩn nhưng không thường xuyên. Nghiên cứu của tác giả Conley đã chẩn đoán một bệnh nhân XLA ở tuổi 58 với tiền sử rất ít các biểu hiện nhiễm khuẩn, tác giả Stewart đã công bố 1 bệnh nhân được chẩn đoán lúc 23 tuổi [134],[135].

Thời gian chẩn đoán muộn

Thời gian từ lúc có triệu chứng nhiễm khuẩn đầu tiên tới khi bệnh nhân được chẩn đoán được định nghĩa là thời gian chẩn đoán muộn. Đối với bệnh XLA, chẩn đoán sớm và điều trị IVIG là chìa khoá giúp giảm tỷ lệ tử vong và di chứng cho bệnh nhân.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, thời gian chẩn đoán muộn chung là 3,7 năm (dao động 0-12,2 năm). Như vậy thời gian chẩn đoán muộn của bệnh nhân chúng tôi dài hơn so với đa số các nghiên cứu khác trên thế giới: nghiên cứu của tác giả Aadam tại Châu Phi (2015) trên 50 bệnh nhân cho thấy thời gian chẩn đoán muộn là 2,4 năm (dao động 0-11,0 năm) [128]. Sự chậm trễ chẩn đoán đáng kể này có thể do sự nhận thức về các dấu hiệu cảnh báo bệnh suy giảm miễn dịch thể dịch của các bác sĩ đa khoa và Nhi khoa ở nước ta còn chưa được rộng rãi.

So sánh nhóm bệnh nhân có tiền sử gia đình có người mắc bệnh XLA, tuổi chẩn đoán trung vị là 4,02 tuổi (dao động từ 5 tháng tới 14,2 tuổi) và nhóm không có tiền sử gia đình là 5,19 tuổi (dao động từ 1,18 tới 9,52 tuổi). Như vậy, nhóm có tiền sử gia đình có xu hướng chẩn đoán sớm hơn nhưng sự khác biệt này nhỏ, chưa đủ ý nghĩa thống kê và có thể do số lượng bệnh nhân chưa đủ lớn.

Tác giả Esenboga tại Thổ Nhĩ Kỳ (2018) báo cáo trên 32 bệnh nhân, thời gian chẩn đoán muộn trong nhóm bệnh nhân có tiền sử gia đình là 1,25 năm (dao động từ 0-4,83 năm), không có tiền sử gia đình là 2,08 năm (dao động từ 0,16-13,33 năm) [60]. Trong nghiên cứu lớn trên 201 bệnh nhân tại Mỹ của tác giả Winkelstein cho thấy, thời gian chẩn đoán muộn giữa nhóm có tiền sử và không có tiền sử gia đình khác nhau rõ rệt là 2,9 năm so với 5,37 năm [17].

Có 3 bệnh nhân được chẩn đoán muộn khi trẻ trên 10 tuổi. Trong đó 2 bệnh nhân có tiền sử gia đình có anh trai bị tử vong khi còn bé do nhiễm khuẩn huyết (bệnh nhân số 12) hoặc anh em họ bị bệnh XLA (bệnh nhân số 30), một bệnh nhân không có tiền sử gia đình (bệnh nhân số 6). Như vậy, bên cạnh việc nhiễm khuẩn tái diễn, bệnh nhân còn có tiền sử gia đình nhưng vẫn bị chẩn đoán muộn. Điều này phản ánh nhận thức chưa cao của gia đình bệnh nhân cũng như việc truyền thông về bệnh còn chưa được rộng rãi.

Bệnh nhiễm khuẩn đợt chẩn đoán bệnh

Tại các nước, bệnh nhân thường được đánh giá về khả năng miễn dịch của cơ thể khi bị nhiễm khuẩn tái phát nhiều lần hoặc nhiễm khuẩn kéo dài hoặc nhiễm khuẩn nặng. Tuy nhiên, đa số bệnh nhân trong nghiên cứu của chúng tôi đều bị bỏ qua những đợt nhiễm khuẩn tái diễn mà chỉ được chẩn đoán trong đợt nhiễm khuẩn nặng cần phải nhập viện điều trị kéo dài. Trong đó có 35,5% bệnh nhân bị nhiễm khuẩn nghiêm trọng như: nhiễm khuẩn huyết (n=8), viêm phổi có tràn dịch-tràn mủ màng phổi (n=1), áp xe dưới da, cơ (n=1), viêm não (n=1). Số bệnh nhân được chủ động làm xét nghiệm miễn dịch do tiền sử nhiễm khuẩn nhiều đợt (n=2) hoặc có anh trai mắc bệnh (n=3) chỉ chiếm 16,1%. Tỷ lệ bệnh nhân được chẩn đoán trong tình trạng bệnh nặng trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn so với nghiên cứu của tác giả Lee và cộng sự tại Hồng Kong: 24,2% bệnh nhân được chẩn đoán vì: nhiễm khuẩn huyết, viêm màng não, viêm phổi có tràn dịch, viêm màng ngoài tim [120].

Nhiễm khuẩn nặng là dấu hiệu kinh điển khiến các bác sĩ nghĩ tới bệnh suy giảm miễn dịch tiên phát. Tuy nhiên, nếu chỉ quan tâm tới tình trạng bệnh nặng mà bỏ qua biểu hiện tái diễn và kéo dài thì rất nhiều bệnh nhân sẽ được chẩn đoán muộn. Thực tế trong nghiên cứu của chúng tôi, có tới 35,5% bệnh nhân được chẩn đoán sau 6 tuổi. Trong số đó, 54,5% được chẩn đoán trong tình trạng nhiễm khuẩn nặng: nhiễm khuẩn huyết, áp xe cơ, viêm phổi tràn mủ màng phổi, viêm màng não. Và một trong số những bệnh nhân đã tử vong ngay sau khi được chẩn đoán bệnh. Như vậy bệnh nhân của chúng tôi không những bị chẩn đoán muộn về mặt thời gian mà còn chẩn đoán muộn về mặt lâm sàng, khi đã nhiễm khuẩn nặng, nguy hiểm tính mạng.

Tại thời điểm chẩn đoán, có 2 bệnh nhân (bệnh nhân số 2 và bệnh nhân số 18) có biểu hiện giãn phế quản và được chụp CT Scanner độ phân giải cao

để chẩn đoán. Những bệnh nhân này đều là những bệnh nhân có tiền sử viêm phổi tái diễn trên 5 đợt/năm trong vòng tối thiểu 2 năm.

4.1.5. Nồng độ kháng thể

Thông thường trẻ sau sinh sẽ được hưởng IgG từ mẹ sang thai qua nhau cho nên khi sinh trẻ có lượng IgG tương tự IgG của mẹ, IgG mẹ cho sẽ giảm còn 50% trong vòng 2-3 tháng sau sinh. Trẻ cũng tự tổng hợp IgG, tốc độ tổng hợp IgG của trẻ sẽ cao hơn tốc độ giảm IgG của mẹ vào khoảng 4 - 6 tháng tuổi. IgG trẻ sẽ tăng nhanh trong 3 năm đầu tiên đạt đến ngưỡng 60% so với IgG người lớn, sau đó IgG sẽ tăng chậm lại và đạt ngưỡng IgG người lớn vào lúc vị thành niên. Do đặc điểm bệnh XLA có đột biến gen *BTK*, tế bào B của trẻ bệnh XLA không có khả năng tăng sinh, biệt hóa để tạo lượng Gammaglobulin bảo vệ cho trẻ, cho nên ở giai đoạn sau sinh lượng IgG từ mẹ cho con ở các trẻ này vẫn còn làm hàng rào tự nhiên đủ để bảo vệ trẻ. Sau 4-6 tháng khi IgG của mẹ trong máu của con gần như không còn nữa, trẻ mới dễ bị mắc bệnh [117] [136].

Nồng độ kháng thể IgA, IgG, IgM trong máu ngoại vi tại thời điểm được chẩn đoán (chưa điều trị Gammaglobulin) giảm nặng, lần lượt là: 0,01 g/L (0-1,09g/L); 0,19 g/L (0-1,09 g/L); 0,17 g/L (0-0,82 g/L). Kết quả này tương tự như hầu hết các nghiên cứu khác trên thế giới. Nghiên cứu của Thổ Nhĩ Kỳ năm 2018 trên 32 bệnh nhân XLA, trung vị IgA, IgG, IgM lần lượt là 0,06 g/L (dao động 0,05-0,26 g/L); 0,52 g/L (dao động 0,09-2,5 g/L) và 0,12 g/L (dao động 0,04-0,96 g/L) [60]. Nghiên cứu của Granados tại Tây Ban Nha, nồng độ kháng thể lần lượt là 0,13 g/L (0,06-0,23 g/L); 0,10 g/L (0,01-0,80 g/L); 0,16 g/L (0,04-0,26 g/L) [8].

Thông thường, bệnh nhân bị suy giảm miễn dịch thể không có Gammaglobulin máu sẽ có nồng độ kháng thể giảm nặng dưới -2SD so với tuổi [12]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu của chúng tôi, ba bệnh nhân có nồng

độ IgG tại thời điểm chẩn đoán > 2 g/L (bệnh nhân số 1, số 18 và số 28), trong đó 2 bệnh nhân có nồng độ IgG bình thường so với trẻ cùng lứa tuổi (bệnh nhân số 1: chẩn đoán lúc 14 tháng và bệnh nhân số 18 chẩn đoán lúc 31 tháng). Cả ba bệnh nhân này đều có biểu hiện lâm sàng đặc trưng với nhiễm khuẩn sớm và tái phát, số lượng tế bào lympho B giảm, dưới 2% và đều tìm thấy đột biến trên gen *BTK*. Nghiên cứu của Thổ Nhĩ Kỳ năm 2018 trên 32 bệnh nhân XLA, có hai bệnh nhân có nồng độ IgG > 2 g/L [60]. Nghiên cứu tại Hồng Kông tại thời điểm chẩn đoán 12 trong số 67 bệnh nhân có nồng độ IgG > 2 g/L [120]. Nghiên cứu của Italia trên 73 bệnh nhân XLA cũng báo cáo 3 bệnh nhân có nồng độ IgG trước điều trị trong giới hạn bình thường so với tuổi [6].

Nghiên cứu tại Argentina trên 52 bệnh nhân, tác giả Basile đã báo cáo 5 bệnh nhân có IgG trong giới hạn bình thường so với tuổi. Tuy nhiên, trong đó có 2 bệnh nhân được chẩn đoán lúc 4; 6 tháng tuổi và tuổi chẩn đoán trung bình trong nghiên cứu này là 4,5 tuổi, sớm hơn tuổi chẩn đoán của chúng tôi [126]. Nghiên cứu của Italia năm 2002, 3/73 bệnh nhân có nồng độ IgG bình thường tại thời điểm chẩn đoán. Cả ba bệnh nhân này đều có đột biến gen *BTK* [137].

Trong nghiên cứu của chúng tôi, chỉ có 1 bệnh nhân số 19 có nồng độ IgA bình thường so với tuổi. Bệnh nhân này có IgG và IgM giảm nặng và tìm thấy đột biến trên gen *BTK*. Có 3 bệnh nhân có nồng độ IgM bình thường so với tuổi (bệnh nhân 20, 21 và 28). Trong đó hai bệnh nhân số 20 và 21 đều có IgA và IgG giảm gần bằng 0, bệnh nhân số 28 có nồng độ IgG > 2 g/L. Bệnh nhân số 21 và 28 đã tìm thấy đột biến gen *BTK*. Cả bốn bệnh nhân này đều giảm nặng số lượng tế bào lympho B ($\leq 0,08\%$).

Trong hầu hết các trường hợp “không điển hình” được báo cáo, số lượng tế bào lympho B tuần hoàn trong máu ngoại vi đều nhỏ hơn 1%, cho thấy chỉ số này có giá trị dự báo tốt hơn mức độ giảm Gammaglobulin máu [138] [139].

4.1.6. Công thức máu

Tại thời điểm chẩn đoán có 6 bệnh nhân (19,3%) giảm bạch cầu hạt trung tính (đều giảm dưới 0,5 G/L). Trong đó 4 bệnh nhân nhiễm khuẩn nặng (nhiễm khuẩn huyết (n=3), áp xe dưới da, cơ (n=1)). Điều này chứng tỏ có giảm bạch cầu hạt trung tính nặng cũng là một trong các dấu hiệu gợi ý nhiễm khuẩn nặng cần lưu ý thăm dò khả năng miễn dịch của cơ thể.

Trong tiền sử của 31 bệnh nhân XLA, chúng tôi ghi nhận 22,6% bệnh nhân có tiền sử giảm bạch cầu trung tính. Hồ sơ khai thác tại các bệnh viện khác không đầy đủ, số liệu của chúng tôi có thể nhỏ hơn thực tế do một số bệnh nhân được điều trị các đợt nhiễm khuẩn tại bệnh viện khác, chúng tôi không có hệ thống dữ liệu liên kết các bệnh viện. So sánh với nghiên cứu tại Argentina, tác giả Basile đã báo cáo trong tổng số 46 bệnh nhân, có 22% bệnh nhân đã từng bị giảm bạch cầu trung tính [126]. Nghiên cứu của tác giả Plebani tại Ý có 1% bệnh nhân có tiền sử giảm bạch cầu trung tính [6].

Số lượng bạch cầu lympho trong máu ngoại vi trong nghiên cứu của chúng tôi nằm trong giới hạn bình thường so với tuổi của trẻ là $3,78 \pm 2,25$ G/L. Khác với nhóm suy giảm miễn dịch bẩm sinh thể phối hợp trầm trọng, bệnh nhân XLA có số lượng tổng bạch cầu lympho trong máu ngoại vi bình thường. Vì vậy, không thể dựa vào công thức máu để có thể đánh giá sơ bộ bệnh nhân bị suy giảm miễn dịch thể XLA.

4.1.7. Số lượng tế bào lympho dưới nhóm

Nghiên cứu của chúng tôi tuân theo tiêu chuẩn chẩn đoán của ESID và PAGID năm 1999 với điều kiện bắt buộc là tế bào lympho B dưới 2% [12]. Số lượng tế bào lympho B trung bình là 0,15% (dao động từ 0-1%). Kết quả này tương tự với nghiên cứu tại Iran của tác giả Aghamohammadi với 100% bệnh nhân có số lượng lympho B < 1% [133]. Các nghiên cứu khác của tác giả Lee tại Hồng Kông, tác giả Granados tại Tây Ban Nha cũng có số lượng tế

bào lympho B trung bình lần lượt là 0,09% (dao động 0–2%) và 0,1% (dao động từ 0,1-2%) [8-120].

Mặc dù phần lớn các nghiên cứu đều thống nhất số lượng tế bào lympho B dưới 2% giống như trong tiêu chuẩn chẩn đoán nhưng nghiên cứu của tác giả Chen tại Trung Quốc trên 174 bệnh nhân XLA lại báo cáo hai trường hợp bệnh nhân có số lượng tế bào lympho B 2,2% và 3%. Cả hai bệnh nhân này đều tìm thấy đột biến trên gen *BTK*. Nghiên cứu đó không đề cập tới số lượng tuyệt đối của tế bào lympho B cũng như lympho T, và có thể tế bào lympho B giảm nhiều nhưng số lượng tế bào lympho T cũng giảm nên tỷ lệ phần trăm tế bào B không giảm mạnh dưới 2%. Như vậy, cũng cần phải lưu ý theo dõi và phát hiện bệnh nhân XLA, không nên hoàn toàn cứng nhắc dựa vào con số 2% như trong tiêu chuẩn lâm sàng [5].

Protein BTK biểu hiện trong tất cả các tế bào gốc tạo máu, ngoại trừ các tế bào T và tế bào plasma nên số lượng cũng như chức năng của tế bào T và tế bào Plasma không bị ảnh hưởng [25]. Các nghiên cứu của các tác giả khác trên thế giới cũng đã chứng minh điều này: tác giả Plebani thấy rằng 100% bệnh nhân có số lượng tế bào lympho T và NK bình thường [6]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, tại thời điểm chẩn đoán bệnh, số lượng các tế bào lympho T: TCD3, TCD4, TCD 8 và tế bào NK (CD56) trung bình lần lượt là 4420; 1952; 2339; 305 tế bào/ μ L trong giới hạn bình thường. Một số bệnh nhân được chẩn đoán trong tình trạng nhiễm khuẩn nặng có số lượng bạch cầu, bạch cầu trung tính và bạch cầu lympho giảm nặng nên số lượng các tế bào lympho dưới nhóm giảm nặng. Tuy nhiên, xét nghiệm lại số lượng tế bào lympho T và NK sau 6 tháng đều trở về bình thường.

4.2. Phân tích gen

Nghiên cứu đã tiến hành phân tích gen *BTK* cho 31 bệnh nhân được chẩn đoán bệnh XLA (thuộc 28 gia đình: 1 gia đình có 2 con trai và 1 gia đình có 3

con/cháu trai – con của hai chị em gái); 26 mẹ và 10 chị, em gái của 27 bệnh nhân tìm thấy đột biến trên gen *BTK*.

4.2.1. Đặc điểm đột biến trên gen *BTK*

Các đột biến trong gen *BTK* phát hiện ở phần lớn bệnh nhân XLA. Tuy nhiên, một số bệnh nhân có kiểu hình bệnh XLA nhưng không có đột biến trên gen *BTK*. Trong bốn bệnh nhân không phát hiện đột biến của chúng tôi không có tiền sử gia đình dương tính, nghiên cứu phân tử của gen cho thấy không có bất thường. Những trường hợp này có thể có đột biến trên các gen mã hóa protein khác liên quan đến các con đường truyền tín hiệu tới tế bào B và di truyền lặn tự phát [30] [140] [141].

Nghiên cứu xác định 27 bệnh nhân XLA có đột biến trên gen *BTK*, trong đó 2 bệnh nhân số 26 và số 27 có quan hệ huyết thống mang đột biến mất đoạn exon 2-5 trên gen *BTK*. Đột biến mất đoạn lớn tạo ra một gen không có khả năng mã hoá cho protein BTK bình thường, không có khả năng kích hoạt sự trưởng thành của tế bào lympho B.

Hai mươi lăm bệnh nhân có đột biến điểm, chiếm 92,6%. Trong đó có bốn dạng: đột biến sai nghĩa, đột biến vô nghĩa, đột biến dịch khung, đột biến vùng cắt nối exon/intron. Đột biến lệch khung chiếm tỷ lệ cao nhất là 36%, đột biến sai nghĩa chiếm 24%, đột biến vô nghĩa chiếm 24%, đột biến vùng cắt nối exon/intron 16%. Kết quả này tương tự với kết quả trong nghiên cứu của ở 22 tỉnh, thành phố của Trung Quốc của Chen và cộng sự thống kê trong 15 năm trên 174 bệnh nhân phát hiện 126 đột biến trên gen *BTK* trong đó 48 (38,10%) bệnh nhân có đột biến sai nghĩa, 29 (23,02%) bệnh nhân có đột biến dịch khung, 23 (18,25%) bệnh nhân có đột biến vùng cắt nối exon/intron, 21 (16,67%) bệnh nhân có đột biến vô nghĩa và 5 (3,97%) bệnh nhân có đột biến mất đoạn lớn [5].

Kết quả nghiên cứu này cũng phù hợp với dữ liệu đột biến gen người trên thế giới (Human Gene Mutation Database – HGMD) (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>), cập nhật đến 7/2018 đã có 900 đột biến (789 đã được báo cáo) của gen *BTK*. Phân bố dạng đột biến của các đột biến này như sau: Sai nghĩa/vô nghĩa (350 đột biến); splicing (125 đột biến); regulatory (2 đột biến); mất đoạn nhỏ (156 đột biến); thêm đoạn nhỏ (53 đột biến); small indel (22 đột biến); mất đoạn lớn (64 đột biến); thêm đoạn lớn/lặp đoạn lớn (15 đột biến) và phức tạp (2 đột biến).

Nghiên cứu tại Hồng Kong năm 2010 trên 67 bệnh nhân, phát hiện được 92,5% bệnh nhân có đột biến gen *BTK* [120].

4.2.2. Vị trí đột biến

Trong số các vị trí xác định đột biến trên gen *BTK*, 3 vị trí có tỷ lệ phát hiện đột biến cao nhất là exon 17 (20,8%), exon 8 (12,5%), và exon 2 (12,5%). Các đột biến được phát hiện trên 5 vùng chức năng trong đó vùng SH1 chiếm tỷ lệ cao nhất 12/27 (44,4%) đột biến. Kết quả của nghiên cứu tương đồng với các nghiên cứu đã được công bố của tác giả Roides năm 2006 và Valiaho [7],[142]. Tuy nhiên, nghiên cứu của tác giả Esenboga tại Thổ Nhĩ Kỳ cho thấy, 3 vị trí đột biến thường gặp nhất là exon 17, exon 2 và exon 15 [60].

Tại Việt Nam năm 2010, trẻ bị bệnh XLA đầu tiên được chẩn đoán sơ bộ bằng xét nghiệm định lượng kháng thể và xác định dấu ấn màng tế bào. Năm 2011, nghiên cứu của tác giả Lâm Thị Mỹ và cộng sự phát hiện đột biến gen trên 4 bệnh nhân tại Bệnh viện Nhi đồng 1 Hồ Chí Minh và nghiên cứu của tác giả Hoàng Anh Vũ năm 2013 phát hiện 13 bệnh nhân mang đột biến gen *BTK* tại thành phố Hồ Chí Minh [65],[112]. Tuy nhiên, tỷ lệ mắc mới cũng như tổng số bệnh nhân tại Việt Nam còn chưa được thống kê đầy đủ do chưa có dữ liệu quốc gia về bệnh. Hơn nữa, số lượng bệnh nhân được chẩn đoán còn hạn chế do bệnh này còn chưa được biết đến một cách rộng rãi. Nghiên cứu của chúng tôi đã phát hiện 27/31 (87,1%) bệnh nhân mang đột

biến gen *BTK*, cung cấp dữ liệu lớn nhất về đột biến gen *BTK* trên bệnh nhân Việt Nam cho tới thời điểm hiện tại.

Hiện nay, vẫn còn ít nghiên cứu về tương quan giữa kiểu gen và kiểu hình. Một số trường hợp các bệnh nhân trong cùng một gia đình mang cùng kiểu đột biến có thể có những đặc điểm lâm sàng khác nhau [38],[143]. Nghiên cứu của tác giả Wang trên số lượng lớn bệnh nhân XLA cho thấy mối tương quan giữa kiểu gen và kiểu hình, đồng thời chỉ ra một số đột biến có xu hướng dẫn đến độ tuổi chẩn đoán cao hơn, nồng độ Globulin miễn dịch giảm ít hơn và số lượng tế bào lympho B giảm nhẹ hơn so với các đột biến khác [144]. Tuy nhiên, nghiên cứu của chúng tôi chưa tìm được mối tương quan có thể do cỡ mẫu còn nhỏ nên. Trong tương lai, nếu được tiếp tục nghiên cứu số lượng lớn bệnh nhân, chúng tôi mong rằng có thể tìm thấy mối tương quan giữa kiểu gen và kiểu hình để có thể dự đoán nguy cơ bệnh nặng cho bệnh nhân.

4.2.3. Đột biến mới

Trong số 4 đột biến mới chưa được công bố, đột biến c.1578_1581del (p.Cys527Trpfs*2) là đột biến dịch khung làm thay đổi khung đọc mở và tạo mã kết thúc sớm tại vị trí 528 trên chuỗi polypeptide thuộc vùng chức năng SH1, sản phẩm protein ngắn bất thường dẫn đến chức năng của gen cũng bị ảnh hưởng. Do vậy, đột biến p.Cys527Trpfs*2 làm ảnh hưởng đến cấu trúc và biểu hiện của gen. Kiểu gen p.Cys527Trpfs*2 được xác định trên bệnh nhân nam có mã số 01 với biểu hiện lâm sàng như giảm globulin miễn dịch, giảm số lượng tế bào B lưu hành trong máu ngoại vi và viêm phổi nặng, tuổi khởi phát bệnh là 7 tháng tuổi.

Hai đột biến mới chưa được công bố nằm ở vùng cắt nối Exon và Intron bao gồm đột biến p.IVS18+2_11delinsC và đột biến c.521-1G>A (p.IVS6-1G>A) làm thay đổi các vị trí báo hiệu cho việc cắt các đoạn intron, do đó việc cắt có thể sẽ được thực hiện ở trong exon tiếp theo, có khả năng ảnh hưởng đến chức

năng của gen. Đột biến p.IVS6-1G>A nằm ở vị trí cắt nối của exon 6 và exon 7 thuộc vùng chức năng TH, làm thay đổi trình tự chuỗi polypeptide dẫn đến mất các vùng chức năng SH1, SH2, SH3 có thể ảnh hưởng nghiêm trọng đến chức năng của protein BTK trong tế bào B dẫn đến biểu hiện bệnh sớm. Kiểu gen c.521-1G>A (p.IVS6-1G>A) được xác định trên bệnh nhân số 05, lần đầu tiên nhập viện điều trị khi mới 1 tháng tuổi, cùng với biểu hiện lâm sàng như viêm tai giữa tái phát, viêm phổi, nhiễm trùng huyết, tái phát nhiều lần. Đột biến p.IVS18+2_11delinsC nằm ở vị trí cắt nối của exon 18 và exon 19 thuộc vùng chức năng SH1, có thể xảy ra bên trong intron tạo nên điểm cắt intron mới và vì vậy cũng dẫn đến sự cắt sai trình tự intron, ảnh hưởng đến sản phẩm cDNA của gen *BTK*, do đó có khả năng ảnh hưởng đến chức năng của gen. Kiểu gen p.IVS18+2_11delinsC được xác định trên 2 bệnh nhân thuộc hai gia đình khác nhau là bệnh nhân số 02 và bệnh nhân số 16. Hai bệnh nhân có tuổi khởi phát nhiễm khuẩn lần lượt là 6 tháng tuổi và 3 tháng tuổi với biểu hiện là viêm phổi nặng, đây là biểu hiện thường gặp trong bệnh nhân XLA. Các đột biến vùng cắt nối exon/intron làm thay đổi toàn bộ trình tự gen và mARN kể từ điểm đột biến. Vì vậy, có khả năng sẽ tạo ra chuỗi protein bất hoạt dẫn đến không tổng hợp được protein BTK [8],[145]. Các đột biến vùng cắt nối exon/intron cần phải khẳng định thêm bằng thực nghiệm thông qua phân tích mARN.

Đột biến c.1735G>C (p.Asp579His) thuộc vùng chức năng SH1 của protein BTK, được xác định trên bệnh nhân nam có mã số 01, nhập viện điều trị lần đầu tiên lúc 4 tháng tuổi với các biểu hiện như viêm tai giữa tái phát, nhiễm trùng huyết, nhiễm khuẩn ngoài da, giảm toàn bộ các loại Immunoglobulin và giảm số lượng tế bào B trong máu ngoại vi. Một số nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng những người có đột biến thay thế acid amin hoặc đột biến vùng cắt nối xảy ra tại các vị trí được bảo tồn, có xu hướng khởi phát bệnh muộn hơn, nồng độ IgM trong huyết thanh cao hơn và các tế bào B cao hơn trong máu ngoại vi [7],[8].

Các đột biến mới chưa được công bố trên y văn trên thế giới đều được phát hiện trên bệnh nhân có các biểu hiện lâm sàng bệnh XLA như số lượng tế bào Lympho B CD19+ $\leq 2\%$, xuất hiện các đợt nhiễm khuẩn tái diễn trong năm đầu đời, không có kháng thể kháng hồng cầu Anti-A và Anti-B trong máu. Như vậy, kết hợp giữa biểu hiện lâm sàng và các xét nghiệm cận lâm sàng, chúng tôi gần như khẳng định 4 đột biến mới chưa được công bố là đột biến gây bệnh XLA. Các nghiên cứu sâu hơn ở mức độ protein cần được thực hiện để làm rõ hơn mối tương quan giữa kiểu gen và kiểu hình của bệnh XLA.

4.2.4. Đặc điểm bệnh nhân không phát hiện đột biến trên gen *BTK*

Trong số 31 bệnh nhân nghi ngờ mắc bệnh XLA, 4 bệnh nhân (trong đó có 3 bệnh nhân trong một gia đình) không phát hiện ra đột biến trên gen *BTK* khi phân tích gen bằng phương pháp giải trình tự gen Sanger và MLPA. Cả 4 bệnh nhân này đều có biểu hiện lâm sàng nhiễm khuẩn tái diễn, giảm nặng IgG, IgM, IgA trong máu ngoại vi, số lượng tế bào B giảm nặng. Kết quả của chúng tôi cũng tương tự như nhiều nghiên cứu khác của tác giả Eduardo tại Tây Ban Nha phát hiện 9/65 bệnh nhân bệnh nhân (13,8%) không có đột biến trên gen *BTK* [8]; nghiên cứu của tác giả Chen tại Trung Quốc, 32/174 bệnh nhân (18,4%) không có đột biến trên gen *BTK* [5].

Có thể giải thích do kỹ thuật phân tích gen trong nghiên cứu của chúng tôi chỉ có vùng mở đầu, các exon và các vùng cắt nối intron/exon của gen *BTK* được giải trình tự. Các đột biến trong các vùng Poly A, hoặc các biến thể phức tạp sâu trong intron có thể bị bỏ qua. Việc xác định những đột biến này yêu cầu phân tích mARN hoặc biểu hiện protein, chúng tôi hy vọng sẽ phát triển trong tương lai. Có thể một giả thuyết khác là những bệnh nhân không tìm thấy đột biến trên gen *BTK* khi phân tích đơn gen bằng kỹ thuật Sanger sequencing vì bệnh nhân có đột biến gen mã hóa protein khác liên quan đến

các con đường truyền tín hiệu tới tế bào B và đột biến gen lặn khác nằm trên nhiễm sắc thể thường như các đột biến IGHM (μ heavy chain deficiency), IGLL1 ($\lambda 5$ deficiency), CD79A ($Ig\alpha$ deficiency), CD79B ($Ig\beta$ deficiency), BLNK, IKAROS (16), TCF3, E47 [27],[30],[31],[32]. Do tính không đồng nhất này, phân tích di truyền là điều kiện bắt buộc để điều trị tối ưu, xem xét tiên lượng và chẩn đoán di truyền, tư vấn di truyền cho gia đình và bản thân người mắc bệnh XLA.

4.2.5. Phân tích gen của mẹ và chị em gái bệnh nhân

Bệnh XLA do đột biến gen *BTK* nằm trên nhiễm sắc thể giới tính X. Vì vậy, đa số các bệnh nhân đều là nam giới. Tuy nhiên, những người nữ trong gia đình của bệnh nhân (mẹ, chị, em gái và các chị em gái của mẹ và con gái của họ) cũng cần được phân tích gen *BTK* để khẳng định có phải người mang đột biến hay không. Kết quả sẽ giúp tư vấn di truyền cho gia đình người bệnh.

Nhóm nghiên cứu của chúng tôi đã tiến hành phân tích gen *BTK* cho tất cả 26 mẹ của 27 bệnh nhân đã tìm thấy đột biến gen *BTK*. Có 24/26 mẹ mang đột biến giống với bệnh nhân và được gọi là người mang gen đột biến. Hai mẹ bệnh nhân không tìm thấy đột biến dù con họ có đột biến vô nghĩa: c.752G>A (bệnh nhân số 03) và đột biến c.843G>A (bệnh nhân số 18). Như vậy, có thể giải thích đây là đột biến mới xuất hiện trong quá trình phát triển của thai hoặc mẹ có đột biến khảm sinh dục.

Nghiên cứu của chúng tôi cũng tiến hành phân tích gen cho 10 chị, em gái của 27 bệnh nhân đã phát hiện đột biến. Trong đó, có 6 người mang đột biến giống bệnh nhân. Cả 6 người này và gia đình đã được các bác sỹ khoa Miễn dịch - Dị ứng - Khớp và khoa Di truyền và Sinh học phân tử Bệnh viện Nhi Trung Ương thông báo kết quả phân tích gen và tư vấn di truyền, hướng dẫn kế hoạch theo dõi và tư vấn trước khi sinh con. Với phương pháp chọc

hút ối và gai rau trong đầu quý 2 của thai kì sản có tại Việt Nam hiện nay, chúng tôi hi vọng rằng có thể phát hiện những thai nhi nam mang gen đột biến ngay từ trong bụng mẹ để có thể tư vấn trước sinh cho gia đình.

4.3. Điều trị

Trong số 31 bệnh nhân được chẩn đoán, có 2 bệnh nhân tử vong ngay trong đợt điều trị đầu tiên, 1 bệnh nhân dừng điều trị do bệnh nặng, 1 bệnh nhân dừng điều trị ở lần thứ 4 do hoàn cảnh gia đình không đủ khả năng chi trả kinh phí điều trị. 27 bệnh nhân còn lại được theo dõi điều trị định kì trong vòng 6 tháng. Tổng số đợt theo dõi trên tổng số bệnh nhân là 161 lượt điều trị.

4.3.1. Liệu điều trị

Bệnh nhân XLA có sự giảm hoặc mất khả năng sản xuất kháng thể. Do đó, biểu hiện lâm sàng của bệnh chủ yếu là nhiễm khuẩn và bệnh nhân thường bị nhiễm trùng tái đi tái lại. Mục tiêu của liệu pháp thay thế Immunoglobulin là giảm thiểu tỷ lệ và mức độ nhiễm trùng cũng như tỷ lệ nhập viện và cải thiện chất lượng cuộc sống nói chung. Hầu hết tất cả các nghiên cứu đều chỉ ra rằng liệu pháp truyền Globulin miễn dịch làm giảm tỷ lệ nhiễm trùng và giảm tỷ lệ nhập viện ở bệnh nhân mắc XLA [24],[111],[146].

Hiệu quả điều trị IVIG đã được nghiên cứu trong nhiều thử nghiệm quan sát so sánh tác dụng giữa liều cao và liều thấp. Hầu hết các khuyến cáo và ngay cả khuyến cáo mới nhất của hội Dị ứng – Hen và Miễn dịch Mỹ (AAAAI) năm 2017 đều đưa ra liều trung bình của IVIG là 0,4-0,6 g/kg cân nặng mỗi 3-4 tuần để đạt được nồng độ IgG đáy tối thiểu là 5 g/L [24],[146]. Trong bản cập nhật hướng dẫn điều trị 2017 này, nhóm tác giả cũng đã đưa ra khuyến cáo giữ nồng độ IgG đáy có thể nên duy trì > 8g/L để giúp phòng ngừa nhiễm khuẩn nặng do vi khuẩn hoặc viêm não màng não do virus.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, liều điều trị trung bình là $0,58 \pm 0,10$ g/kg/lần, khoảng cách của đa số các lần truyền là 4 tuần, khoảng dao động là $4,13 \pm 0,59$ tuần do có một số bệnh nhân tới muộn một vài lần so với hẹn 2-7 ngày vì lí do khách quan của gia đình.

Trước đây vào những năm 1980, nồng độ IgG đáy được khuyến cáo là 5 g/L vì các nghiên cứu chỉ ra rằng nồng độ IgG như vậy có thể đủ để chống lại các đợt nhiễm trùng nghiêm trọng [86]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, nồng độ IgG huyết thanh đáy – trước mỗi lần truyền trung bình (hay còn gọi là serum IgG trough levels) là 5,65 g/L. Như vậy, liều điều trị IVIG trong nghiên cứu phù hợp với hầu hết các hướng dẫn thực hành với khuyến cáo liều điều trị [24],[94],[146]. Tuy nhiên, tần suất nhiễm khuẩn của chúng tôi còn khá cao. Có thể giải thích do mức độ nhiễm khuẩn của bệnh nhân trong mỗi quần thể nghiên cứu, hay các khu vực khác nhau không những chịu ảnh hưởng bởi liều điều trị mà còn ảnh hưởng của hệ vi sinh vật gây bệnh, mức độ kháng kháng sinh, vệ sinh môi trường tại khu vực đó. Và một phần ảnh hưởng không nhỏ tới kết quả điều trị là mức độ nhiễm khuẩn tái diễn, nhiễm khuẩn nặng và chẩn đoán muộn của bệnh nhân.

So sánh với điều kiện điều trị IVIG trong nghiên cứu của tác giả Deepti Suri tại Ấn Độ, nồng độ IgG đáy cũng như liều trung bình hàng tháng của chúng tôi cao hơn và dao động giữa các bệnh nhân ít hơn. Nghiên cứu đó chỉ ra rằng nồng độ IgG đáy tương quan với mức độ nhiễm khuẩn. Những bệnh nhân không có triệu chứng nhiễm khuẩn có trung vị IgG đáy là 4,40 g/L. Trong khi đó, nồng độ tương ứng ở nhóm bệnh nhân có nhiễm khuẩn nhẹ (viêm tai giữa, viêm da, ỉa chảy) và nhóm có nhiễm khuẩn đáng kể (viêm phổi) là 3,35 g/L và 2,44 g/L. Tuy nhiên, trong hoàn cảnh bảo hiểm chưa chi trả điều trị IVIG cho các bệnh nhân ở Ấn Độ, bệnh nhân cần phải điều trị kháng sinh Co-trimoxazole hàng ngày để giảm tần suất nhiễm khuẩn [121].

Như vậy, bệnh nhân đối mặt với nguy cơ lâu dài là tăng tỷ lệ kháng kháng sinh và cũng chưa đủ số liệu để chứng minh khả năng đảm bảo không có nhiễm khuẩn nặng, tổn thương phổi mạn theo phương pháp này.

4.3.2. Đặc điểm lâm sàng khi được điều trị IVIG

Trong nghiên cứu của chúng tôi, 27 bệnh nhân được điều trị và theo dõi định kỳ trong vòng 6 tháng, có 11 bệnh nhân phải nhập viện điều trị các bệnh nhiễm khuẩn ít nhất 1 lần. Tổng số lượt điều trị nội trú là 19 lượt (tương đương 0,69 lượt/bệnh nhân/6 tháng).

Một cách lý tưởng, khi bệnh nhân được truyền Gammaglobulin, bệnh nhân sẽ nhận được kháng thể một cách thụ động từ người cho và chống lại được hầu hết các loại nhiễm khuẩn. Tuy nhiên, liệu pháp thay thế Gammaglobulin có những hạn chế. Các chế phẩm có sẵn trên thị trường hầu hết chỉ thay thế IgG, nhưng nồng độ IgM và IgA rất thấp hoặc chỉ ở dạng vết. Bên cạnh đó, các chế phẩm thương mại có sẵn của Globulin miễn dịch được phân lập từ máu của người hiến tặng, thông thường là người bình thường, khoẻ mạnh. Do đó, những kháng thể có trong các chế phẩm Globulin này chứa phần lớn là kháng thể chống lại các vi sinh vật gây bệnh thông thường mà có rất ít kháng thể chống lại một số vi sinh vật hiếm gặp mà bệnh nhân mắc XLA có thể gặp phải.

Hầu hết bệnh nhân mắc XLA bị nhiễm trùng tái đi tái lại, ngay cả ở những bệnh nhân được chẩn đoán bệnh sớm hơn do có tiền sử gia đình. Không giống như nhiễm khuẩn tái diễn do bất thường cấu trúc các cơ quan (như dị dạng đường hô hấp, dị dạng tiết niệu...), bệnh nhân thiếu hụt miễn dịch thường bị nhiễm trùng ở nhiều cơ quan, vị trí khác nhau: viêm tai giữa, viêm xoang, viêm phổi, viêm kết mạc, tiêu chảy và nhiễm trùng da... Trong các biểu hiện nhiễm khuẩn đó, viêm phổi và viêm tai giữa là hai bệnh phổ biến nhất, gây ảnh hưởng nhiều tới sức khoẻ của bệnh nhân. Chúng tôi đưa

ra số liệu so sánh về tần suất của hai loại nhiễm khuẩn này trước và sau khi được điều trị.

Mặc dù trong nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ viêm phổi trong thời gian điều trị giảm đi đáng kể so với trước điều trị, nhưng vẫn có 8 lượt bệnh nhân phải nhập viện điều trị (0,24 lượt/bệnh nhân/6 tháng trong thời gian điều trị so với 1,2 lượt/bệnh nhân/6 tháng). Tuy nhiên, tỷ lệ bệnh nhân viêm phổi trong thời gian điều trị của chúng tôi còn cao hơn nhiều so với các nghiên cứu khác trên thế giới. Khi so sánh với nghiên cứu tại Iran Theo nghiên cứu của tác giả Aghamohammadi tại Iran (2004) trên tổng số 23 bệnh nhân, theo dõi trung bình $6,8 \pm 4,1$ năm với liều điều trị IVIG trung bình 0,3-0,4 g/kg/mỗi 3-4 tuần, chỉ có 18 lượt viêm phổi trên 157,25 lượt bệnh nhân năm [129].

Nghiên cứu của tác giả Plebani và cộng sự trên 73 bệnh nhân trong thời gian tích lũy là 585 năm được điều trị IVIG, chỉ có 15 bệnh nhân (20,5%) viêm phổi nặng cần nhập viện. Kết quả nghiên cứu của họ cũng cho thấy nhiễm trùng đường hô hấp vẫn là vấn đề lâm sàng nổi bật nhất ở bệnh nhân XLA, mặc dù đã được điều trị thay thế globulin miễn dịch [6].

Tác giả Quartier cũng nghiên cứu trên 31 bệnh nhân tại Pháp được điều trị IVIG liều $> 0,25$ g/kg cân nặng mỗi 3 tuần trong thời gian tối thiểu 4 năm với trung vị nồng độ IgG trước mỗi đợt điều trị là 7 g/L. Tần suất nhiễm khuẩn cần nhập viện điều trị là 0,06 lượt/bệnh nhân/năm [111].

Điều này có thể giải thích do bệnh nhân của chúng tôi được chẩn đoán muộn với nhiều biến chứng, tần suất viêm phổi trước điều trị cao hơn các nghiên cứu khác nên tỷ lệ nhiễm khuẩn trên nền bệnh nhân tổn thương phổi mạn tính cao. Hơn nữa, Việt Nam nằm trong vùng khí hậu nhiệt đới, tỷ lệ bệnh nhiễm trùng cao hơn so với các nước vùng cận nhiệt đới và ôn đới. Trong thời gian nghiên cứu 6 tháng, chúng tôi không gặp bất kì một bệnh nhân nào bị phản ứng dị ứng với chế phẩm IVIG đã được sử dụng.

4.3.3. Nồng độ Globulin miễn dịch trước và sau mỗi đợt điều trị

Hiện nay có hai hình thức điều trị bằng globulin miễn dịch thay thế: globulin miễn dịch tiêm tĩnh mạch G (IVIG) và globulin miễn dịch dưới da G (SCIG). Các chế phẩm này chủ yếu chứa immunoglobulin G (IgG), được sản xuất từ máu của người hiến tặng. Tất cả các quy trình sản xuất bắt đầu bằng phân đoạn ethanol lạnh, được thực hiện theo quy trình Cohn-Oncley hoặc Kistler-Nitschmann. Các nhà sản xuất khác nhau sau đó sử dụng các kết hợp khác nhau của các bước kết tủa, lọc và / hoặc sắc ký để thu được các chế phẩm cuối cùng bao gồm hơn 95% IgG. Hầu hết các sản phẩm xấp xỉ sự phân phối của các phân lớp IgG được tìm thấy trong huyết tương bình thường, với một lượng rất nhỏ immunoglobulin A (IgA) và immunoglobulin M (IgM). Do đó, liệu pháp này giúp tăng lượng IgG trong máu của bệnh nhân sau điều trị, trong khi đó làm thay đổi không đáng kể nồng độ IgA và IgM.

Trong nghiên cứu của chúng tôi với 161 lượt điều trị của 27 bệnh nhân, nồng độ IgG trung bình trước truyền là 5,65 g/L, nồng độ IgG trung bình sau truyền là 12,37 g/L. Nồng độ IgA và IgM chênh lệch trước và sau mỗi đợt truyền không có sự khác biệt. Kết quả của chúng tôi phù hợp với y văn cũng như các nghiên cứu khác đã được công bố.

4.3.4. Mối tương quan giữa triệu chứng lâm sàng và nồng độ Globulin miễn dịch

Nồng độ IgG đáy là nồng độ IgG đo được trong máu bệnh nhân trước mỗi chu kỳ truyền IVIG. Càng lâu sau truyền IVIG, nồng độ IgG trong huyết thanh bệnh nhân càng thấp do có sự suy giảm do tiêu thụ cũng như sự phân hủy tự nhiên, đồng thời bệnh nhân cũng không có hoặc giảm khả năng sản xuất kháng thể. Nồng độ IgG đáy là nồng độ IgG đo được trong máu bệnh nhân trước mỗi chu kỳ truyền IVIG. Một số nghiên cứu chỉ ra rằng, bệnh nhân thường hay bị nhiễm khuẩn khi nồng độ IgG giảm đáng kể sau khoảng 3 tuần sau truyền IVIG

(ngay trước chu kỳ điều trị tiếp theo), nguy cơ mắc nhiễm trùng sẽ cao hơn. Nồng độ IgG đáy này càng thấp, nguy cơ nhiễm trùng càng cao [88],[89]. Nghiên cứu của chúng tôi không thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về mối liên quan giữa nguy cơ nhiễm trùng nói chung cũng như nguy cơ nhiễm khuẩn đường hô hấp nói riêng với nồng độ IgG đáy. Tuy nhiên việc thiếu ý nghĩa thống kê có thể do cỡ mẫu của chúng tôi còn hạn chế, có thể được giải quyết bằng các nghiên cứu lớn hơn trong tương lai.

4.3.5. Tiên lượng

Hai bệnh nhân tử vong là bệnh nhân số 16 và bệnh nhân số 29 do nhiễm khuẩn huyết và cấy tìm được vi khuẩn *Pseudomonas Aeruginosa* trong dịch nội khí quản. Tại thời điểm chẩn đoán, IgG, IgA, IgM của bệnh nhân giảm nặng. Hai bệnh nhân này có số lượng tế bào lympho B là 0% và đều tìm được đột biến trên gen *BTK*. Bệnh nhân số 16 là đột biến ở vị trí cắt nối ở Intron 18; bệnh nhân số 29 đột biến dịch khung ở vị trí Exon 6. Mặc dù cả hai bệnh nhân đều được điều trị IVIG liều cao 1,0 g/kg cân nặng ngay khi được chẩn đoán bệnh nhưng tình trạng nhiễm khuẩn nặng, giai đoạn muộn nên tử vong ngay sau đó.

Nghiên cứu của Abolhassania tại Iran theo dõi 41 bệnh nhân nhi bị XLA trong vòng 20 năm, có 26,8% bệnh nhân tử vong [18]. Nghiên cứu của tác giả Howard trên 87 bệnh nhân XLA trên 18 tuổi trong vòng 20 năm, có 11,49% bệnh nhân XLA tử vong sau 21 tuổi do nhiều nguyên nhân như: viêm não – màng não do Enterovirus, bệnh phổi mạn tính, viêm gan, U lympho [9]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, do thời gian nghiên cứu còn hạn chế nên cũng chưa phát hiện bệnh nhân nào có các biểu hiện tự miễn và ung thư.

KẾT LUẬN

Trong 3 năm nghiên cứu, có 31 bệnh nhân XLA được chẩn đoán và theo dõi điều trị.

1. Đặc điểm lâm sàng và xét nghiệm miễn dịch

100% bệnh nhân XLA là bệnh nhân nam. Tuổi khởi phát nhiễm khuẩn lần đầu là $9,30 \pm 6,31$ tháng. Tiền sử nhiễm khuẩn gặp ở 93,5% bệnh nhân, trong đó tỷ lệ nhiễm khuẩn huyết là 25,8%. Tiền sử gia đình có người mắc bệnh chiếm 64,5%.

Tuổi chẩn đoán trung bình là 5,2 tuổi. Chỉ có 22,6% bệnh nhân được chẩn đoán trước 2 tuổi.

Nồng độ kháng thể IgG, IgA, IgM trong huyết thanh giảm nặng, lần lượt là 0,19 g/L; 0,01 g/L; 0,17 g/L. Có 9,6% bệnh nhân nồng độ IgG tại thời điểm chẩn đoán cao hơn 2 g/L.

Tất cả bệnh nhân đều có số lượng tế bào lympho B trong máu ngoại vi giảm nặng. Tại thời điểm chẩn đoán, số lượng tế bào lympho của bệnh nhân XLA chỉ có $8,21 \pm 14,49$ tế bào/ μ L; tương đương $0,15 \pm 0,30\%$.

2. Đặc điểm đột biến gen *BTK*

Tỷ lệ phát hiện đột biến là 87,1% (27/31 bệnh nhân). Có 2 đột biến mất đoạn và 25 đột biến điểm. Đột biến lệch khung chiếm tỷ lệ cao nhất là 36%, tiếp theo là đột biến sai nghĩa và đột biến vô nghĩa đều chiếm tỷ lệ 24%. Vị trí đột biến thường gặp là exon 17 (20,8%), exon 2 (12,5%) và exon 5 (12,5%).

Có 4 đột biến mới chưa được công bố được tìm thấy trên 5 bệnh nhân là: c.1735G>C; c.1908+2_11delinsC; c.521-1G>A; c.1578_1581del.

Bốn bệnh nhân chưa tìm thấy đột biến đều có triệu chứng lâm sàng nhiễm khuẩn tái diễn, nồng độ IgA, IgM, IgG giảm nặng và số lượng tế bào lympho B < 1%.

Phát hiện đột biến gen *BTK* trên 24 mẹ (trong số 26 mẹ) và 6 chị, em gái của bệnh nhân. Bốn chị, em gái không tìm thấy đột biến.

3. Kết quả điều trị truyền Gammaglobulin đường tĩnh mạch cho bệnh nhân XLA

Tỉ lệ tử vong là 6,4% (2/31 bệnh nhân). Nguyên nhân tử vong do nhiễm trùng huyết nặng ngay trong đợt được chẩn đoán.

27/31 bệnh nhân được theo dõi và điều trị ít nhất 6 tháng với liều điều trị IVIG là $0,58 \pm 0,10$ g/kg cân nặng; khoảng cách trung bình giữa các đợt truyền là $4,13 \pm 0,59$ tuần; Nồng độ IgG đáy trước truyền là $5,65 \pm 1,20$ g/L; sau truyền là $12,37 \pm 1,63$ g/L.

Triệu chứng lâm sàng cải thiện có ý nghĩa thống kê sau khi điều trị thay thế Gammaglobulin: tần suất viêm phổi giảm từ $1,2 \pm 1,95$ đợt/6 tháng trước điều trị xuống còn $0,24 \pm 0,80$ đợt/6 tháng; viêm tai giữa giảm từ $0,23 \pm 0,30$ đợt/6 tháng xuống còn $0,11 \pm 0,32$ đợt/6 tháng; không còn đợt nhiễm khuẩn nặng khi được điều trị IVIG.

KIẾN NGHỊ VÀ HƯỚNG NGHIÊN CỨU TIẾP THEO

1. Kiến nghị

Cần tuyên truyền các dấu hiệu cảnh báo của suy giảm miễn dịch bẩm sinh XLA về tình trạng nhiễm trùng tái diễn ở trẻ em, đặc biệt dấu hiệu đường hô hấp, viêm phổi, viêm tai giữa kết hợp với triệu chứng Amidan nhỏ và tổ chức hạch ngoại vi để phát hiện kịp thời bệnh nhân nghi ngờ mắc bệnh.

Đánh giá nồng độ kháng thể huyết thanh có thể giúp phát hiện những bệnh nhân nghi ngờ mắc bệnh XLA.

Phân tích gen *BTK* là phương pháp giúp chẩn đoán xác định bệnh XLA, giúp định hướng chiến lược điều trị tối ưu và tư vấn di truyền cho bệnh nhân và gia đình người bệnh.

Phương pháp điều trị truyền IVIG với liều 0,4-0,6 g/kg cân nặng mỗi 4 tuần giúp giảm tần xuất cũng như mức độ nhiễm trùng của hầu hết bệnh nhân XLA. Tuy nhiên một số bệnh nhân vẫn còn có những đợt nhiễm khuẩn, cần cá thể hóa liều điều trị IVIG để giảm được tỷ lệ nhiễm khuẩn cũng như biến chứng.

2. Hướng nghiên cứu tiếp theo

Tiếp tục phát hiện sớm, theo dõi lâu dài: phát hiện các biến chứng như giãn phế quản và bệnh lý ác tính; và đánh giá sự phát triển thể chất và tâm thần của bệnh nhân XLA.

Phân tích đột biến gen *BTK* cho những người lành mang gen, áp dụng chẩn đoán trước sinh cho những người mang gen.

Nghiên cứu so sánh đáp ứng lâm sàng với liều điều trị IVIG liều cao hơn hiện tại.

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

1. Segundo Gesmar R S, Nguyen Anh Thi Van, Thuc Huyen Thanh, Nguyen Le Ngoc Quynh, Kobayashi R H, Le H T, Le H TM, Torgerson T R, Ochs H D (2018), Dried Blood Spots, an Affordable Tool to Collect, Ship, and Sequence gDNA from Patients with an X-Linked Agammaglobulinemia Phenotype Residing in a Developing Country, *Frontiers in Immunology*, Số 9 (289), 1-5.
2. Ngô Mạnh Tiến, Nguyễn Thị Vân Anh, Nguyễn Thị Phương Mai và cộng sự (2018), Phát hiện đột biến gen *BTK* trên các bệnh nhân chẩn đoán bệnh không gammaglobulin máu liên kết nhiễm sắc thể giới tính X, *Tạp chí khoa học Công nghệ Việt Nam*, Số 9 (60), 1-4.
3. Nguyễn Thị Vân Anh, Lê Thị Minh Hương, Lê Thanh Hải và cộng sự (2019). Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng bệnh không có Gammaglobulin máu liên kết nhiễm sắc thể giới tính X, *Tạp chí nghiên cứu y học*, Số 117 (1), 93-100.
4. Nguyễn Thị Vân Anh, Lê Thị Minh Hương, Vũ Văn Quang cộng sự (2019). Kết quả điều trị truyền Gammaglobulin đường tĩnh mạch cho bệnh nhân không có Gammaglobulin máu liên kết nhiễm sắc thể X, *Tạp chí Y học Việt Nam*, Số 2(481), 57-60.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Boyle J.M, Buckley R.H (2007). Population prevalence of diagnosed primary immunodeficiency diseases in the United States. *J Clin Immunol*, 27 (5), 497–502.
2. Modell V, Quinn J, Orange J et al (2016). Primary immunodeficiencies worldwide: an updated overview from the Jeffrey Modell Centers Global Network. *Immunol Res*, 64 (3), 736-753.
3. Vetrie D, Vorechovsky I, Sideras P et al (1993). The gene involved in X-linked agammaglobulinaemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases. *Nature*, 361, 226–233.
4. Satoshi T, Douglas S, David J.R (1993). Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. *Cell*, 72 (2), 279–290.
5. Chen X.F, Wang W.E, Zhang Y.D et al (2016). Clinical characteristics and genetic profiles of 174 patients with X-linked agammaglobulinemia. *Medicine*, 95 (32), 44-54.
6. Plebani A, Soresina A, Rondelli R et al (2002). Clinical, Immunological, and Molecular Analysis in a Large Cohort of Patients with X-Linked Agammaglobulinemia: An Italian Multicenter Study. *Clinical Immunology*, 104 (3), 221-230.
7. Broides A, Yang W, Conley M.E (2006). Genotype phenotype correlations in X-linked agammaglobulinemia. *Clin Immunol*, 118, 195– 200.
8. Eduardo L.G, Rebeca P.D, Antonio F.C (2005). A genotype phenotype correlation study in a group of 54 patients with X-linked agammaglobulinemia. *J Allergy Clin Immunol* 116, 690–697.

9. Vanessa H, Jeffrey M.G, Savita P (2006). The health status and quality of life of adults with X-linked agammaglobulinemia. *Clinical Immunology*, 118, 201–208.
10. Aziz B, Leřla J, Capucine P (2018). The 2017 IUIS Phenotypic Classification for Primary Immunodeficiencies. *J Clin Immunol*, 38, 129–143.
11. Fried A. J, Bonilla F. A (2009). Pathogenesis, diagnosis, and management of primary antibody deficiencies and infections. *Clin Microbiol Rev*, 22 (3), 396–414.
12. Mary E.C, Luigi D.N, Amos E (1999). Diagnostic Criteria for Primary Immunodeficiencies. *Clinical Immunology*, 93, 190–197.
13. Gathmann G.S, Klima M, Ritterbusch H et al (2013). The German national registry for primary immunodeficiencies *Clin Exp Immunol*, 173 (2), 372–380.
14. Tóth V, Mihas P, Kondratenko I et al (2009). Genetic and demographic features of X-linked agammaglobulinemia in Eastern and Central Europe: a cohort study. *Mol Immunol*, 46 (10), 2140–2146.
15. Hermaszewski R.A, Webster A.D (1993). Primary hypogammaglobulinaemia: a survey of clinical manifestations and complications. *Q J Med*, 86, 31–42.
16. Ochs H.D, Smith C.I.E (1996). X-linked agammaglobulinemia. A clinical and molecular analysis. *Medicine (Baltimore)*, 75, 287–299.
17. Winkelstein J.A, Marino M.C, Lederman H.M (2006). X-linked agammaglobulinemia: report on a United States registry of 201 patients. *Med Baltim* 85, 193–202.

18. Abolhassania H, Hirbod-Mobarakeha A, Shahinpoura S et al (2015). Mortality and morbidity in patients with X-linked agammaglobulinaemia. *Allergol Immunopathol (Madr)*, 43 (1), 62-66.
19. Sideras P, Smith C.I.E (1995). Molecular and cellular aspects of X-linked agammaglobulinemia. *Adv Immunol* 59, 135–223.
20. Reference G. H. (2019). BTK gene. *U.S National Library of Medicine*, <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/BTK>,
21. Sideras P, Muller S, Shiels H et al (1994). Genomic organisation of mouse and human Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase 153, 5607-5618.
22. Ghoniaim A, Ziegler J.B, Tridgell D (1996). Bilateral chronic conjunctivitis and corneal scarring in a boy with X-linked hypogammaglobulinaemia. *J. Paediatr. Child. Health* 32, 463–465.
23. Muller S., Sideras P., Smith C.I.E. (1996). Cell-specific expression of human Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase (Btk) gene is regulated by Sp1- and Spi-1/PU.1-family members. *Oncogene*, 13, 955-1964.
24. Roifman C.M, Berger M, Notarangelo L.D (2008). Management of primary antibody deficiency with replacement therapy: summary of guidelines. *Immunol Allergy Clin North Am*, 28 (4), 875-876.
25. Smith C.I.E, Baskin B, Humire G.P et al (1994). Expression of Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase gene, BTK, is selectively down-regulated in T lymphocytes and plasma cells. *J Immunol* 152, 557–565.
26. Allen R.C, Nachtman R.G, Rosenblatt H.M et al (1994). Application of carrier testing to genetic counseling for X-linked agammaglobulinemia. *Am J Hum Genet*, 54 (1), 25–35.

27. Yel L, Minegishi Y, Coustan S.E et al (1996). Mutations in the mu heavy-chain gene in patients with agammaglobulinemia. *N Engl J Med*, 335, 1486-1493.
28. Manning G, Whyte D.B, Martinez R et al (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 298, 912–1934.
29. Driessen G, Vander B (2011). Educational paper: primary antibody deficiencies. *Eur J Pediatr*, 170 (6), 693–702.
30. Minegishi Y, Coustan-Smith E, Rapalus L et al (1999). Mutations in Igalpha (CD79a) result in a complete block in B-cell development. *J Clin Invest*, 104, 1115-1121.
31. Dobbs A.K, Yang T, Farmer D et al (2007). Cutting edge: a hypomorphic mutation in Ig- beta (CD79b) in a patient with immunodeficiency and a leaky defect in B cell development. *J Immunology* 179, 2055-2059.
32. Conley M.E, Dobbs A.K, Quintana A.M et al (2012). Agammaglobulinemia and absent B lineage cells in a patient lacking the p85alpha subunit of PI3K. *J Exp Med*, 209, 463-470.
33. Pan Q, Matamoros N, Bjorkander J et al (2002). Lack of IgA in C(mu)-deficient patients. *Nat Immunol*, 3, 595–596.
34. Karen M, Helen B, Ross P (2004). Phenotypic variability: Clinical presentation between the 6th year and the 60th year in a family with X-linked agammaglobulinemia. *J Allergy Clin Immunol*, 113 (783-785),
35. Conley ME, Howard V. (2002). Clinical findings leading to the diagnosis of X-linked agammaglobulinemia. *J Pediatr*, 141, 566–571.
36. Moin M, Aghamohammadi A, Farhoudi A et al (2004). X-linked agammaglobulinemia: a survey of 33 Iranian patients. *Immunol Invest*, 33, 81–93.

37. Bykowski M.J, Haire R.N, Ohta Y et al (1996). Discordant phenotype in siblings with X-linked agammaglobulinemia. *Am J Hum Genetics*, 58, 477–483.
38. Kornfeld S.J, Haire R.N, Strong S.J et al (1996). A novel mutation (Cys145- stop) in Bruton's tyrosine kinase is associated with newly diagnosed X-linked agammaglobulinemia in a 51-year-old male. *Mol Med*, 2, 619–623.
39. Saffran D.C, Parolini O, Fitch Hilgenberg M.E et al (1994). A point mutation in the SH2 domain of Bruton's tyrosine kinase in atypical X-linked agammaglobulinemia. *N Eng J Med*, 330, 1488–1491.
40. Edvard Smith C.I, Mary E.C (2013). X-Linked agammaglobulinemia and autosomal recessive agammaglobulinemia. *Primary Immunodeficiency Diseases: A Molecular and Genetic Approach*, Oxford University Press, Chapter 25, 299-316.
41. Conley M.E, Dobbs A.K, Farmer D.M et al (2009). Primary B cell immunodeficiencies: comparisons and contrasts. *Annu Rev Immunol*, 27, 199-227.
42. Lopez-Granados E, Porpiglia A.S, Hogan M.B (2002). Clinical and molecular analysis of patients with defects in mu heavy chain gene. *J Clin Invest* 110, 1029–1035.
43. Quartier P, Foray S, Casanova J.L et al (2000). Enteroviral meningoencephalitis in X-linked agammaglobulinemia: intensive immunoglobulin therapy and sequential viral detection in cerebrospinal fluid by polymerase chain reaction. *Pediatr Infect Dis J* 19, 1106–1108.
44. Ziegner U.H, Kobayashi R.H, Cunningham-Rundles C et al (2002). Progressive neurodegeneration in patients with primary immunodeficiency disease on IVIG treatment. *Clin Immunol*, 102 (1), 19-24.

45. MacLennan C, Dunn G, Huissoon A.P et al (2004). Failure to clear persistent vaccinederived neurovirulent poliovirus infection in an immunodeficient man. *Lancet*, 363, 1509–1513.
46. Thibaut H.J, Leyssen P, Puerstinger G et al (2011). Towards the design of combination therapy for the treatment of enterovirus infections. *Antiviral Res*, 90, 213–217.
47. Kainulainen L, Varpula M, Liippo K (1999). Pulmonary abnormalities in patients with primary hypogammaglobulinemia. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 104, 1031–1036.
48. Quartier P, Debre M, De Blic J (1999). Early and prolonged intravenous immunoglobulin replacement therapy in childhood agammaglobulinemia: a retrospective survey of 31 patients. *J. Pediatr*, 134, 589–596.
49. Rafi A, Matz J (2002). An unusual case of *Campylobacter jejuni* pericarditis in a patient with X-linked agammaglobulinemia. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 89 (4), 362–367.
50. Hansel T.T, O'Neill D.P, Yee M.L et al (1990). Infective conjunctivitis and corneal scarring in three brothers with sex linked hypogammaglobulinaemia (Bruton's disease). *British Journal of Ophthalmology*, 74 (2), 118-120.
51. Franz A, Webster D.B, Furr P.M (1997). Mycoplasmal arthritis in patients with primary immunoglobulin deficiency: clinical features and outcome in 18 patients. *British Journal of Rheumatology*, 36, 661–668.
52. Palazzi C, D'Amico E, Cacciatore P et al (2003). Juvenile onset psoriatic arthritis in a patient with X-linked agammaglobulinemia (Bruton's disease). *Scand J Rheumatol*, 32, 309–311.
53. Verbruggen G, De Backer S, Deforce D et al (2005). X-linked agammaglobulinemia and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 64, 1075–1078.

54. Martin S, Wolf-Eichbaum D, Duinkerken G et al (2001). Development of type 1 diabetes despite severe hereditary B-lymphocyte deficiency. *New England Journal Medicine*, 345, 1036–1040.
55. Cellier C, Foray S, Hermine O (2000). Regional enteritis associated with enterovirus in a patient with X-linked agammaglobulinemia. *N Engl J Med*, 342, 1611–1612.
56. Hermaszewski R.A, Webster A.D (1993). Primary hypogammaglobulinaemia: a survey of clinical manifestations and complications. *Q J Med*, 86, 31–42.
57. Van der Meer J.W, Weening R.S, Schellekens P.T et al (1993). Colorectal cancer in patients with X-linked agammaglobulinaemia. *Lancet*, 1439–1440.
58. Brosens L.A, Tytgat K.M, Morsink F.H et al (2008). Clin Gastroenterol Hepatol 6,115–119.
59. Echave S.J.M, Villena V, Verdugo M (2001). X-linked agammaglobulinaemia and squamous lung cancer. *Eur Respir J*, 17, 570–572.
60. Esenboga S, Deniz C.A (2018). Clinical and Genetic Features of the Patients with X-Linked Agammaglobulinemia from Turkey: Single Center Experience. *Scandinavian Journal of Immunology*, 87 (e12647), 1-8.
61. Farrar J.E, Rohrer J, Conley M.E (1996). Neutropenia in X-linked agammaglobulinemia. *Clin Immunol Immunopatho*, 81, 271–276.
62. Wood P, Stanworth S, Burton J et al (2007). Recognition, clinical diagnosis and management of patients with primary antibody deficiencies: a systematic review. *Clin. Exp. Immunol.*, 149, 410–423.

63. Tobon G. J, J.H Izquierdo, Canas C.A (2013). B lymphocytes: development, tolerance, and their role in autoimmunity-focus on systemic lupus erythematosus. *Autoimmune Dis*, 2013, 827-854.
64. Trịnh Văn Bảo, Trần Thị Thanh (2016). Đột biến gen, Sinh học, Nhà xuất bản giáo dục, 166-169.
65. Hoàng Anh Vũ (2013). Đột biến gen *BTK* trên bệnh nhân thiếu Gammaglobulin máu liên kết nhiễm sắc thể X. *Tạp chí Nghiên cứu y học*, 17 (5), 195-199.
66. Lindvall J, Blomberg K.E.M, Valiaho J et al (2005). Bruton's tyrosine kinase: cell biology, sequence conservation, mutation spectrum, siRNA modifications and expression profiling. *Immunol Rev*, 203, 200–215.
67. Väliaho J, Smith C.I, Vihinen M (2006). BTKbase: the mutation database for X-linked agammaglobulinemia. *Hum Mutat* 27, 1209–1217.
68. Conley M.E, Broides A, Hernandez T.V et al (2005). Genetic analysis of patients with defects in early B cell development. *Immunol Rev*, 203, 216–234.
69. Speletas M., Kanariou M., Kanakoudi T.F et al (2001). Analysis of Btk mutations in patients with X-linked agammaglobulinaemia (XLA) and determination of carrier status in normal female relatives: a nationwide study of Btk deficiency in Greece. *Scand. J. Immunol*, 54, 321-327.
70. Duncan B.K, Miller J.H (1980). Mutagenic deamination of cytosine residues in DNA. *Nature*, 287, 560–561.
71. Van Zelm MC, Geertsema C, Nieuwenhuis N et al (2008). Gross deletions involving IGHM, BTK, or Artemis: a model for genomic lesions mediated by transposable elements. *Am J Hum Genetics* 82, 320–332.

72. Rohrer J, Minegishi Y, Richter D et al (1999). Unusual mutations in Btk: An insertion, a duplication, an inversion and four large deletions. *Clin Immunol*, 90, 28–37.
73. Conley M.E, Partain J.D, Norland S.M et al (2005). Two independent retrotransposon insertions at the same site within the coding region of BTK. *Hum Mutat*, 25, 324–325.
74. Holinski F.E, Weiss M, Brandau O et al (1998). Mutation screening of the BTK gene in 56 families with X-linked agammaglobulinemia (XLA): 47 unique mutations without correlation to clinical course. *Pediatrics*, 101, 276–284.
75. Bruton O.C (1952). Agammaglobulinemia. *Pediatrics*, 9, 722–728.
76. Hansen S, Gustafson R, Smith C.I.E et al (2002). Subcutaneous IgG infusions in patients with primary antibody deficiencies: decreased time of delivery with maintained safety. *Clin Immunol*, 104, 237-241.
77. Martin T. D (2006). IGIV: contents, properties, and methods of industrial production--evolving closer to a more physiologic product. *Int Immunopharmacol*, 6 (4), 517-522.
78. Matucci A, Maggi E, Vultaggio A (2014). Mechanisms of action of Ig preparations: immunomodulatory and anti-inflammatory effects. *Front Immunol*, 5, 690.
79. Anne B, Markus B, Falk N (2010). Mechanisms of action of intravenous immunoglobulins. *Expert Rev Clin Immunol*, 6 (3), 425–434.
80. Seite J, Shoenfeld Y, Youinou P et al (2008). What is the content of the magic draft IVIG?. *Autoimmune Rev* 7,435–439.
81. Kiani-Alikhan S, Yong P.F.K, Grosse-Kreul D (2012). Immunoglobulin replacement therapy: is there a role for IgA and IgM. *J. Allergy Clin.*, 130, 553–554.

82. Maarschalk-Ellerbroek L.J (2011). Immunoglobulin treatment in primary antibody deficiency. *Int. J. Antimicrob*, 37 (5), 396-404.
83. Pilette C, Ouadrhiri V, Godding V (2001). Lung mucosal immunity: immunoglobulin-A revisited. *Eur Respir J* 18, 571–588.
84. Baumann U, Miescher S, Vonarburg C (2014). Immunoglobulin replacement therapy in antibody deficiency syndromes: are we really doing enough? *Clin Exp Immunol*, 178 Suppl 1, 83-85.
85. Stiehm E (1998). Immunodeficiency disorders general conditions. *4th edition*, X-Linked agammaglobulinemia, 324-341.
86. Roifman C.M, Levison H, Gelfand E.W (1987). High-dose versus low-dose intravenous immunoglobulin in hypogammaglobulinaemia and chronic lung disease. *Lancet*, 8541, 1075–1077.
87. Eijkhout H.W, van Der Meer J.W, Kallenberg C.G et al (2001). The effect of two different dosages of intravenous immunoglobulin on the incidence of recurrent infections in patients with primary hypogammaglobulinemia. A randomized, double-blind, multicenter crossover trial. *Ann Intern Med*, 135(3), 165–174.
88. Panida S, Mark B (2015). Immunoglobulin Replacement Therapy for Primary Immunodeficiency. *Immunol Allergy Clin North Am*, 35, 4.
89. Orange J.S, Grossman W.J, Navickis R.J et al (2010). Impact of trough IgG on pneumonia incidence in primary immunodeficiency: a meta-analysis of clinical studies. *Clin Immunol*, 137(1), 21–30.
90. Chen Y, Stirling R.G, Paul E (2011). Longitudinal decline in lung function in patients with primary immunoglobulin deficiencies. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 127, 1414–1417.

91. Bonagura V.R (2013). Illustrative cases on individualizing immunoglobulin therapy in primary immunodeficiency disease. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2013;111(6 Suppl), S10–13.
92. Orange J.S, Belohradsky B.H, Berger M et al (2012). Evaluation of correlation between dose and clinical outcomes in subcutaneous immunoglobulin replacement therapy. *Clin Exp Immunol*, 169 (2), 172-181.
93. Lucas M, Lee M, Lortan J et al (2010). Infection outcomes in patients with common variable immunodeficiency disorders: relationship to immunoglobulin therapy over 22 years. *J Allergy Clin Immunol*, 125 (6), 1354-1360 e1354.
94. Quinti I, Soresina A, Guerra A et al (2011). Effectiveness of immunoglobulin replacement therapy on clinical outcome in patients with primary antibody deficiencies: results from a multicenter prospective cohort study. *J Clin Immunol*, 31 (3), 315-322.
95. Baris S, Ercan H, Hasret H.C et al (2011). Efficacy of Intravenous Immunoglobulin Treatment in Children with Common Variable Immunodeficiency. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 21(7), 514-521.
96. Kerr J, Quinti I, Eibl M et al (2014). Is dosing of therapeutic immunoglobulins optimal? A review of a three-decade long debate in europe. *Front Immunol*, 5, 629-632.
97. Yong P.L, Boyle J, Ballou M et al (2010). Use of intravenous immunoglobulin and adjunctive therapies in the treatment of primary immunodeficiencies: a working group report of and study by the Primary Immunodeficiency Committee of the American Academy of Allergy Asthma and Immunology. *Clin Immunol*, 135, 255-263.

98. Arason G.J, Jorgensen G.H, Ludviksson B.R (2010). Primary immunodeficiency and autoimmunity: lessons from human diseases. *Scand J Immunol* 71, 317–328.
99. Arandi N, Mirshafiey A, Jeddi-Tehrani M et al (2013). Evaluation of CD4 + CD25 + FOXP3 + regulatory T cells function in patients with common variable immunodeficiency. *Cell Immunol* 281, 129–133.
100. Salliot C, Dougados M, Gossec L (2009). Risk of serious infections during rituximab, abatacept and anakinra treatments for rheumatoid arthritis: meta-analyses of randomised placebo-controlled trials. *Ann Rheum Dis* 68, 25–32.
101. Agarwal S, Mayer L (2013). Diagnosis and treatment of gastrointestinal disorders in patients with primary immunodeficiency. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 11 (9), 1050-1063.
102. Porpiglia A.S, Rohrer J, Conley M.E (2003). Reconstitution of B cell function in murine models of immunodeficiency. *Clin Immunol*, 107, 90–97.
103. Howard V, Myers L.A, Conley M.E (2003). Stem cell transplants for patients with X-linked agammaglobulinemia. *Clin Immunol*, 107, 98– 102.
104. Abu-Arja R.F, Chernin L.R, Abusin G et al (2015). Successful hematopoietic cell transplantation in a patient with X-linked agammaglobulinemia and acute myeloid leukemia. *Pediatr Blood Cancer*, 62 (9), 1674-1676.
105. Ikegame K, Imai K, Yamashita M et al (2016). Allogeneic stem cell transplantation for X-linked agammaglobulinemia using reduced intensity conditioning as a model of the reconstitution of humoral immunity. *J Hematol Oncol*, 9, 9.
106. Khuất Hữu Thanh (2004). Liệu pháp gen - Nguyên lý và ứng dụng. Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật, 21-33.

107. Aiuti A, Slavin S, Aker M (2002). Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science*, 296, 2410–2413.
108. Kang H. J, Bartholomae C. C, Paruzynski A et al (2011). Retroviral gene therapy for X-linked chronic granulomatous disease: results from phase I/II trial. *Mol Ther*, 19 (11), 2092-2101.
109. Boztug K, Schmidt M, Schwarzer A et al (2010). Stem-cell gene therapy for the Wiskott-Aldrich syndrome. *N Engl J Med*, 363 (20), 1918-1927.
110. Yu P.W, Tabuchi R.S, Kato R.M et al (2004). Sustained correction of B-cell development and function in a murine model of X-linked agammaglobulinemia (XLA) using retroviral-mediated gene transfer. *Blood*, 104 (5), 1281-1290.
111. Quartier P, Debre M, De Blic J et al (1999). Early and prolonged intravenous immunoglobulin therapy in childhood agammaglobulinemia: A retrospective survey of 31 patients. *J Pediatr*, 134, 589 –596.
112. Lâm Thị Mỹ (2011). Đặc điểm bệnh nhân thiếu Gammaglobulin máu có liên quan nhiễm sắc thể giới tính tại bệnh viện Nhi đồng 1 TP Hồ Chí Minh. *Tạp chí nghiên cứu y học*, Tập 1, phụ san số 4, 305-314.
113. Quang Van Vu, Taizo Wada, Huong Thi Minh Le (2014). Clinical and mutational features of Vietnamese children with X-linked agammaglobulinemia. *BMC Pediatrics*, 14 (129), 1-5.
114. Chadha N. K. (2015). Brodsky and Friedman Scales and Clinical Tonsil Size Grading in Children. *JAMA Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 141 (10), 1-5.

115. Lau Y.L, Jones B.M, Yeung C.Y (1992). Biphasic rise of serum immunoglobulins G and A and sex influence on serum immunoglobulin M in normal Chinese children. *J Paediatr Child Health*, 28 (3), 240-243.
116. Bệnh viện Nhi Trung Ương (2014). Sổ tay khoảng tham chiếu. 10-30.
117. Stiehm E.R (2004). Immunodeficiency Disorders: General Considerations. *Immunologic Diseases in Infant &Children. Elsevier Saunders, Philadelphia.*, 5th edition, 289-355.
118. Nguyễn Thị Vân Anh, Lê Thị Minh Hương, Trương Ngọc Dương (2012). Báo cáo 2 ca bệnh vô gammaglobulin huyết liên quan đến nhiễm sắc thể X ở trẻ em. *Tạp chí Y dược lâm sàng*, 8 (2), 65-69.
119. Zhang Z.Y, Zhao X.D, Jiang L.P et al (2010). Clinical characteristics and molecular analysis of 21 Chinese children with congenital agammaglobulinemia. *Scand J Immunol*, 72 (5), 454-459.
120. Lee P. P, Chen T. X, Jiang L.P et al (2010). Clinical characteristics and genotype-phenotype correlation in 62 patients with X-linked agammaglobulinemia. *J Clin Immunol*, 30 (1), 121-131.
121. Deepti S, Sagar B (2017). Serial Serum Immunoglobulin G (IgG) Trough Levels in Patients with X-linked Agammaglobulinemia on Replacement Therapy with Intravenous Immunoglobulin: Its Correlation with Infections in Indian Children. *J Clin Immunol*, 37 (3), 311–318.
122. Takada H, Kanegane H, Nomura A et al (2004). Female agammaglobulinemia due to the Bruton tyrosine kinase deficiency caused by extremely skewed X-chromosome inactivation. *Blood*, 103 (1), 185-187.
123. Walter E.C, Ehlenbach W.J, Hotchkin D.L (2009). Low birth weight and respiratory disease in adulthood: a population-based case-control

study. American journal of respiratory and critical care medicine. 180 (2), 176-180.

124. Nguyễn Ngọc Lanh, Văn Đình Hoa (2006). Các cơ quan và tế bào tham gia vào quá trình miễn dịch. *Sách miễn dịch học* 32-45.
125. Abul K.A, Andrew H.L, Shiv P (2015). Basic Immunology - Functions and Disorders of the Immune System. *Elsevier*,
126. Basile N, Danielian S, Oleastro M et al (2009). Clinical and molecular analysis of 49 patients with X-linked agammaglobulinemia from a single center in Argentina. *J Clin Immunol*, 29 (1), 123-129.
127. Chun J.K, Lee T.J, Song J.W et al (2008). Analysis of Clinical Presentations of Bruton Disease: A Review of 20 Years of Accumulated Data from Pediatric Patients at Severance Hospital. *Yonsei Medical Journal*, 49 (1),
128. Zahra A, Nadia K, Abdelhamid B et al (2016). X-Linked Agammaglobulinemia in a Large Series of North African Patients: Frequency, Clinical Features and Novel BTK Mutations. *36(3):187-94*, 36 (3), 187-194.
129. Asghar Aghamohammadi, Mostafa Moin, Abolhasan Farhoudi et al (2004). Efficacy of intravenous immunoglobulin on the prevention of pneumonia in patients with agammaglobulinemia. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 40 (2), 113-118.
130. Cunningham-Rundles C (2011). Autoimmunity in primary immune deficiency: taking lessons from our patients. *Clin Exp Immunol*, 164 Suppl 2, 6-11.
131. Sordet C, Cantagrel A, Schaefferbeke T et al (2005). Bone and joint disease associated with primary immune deficiencies. *Joint Bone Spine*, 72 (6), 503-514.

132. Qin X, Jiang L.P, Tang X.M et al (2013). Clinical features and mutation analysis of X-linked agammaglobulinemia in 20 Chinese patients. *World J Pediatr*, 9 (3), 273-277.
133. Aghamohammadi A, Fiorini M, Moin M et al (2006). Clinical, Immunological and Molecular Characteristics of 37 Iranian Patients with X-Linked Agammaglobulinemia. *International Archives of Allergy and Immunology*, 141 (4), 408-414.
134. Conley M.E, Farmer D.M, Dobbs A.K et al (2008). A minimally hypomorphic mutation in Btk resulting in reduced B cell numbers but no clinical disease. *Clin Exp Immunol*, 152 (1), 39-44.
135. Donn M.S, Lan T, David L.N (2001). A Case of X-Linked Agammaglobulinemia Diagnosed in Adulthood. *Clinical Immunology*, 99 (1), 94-99.
136. Lê Nam Trà, Nguyễn Công Khanh, Nguyễn Thu Nhận và cộng sự (2016). Sự phát triển hệ thống miễn dịch ở trẻ em. *Sách giáo khoa Nhi khoa, Nhà xuất bản Y học*, 1456-1465.
137. Gouilleux G, Chapel H, Chevret S et al (2002). Efficiency of immunoglobulin G replacement therapy in common variable immunodeficiency: correlations with clinical phenotype and polymorphism of the neonatal Fc receptor. *British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology*, 171, 186–119.
138. Gaspar H.B, Ferrando M, Caragol I et al (2000). Kinase mutant Btk results in atypical X-linked agammaglobulinaemia phenotype. *Clin. Exp. Immunol*, 120, 346 – 350.
139. Jones A, Bradley L, Alterman L et al (1996). X-linked agammaglobulinemia with a “leaky” phenotype. *Archives of Disease in Childhood*, 74, 548–549.

140. Moschese V, Orlandi P, Plebani A et al (2000). X-chromosome inactivation and mutation pattern in the Bruton's tyrosine kinase gene in patients with X-linked agammaglobulinemia. *Mol Med*, 6, 104-113.
141. Yel L, Minegishi Y, Coustan-Smith E et al (1996). Mutations in the m heavy chain gene in patients with agammaglobulinemia. *N Engl J Med*, 335, 1486-1493.
142. Valiaho J, Smith C.I, Vihinen M (2006). BTKbase: the mutation database for X-linked agammaglobulinemia. *Hum Mutat*, 27 (12), 1209-1217.
143. Bykowski M.J, Haire R.N, Ohta Y et al (1996). Discordant phenotype in siblings with X-linked agammaglobulinemia. *Am J Hum Genetics*, 58, 477-483.
144. Wang X.C, Wang Y, Kanegane H et al (2005). Gene diagnosis of X-linked agammaglobulinemia. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*, 43 (6), 449-452.
145. Vorechovsky I, Luo L, Hertz J.M et al (1997). Mutation pattern in the Bruton's tyrosine kinase gene in 26 unrelated patients with X-linked agammaglobulinemia. *Humain Mutatation*, 9, 418-425.
146. Perez E. E, Orange J. S, Bonilla F et al (2017). Update on the use of immunoglobulin in human disease: A review of evidence. *J Allergy Clin Immunol*, 139 (3S), S1-S46.

PHỤ LỤC

Phụ lục 1

CHỈ SỐ THAM CHIẾU XÉT NGHIỆM MIỄN DỊCH [115] [116]

Immunoglobulin (g/L)	<1 tháng	1 tháng	3 tháng	6 tháng	1 tuổi	3 tuổi	5-9 tuổi	9-15 tuổi	>15 tuổi
IgG	6,1-13	4,6-8,6	2,9-5,5	2,3-4,4	3,3-6,2	4,8-8,9	5,5-11,5	6,5-12,3	6,6-12,8
IgA	0-0,2	0,1-0,3	0,1-0,4	0,2-0,6	0,2-0,8	0,3-1,2	0,4-1,6	0,5-2	0,7-3,4
IgM	0,04-0,6	0,2-0,7	0,3-0,8	0,3-0,9	0,5-1,3	0,5-1,5	0,5-1,5	0,5-1,6	0,5-2,1

Dưới nhóm		0-3 tháng	3-6 tháng	6-12 tháng	1-2 tuổi	2-6 tuổi	6-12 tuổi	12-18 tuổi
TCD3	Số lượng	3,68 (2,50-5,50)	3,93 (2,50-5,60)	3,93 (1,90-5,90)	3,55 (2,10-6,20)	2,39 (1,40-3,70)	1,82 (1,20-2,60)	1,48 (1,00-2,20)
	%	73 (53-84)	66 (51-77)	65 (49-76)	65 (53-75)	66 (56-75)	69 (60-76)	73 (56-84)
TCD4	Số lượng	2,61 (1,60-4,00)	2,85 (1,80-4,00)	2,67 (1,40-4,30)	2,16 (1,30-3,40)	1,38 (0,70-2,20)	0,98 (0,65-1,50)	0,84 (0,53-1,30)
	%	52 (35-64)	46 (35-56)	46 (31-56)	41 (32-51)	38 (28-47)	37 (31-47)	41 (31-52)
TCD8	Số lượng	0,98 (0,56-1,70)	1,05 (0,59-1,60)	1,04 (0,50-1,70)	1,04 (0,62-2,00)	0,84 (0,49-1,30)	0,68 (0,37-1,10)	0,53 (0,33-0,92)
	%	18 (12-28)	16 (12-23)	17 (12-24)	20 (14-30)	23 (16-30)	25 (18-35)	26 (18-35)
CD19	Số lượng	0,73 (0,30-2,00)	1,55 (0,43-3,00)	1,52 (0,61-2,60)	1,31 (0,72-2,60)	0,75 (0,39-1,40)	0,48 (0,27-0,86)	0,30 (0,11-0,57)
	%	15 (06-32)	25 (11-41)	24 (14-37)	25 (16-35)	21 (14-33)	18 (13-27)	14 (06-23)
CD56	Số lượng	0,42 (0,17-1,10)	0,42 (0,17-0,83)	0,40 (0,16-0,95)	0,36 (0,18-0,92)	0,30 (0,13-0,72)	0,23 (0,10-0,48)	0,19 (0,07-0,48)
	%	8 (04-18)	6 (03-14)	7 (03-15)	7 (03-15)	9 (04-17)	9 (04-17)	9 (03-22)

Phụ lục 2

QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG TẾ BÀO LYMPHO DƯỚI NHÓM

Bước	Mô tả
1	Ủ mẫu:
1.1	Đếm số lượng và công thức bạch cầu bằng máy huyết học tự động nếu không sử dụng ống Trucount.
1.2	Ủ mẫu: - Gắn nhãn thông tin bệnh nhân và Panel sử dụng lên ống. - Lấy 20µl kháng thể mỗi loại kháng thể gắn huỳnh quang vào đáy ống nghiệm (<i>chú ý: không chạm vào miếng kim loại và hạt Beads nếu sử dụng ống Trucount</i>). - Thêm 50µl máu toàn phần đã trộn đều vào ống (<i>chú ý: tránh dính máu vào thành ống, các tế bào dính trên thành ống sẽ không gắn được kháng thể. Dùng phương pháp Pipette đảo ngược để đảm bảo hút chính xác 50µl máu</i>) - Trộn nhẹ bằng máy Vortex mixer - Ủ 15 phút trong tối, ở nhiệt độ 20 – 25°C. - Thêm 450µl dung dịch BD Facs Lysing 1X (<i>không để ánh sáng chiếu trực tiếp</i>) - Trộn nhẹ bằng lắc Vortex mixer - Ủ trong tối 15 phút, ở nhiệt độ 20 - 25°C. - Tiến hành đếm mẫu trên máy BD FACS Canto II
2	Đếm mẫu trên máy Facs canto II - Mở phần mềm BD Facs Canto - Nhập thông tin bệnh nhân: + Gồm ID, họ và tên, Panel được chỉ định. + Nếu sử dụng ống Trucount, nhập số lượng hạt Beads tương ứng theo LOT. + Nếu không sử dụng ống Trucount, nhập số lượng bạch cầu và tỷ lệ Lympho của mẫu máu. + Nhập tỷ lệ pha loãng mẫu máu - Lắc đều mẫu trước khi chạy. - Đặt mẫu vào khay - Nhấn RUN - Điều chỉnh các plot gate cho phù hợp nhằm phân tách rõ và lấy toàn bộ các tế bào trong từng quần thể.

Phụ lục 3

QUY TRÌNH TÁCH ADN TỪ MÁU NGOẠI VI

Quy trình tách ADN tổng số từ máu ngoại vi được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất kit tách ADN (Qiagen-DNA blood mini kit) theo quy trình sau:

- Cho 20 µl Protease QIAGEN vào mỗi ống ly tâm 1,5ml, sau đó cho tiếp 200 µl mẫu máu vào trong ống.
- Thêm 200 µl dung dịch đệm AL rồi trộn đều hỗn hợp trên bằng máy lắc trong 15 giây.
- Ủ hỗn hợp trong máy ổn nhiệt ở nhiệt độ 56°C trong 10 phút, sau đó lấy ống ra khỏi máy ổn nhiệt.
- Ly tâm nhẹ hỗn hợp để tránh dung dịch đọng trên thành ống và nắp ống.
- Thêm 200 µl cồn Ethanol (96-100%), trộn đều và ly tâm nhẹ.
- Chuyển toàn bộ hỗn hợp trên vào cột lọc QIAamp, tránh để hỗn hợp dính vào thành ống và nắp ống.
- Ly tâm cột lọc ở tốc độ 8000 vòng/phút trong 1 phút, bỏ dịch nổi và chuyển cột lọc sang ống 2 ml sạch.
- Thêm 500 µl dung dịch đệm AW1, ly tâm ống với tốc độ 8000 vòng/phút trong 1 phút. Sau đó bỏ dịch nổi, chuyển cột lọc sang ống 2 ml sạch khác.
- Thêm 500 µl dung dịch đệm AW2, ly tâm ống với tốc độ 13000 vòng/phút trong 3 phút. Loại bỏ dịch nổi, chuyển cột lọc sang ống ly tâm 1.5 ml vô trùng.
- Thêm 200 µl dung dịch AE vào cột lọc, ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 phút, sau đó ly tâm với tốc độ 8000 vòng/ phút trong 1 phút thu ADN tổng số.

Sau quá trình tách ADN, sản phẩm thu được sẽ được xác định nồng độ ADN tổng số:

- Việc xác định nồng độ ADN sẽ cho phép tính toán thành phần phản ứng PCR đạt hiệu quả tốt. Nồng độ ADN được xác định bằng máy Nano Drop của hãng Thermo ở bước sóng 260 nm.
- Tiến hành đo 3 lần với mỗi mẫu để tránh sai số.

Phụ lục 4

TRÌNH TỰ CẬP MỖI PHẦN ỨNG PCR KHUẾCH ĐẠI GEN *BTK*

Đoạn	Tên mũi	Trình tự mũi	Kích thước (bp)
X1	E1F	5'-GGAAGTCTTGTCTCTACCTCTG-3'	700bp
	E1R	5'-AGCCATGCTGTCTCTCTGGT-3'	
X2	E2F	5'-GAAACTAGGTAGCTAGGCTGA-3'	949bp
	E3R	5'-CATCACCAGTCTATTTACAGA-3'	
X3	E4F	5'-AAAGGCTTCTAGTACCTAAGGA-3'	1829bp
	E5R	5'-CCTTTCCTTCTTTCTTTGGAAAC-3'	
X4	E6F	5'-AAAACATGCAAATGGTGGCTTC-3'	649bp
	E7R	5'-AGTGTGTTCTTAGGGCTTGAC-3'	
X5	E8F	5'-GTAAGCCAGAGAGTTGGGAGA-3'	796bp
	E9R	5'-AGAGAGAGTTCCTCCTGGAAG-3'	
X6	E10F	5'-GGGTGCTGTAACCTCCAATC-3'	1933bp
	E13R	5'-CCACCCTCACCCCAGAGAAAT-3'	
X7	E14F	5'-TCCTATTTCTACCCCAGTAGG-3'	1058bp
	E15R	5'-ATATCTTCCACTGCTACTTCCA-3'	
X8	E16F	5'-GCTTTGTGCCTTTAACCTCTG-3'	1620bp
	E18R	5'-CAGTCTTTGGTGGCTGAATGG-3'	
X9	E19F	5'-ACATTTGCTGCTTACTCATTGC-3'	627bp
	E19R	5'-CTTCAGGGAGGCTGCATGAT-3'	

Asscess number của gen *BTK* là: U78027.1.

TRÌNH TỰ MỖI GENE BTK (U78027.1)

EXON 1:

		Pro 1F→	
Query	2	TTG-CTCTACCTCTGTCTTGTCTTTGTCCTTTGGGGTCCCTTCACTATCAAGTTCAACTGT	60
Sbjct	34786	TTGCTCTTACCTCTGTCTTGTCTTTGTCCTTTGGGGTCCCTTCACTATCAAGTTCAACTGT	34845
Query	61	GTGTCCCTGAGACTCCTCTGCCCCGAGGACAGGAGACTCGAAAAACGCTCTTCTTGGCC	120
Sbjct	34846	GTGTCCCTGAGACTCCTCTGCCCCGAGGACAGGAGACTCGAAAAACGCTCTTCTTGGCC	34905
Query	121	AGTCTCTTTGCTCTGTGTCTGCCAGCCCCAGCATCTCTCCTCTTTCTCTGTAAGCCCCTC	180
Sbjct	34906	AGTCTCTTTGCTCTGTGTCTGCCAGCCCCAGCATCTCTCCTCTTTCTCTGTAAGCCCCTC	34965
Query	181	TCCCTGTGCTGACTGTCTTCATAGTACTTTAGGTATGTTGTCCCTTTACCTCTGGGAGGA	240
Sbjct	34966	TCCCTGTGCTGACTGTCTTCATAGTACTTTAGGTATGTTGTCCCTTTACCTCTGGGAGGA	35025
Query	241	TAGCTTGATGACCTGTCTGCTCAGGCCAGCCCCATCTAGAGTCTCAGTGGCCCCAGTCAT	300
Sbjct	35026	TAGCTTGATGACCTGTCTGCTCAGGCCAGCCCCATCTAGAGTCTCAGTGGCCCCAGTCAT	35085
Query	301	GTTGAGAAAGGTTCTTTCAAAGATAGACTCAAGATAGTAGTGTCAAGGTCCCAAGCAAA	360
Sbjct	35086	GTTGAGAAAGGTTCTTTCAAAGATAGACTCAAGATAGTAGTGTCAAGGTCCCAAGCAAA	35145
Query	361	TGAAGGGCGGGGACAGTTGAGGGGGTGAATAGGGACGGCAGCAGGGAACCAGATAGCAT	420
Sbjct	35146	TGAAGGGCGGGGACAGTTGAGGGGGTGAATAGGGACGGCAGCAGGGAACCAGATAGCAT	35205
Query	421	GCTGCTGAGAAGaaaaaaGACATTGCTTTAGGTCAGGAAGCaaaaaaGGGAAGTCACT	480
Sbjct	35206	GCTGCTGAGAAGAAAAAAGACATTGGTTTAGGTCAGGAAGCAAAAAAGGGAAGTCACT	35265
Query	481	GGCTGTGAAAGGGTGGGGTTTGCTCAGACTGTCCTTCTCTCTGGACTGTAAGAATATGT	540
Sbjct	35266	GGCTGTGAAAGGGTGGGGTTTGCTCAGACTGTCCTTCTCTCTGGACTGTAAGAATATGT	35325
Query	541	CTCCAGGGCCAGTGTCTGCTGCGATCGAGTCCCACCTTCCAAGTCTGGCATCTCAATGC	600
Sbjct	35326	CTCCAGGGCCAGTGTCTGCTGCGATCGAGTCCCACCTTCCAAGTCTGGCATCTCAATGC	35385
Query	601	ATCTGGGAAGCTACCTGCATTAAGTCAGGACTGAGGTGGGTCTGGGGTATGGCAGGGGCT	660
Sbjct	35386	ATCTGGGAAGCTACCTGCATTAAGTCAGGACTGAGGTGGGTCTGGGGTATGGCAGGGGCT	35445
Query	661	GGGCAGCAGCAGCAATGTACCTTGCTTGGGACCCCTAAAAACCAGAGACAGCATGGCT	706
Sbjct	35446	GGGCAGCAGCAGCAATGTACCTTGCTTGGGACCCCTAAAAACCAGAGACAGCATGGCT	35491

1R

EXON 2-3:

Query	46021	GCTGTGGGAGGAGGTTGGTAGGAAGAAATTATTTTGTGAGCTGTGCACATTTTGTTC	46080
Sbjct	46021	GCTGTGGGAGGAGGTTGGTAGGAAGAAATTATTTTGTGAGCTGTGCACATTTTGTTC	46080
Query	46081	TTTGAAACTAGGTAGCTAGGCTGAGGGGGAACCAAGAGGGATGAGGATTAATGTCCTGGG	46140
Sbjct	46081	TTTGAAACTAGGTAGCTAGGCTGAGGGGGAACCAAGAGGGATGAGGATTAATGTCCTGGG	46140
CDS: Putative 4	1		M
Query	46141	TCCTCAGGAACTTTCATTATCAACAGCACACAGGTGAAGTCCAGAAAAGAAGCTATGG	46200
Sbjct	46141	TCCTCAGGAACTTTCATTATCAACAGCACACAGGTGAAGTCCAGAAAAGAAGCTATGG	46200
CDS: Bruton's tyrosin	1		M
CDS: Putative 4	2	A A V I L E S I F L K R S Q Q K K K T S	
Query	46201	CCGCAGTGATTCTGGAGAGCATCTTTCTGAAGCGATCCCAACAGAAAAAGAAAACATCAC	46260

Sbjct	46201	CCGCAGTGATTCTGGAGAGCATCTTTCTGAAGCGATCCCAACAGAAAAAGAAAACATCAC	46260
CDS:Bruton's tyrosin	2	A A V I L E S I F L K R S Q Q K K K T S	
CDS: Putative 4	22	P L N F K K R L F L L T V H K L S Y Y E	
Query	46261	CTCTAAACTTCAAGAAGCGCCTGTTTCTCTTGACCGTGACAAACTCTCCTACTATGAGT	46320
Sbjct	46261	CTCTAAACTTCAAGAAGCGCCTGTTTCTCTTGACCGTGACAAACTCTCCTACTATGAGT	46320
CDS:Bruton's tyrosin	22	P L N F K K R L F L L T V H K L S Y Y E	
CDS: Putative 4	42	Y D F E R G ~~~~~	
Query	46321	ATGACTTTGAACGTGGGGTAAGTTTCTCGACTATGAAAAGTGGTTTCAAGATATCAAGG	46380
Sbjct	46321	ATGACTTTGAACGTGGGGTAAGTTTCTCGACTATGAAAAGTGGTTTCAAGATATCAAGG	46380
CDS:Bruton's tyrosin	42	Y D F E R G ~~~~~	
CDS: Putative 4		~~~~~	
Query	46381	ACTTGGCCTTAGATCTTTCTTGGGAAGAGGTAAATTTTCGTGGTAGGAGGAGGGGAGT	46440
Sbjct	46381	ACTTGGCCTTAGATCTTTCTTGGGAAGAGGTAAATTTTCGTGGTAGGAGGAGGGGAGT	46440
CDS:Bruton's tyrosin		2R	
CDS: Putative 4		~~~~~	
Query	46441	AGAATGGACCTAAGTTCTTTCAAATTCAGCAAAATATTTCCTAGCCTATAACTAGCTAAA	46500
Sbjct	46441	AGAATGGACCTAAGTTCTTTCAAATTCAGCAAAATATTTCCTAGCCTATAACTAGCTAAA	46500
CDS:Bruton's tyrosin		~~~~~	
CDS: Putative 4		~~~~~	
Query	46501	GCCGGAAGTCAAAGGTCCTAAGAAGCCACAAGGAAAATATTACCATGGAATCTTGAAT	46560
Sbjct	46501	GCCGGAAGTCAAAGGTCCTAAGAAGCCACAAGGAAAATATTACCATGGAATCTTGAAT	46560
CDS:Bruton's tyrosin		~~~~~	
CDS: Putative 4		~~~~~	
Query	46561	TGATGAGCACTCATTAATGATTGTTGAAAATGAAATCGAAGAGTTGGAATTTGCTTCCT	46620
Sbjct	46561	TGATGAGCACTCATTAATGATTGTTGAAAATGAAATCGAAGAGTTGGAATTTGCTTCCT	46620
CDS:Bruton's tyrosin		~~~~~	
CDS: Putative 4		~~~~~	
Query	46621	TACTTCCTATGAGGAAGGTACATACAGTCATTCACCTCTCCATGGTATTGCGCTCCATT	46680
Sbjct	46621	TACTTCCTATGAGGAAGGTACATACAGTCATTCACCTCTCCATGGTATTGCGCTCCATT	46680
CDS:Bruton's tyrosin		~~~~~	
CDS: Putative 4		~~~~~	
Query	46681	TGGTAGTCATAGATTTATAGATCTGGAAGGAttttttttCTTCCCCACATGACAGGTC	46740
Sbjct	46681	TGGTAGTCATAGATTTATAGATCTGGAAGGATTTTCTTCTCCCCACATGACAGGTC	46740
CDS:Bruton's tyrosin		~~~~~	
CDS: Putative 4		~~~~~	
Query	46741	CTGGTGCCACCTCACTTTGTTGAATGATTAGATAACAAAATCTAATCATCTGGTTGCTTA	46800
Sbjct	46741	CTGGTGCCACCTCACTTTGTTGAATGATTAGATAACAAAATCTAATCATCTGGTTGCTTA	46800
CDS:Bruton's tyrosin		3F	
CDS: Putative 4	48	~~~~~ R R G S K	
Query	46801	ATCCCTCTTAATCTTTCTCCATTTCTTCTCATTCTACTTCTCAGAGAAGAGGCAGTAA	46860
Sbjct	46801	ATCCCTCTTAATCTTTCTCCATTTCTTCTCATTCTACTTCTCAGAGAAGAGGCAGTAA	46860
CDS:Bruton's tyrosin	48	~~~~~ R R G S K	
CDS: Putative 4	53	K G S I D V E K I T C V E T V V P E K N	
Query	46861	GAAGGGTTCAATAGATGTTGAGAAGATCACTTGTGTTGAAACAGTGGTTCTTGaaaaaaa	46920
Sbjct	46861	GAAGGGTTCAATAGATGTTGAGAAGATCACTTGTGTTGAAACAGTGGTTCTTGAAAAAAAA	46920
CDS:Bruton's tyrosin	53	K G S I D V E K I T C V E T V V P E K N	
CDS: Putative 4	73	P P P E R Q I P ~~~~~	
Query	46921	TCCTCCTCCAGAAAGACAGATTCCGGTAAGAAGAGACCAATGCTGAGATGGGGAACAGC	46980
Sbjct	46921	TCCTCCTCCAGAAAGACAGATTCCGGTAAGAAGAGACCAATGCTGAGATGGGGAACAGC	46980
CDS:Bruton's tyrosin	73	P P P E R Q I P ~~~~~	
CDS: Putative 4		~~~~~	

Query	46981	AGATTGGAAGAAATTTGCAACATTTAAATTCCTGTAAATAGACTGGTGATGCTGTGCAA	47040
Sbjct	46981	AGATTGGAAGAAATTTGCAACATTTAAATTCCTGTAAATAGACTGGTGATGCTGTGCAA	47040
CDS:Bruton's tyrosin			
CDS: Putative 4			
Query	47041	CGTGAACACGGTCAAGTTTCCTTTAAAAATTCCTCACTTACCATATTGGTTATAAAGA	47100
Sbjct	47041	CGTGAACACGGTCAAGTTTCCTTTAAAAATTCCTCACTTACCATATTGGTTATAAAGA	47100
CDS:Bruton's tyrosin			
CDS: Putative 4			
Query	47101	ATCTTAGCTTCTTTCCCTTCATATTGAGAACATCTCACTAAACATGGAAAAATTTGTTAAACA	47160
Sbjct	47101	ATCTTAGCTTCTTTCCCTTCATATTGAGAACATCTCACTAAACATGGAAAAATTTGTTAAACA	47160
CDS:Bruton's tyrosin			

EXON 4 (Contig 5) :

Query	1	AAAGGCTTCTAGTACCTAAGGAAATTCAGAAAAGAGCAATGCATCAACCAATAACCATTT	60
Sbjct	49703	AAAGGCTTCTAGTACCTAAGGAAATTCAGAAAAGAGCAATGCATCAACCAATAACCATTT	49762
CDS:Bruton's tyrosin			
CDS: Putative 1			
Query	61	TTTCTTATTTTCATTACAGAGAAGAGGTGAAGAGTCCAGTGAAATGGAGCAAAATTTCAATC	120
Sbjct	49763	TTTCTTATTTTCATTACAGAGAAGAGGTGAAGAGTCCAGTGAAATGGAGCAAAATTTCAATC	49822
CDS:Bruton's tyrosin	81		
CDS: Putative 1			
Query	121	ATTGAAAGGTTCCCTTATCCCTTCCAGGTGAGTTATTTTCTCTACCAAATCTCGAAAGG	180
Sbjct	49823	ATTGAAAGGTTCCCTTATCCCTTCCAGGTGAGTTATTTTCTCTACCAAATCTCGAAAGG	49882
CDS:Bruton's tyrosin	95		
Query	181	CCCCTGTAACACAATTAGAAGGGGTGGTGGGGTGCAGGGCAGAGGGAAGGCTACGAGGAC	240
Sbjct	49883	CCCCTGTAACACAATTAGAAGGGGTGGTGGGGTGCAGGGCAGAGGGAAGGCTACGAGGAC	49942
CDS:Bruton's tyrosin			
Query	241	CCAGTGAAATAGAAGTTGAGGTGGACAAGGATGCTGAACCAAGAAATGAGACTGGCATGGG	300
Sbjct	49943	CCAGTGAAATAGAAGTTGAGGTGGACAAGGATGCTGAACCAAGAAATGAGACTGGCATGGG	50002
CDS:Bruton's tyrosin			
Query	301	CTAAGAATGTTTGCTTTTCTATTTACCTAATCTAACATAGTTTCTTTTAGTCTCTATACC	360
Sbjct	50003	CTAAGAATGTTTGCTTTTCTATTTACCTAATCTAACATAGTTTCTTTTAGTCTCTATACC	50062
CDS:Bruton's tyrosin			
Query	361	TCAAAAAGAATACATAGCAGCACCAATTCTATCATAGTGTGTCTTGTCTATGATAACTGC	420
Sbjct	50063	TCAAAAAGAATACATAGCAGCACCAATTCTATCATAGTGTGTCTTGTCTATGATAACTGC	50122
CDS:Bruton's tyrosin			
Query	421	ATTGAGAAAGATGCTCTGCTTGTGAGTGAGCATTTCACCTCCTTCTGGTTCTGACTATC	480
Sbjct	50123	ATTGAGAAAGATGCTCTGCTTGTGAGTGAGCATTTCACCTCCTTCTGGTTCTGACTATC	50182
CDS:Bruton's tyrosin			
Query	481	TGTCTAATAGTGGTCATGTGGGTTGAAAAGATAGAAAAGGGAGTAGTATTAGGAAGTTC	540
Sbjct	50183	TGTCTAATAGTGGTCATGTGGGTTGAAAAGATAGAAAAGGGAGTAGTATTAGGAAGTTC	50242
CDS:Bruton's tyrosin			
Query	541	AGTATGAGGAAGACTTATTAGACTTATGCATAAACCTAAATTCGTTGTAATCTGGAAGA	600
Sbjct	50243	AGTATGAGGAAGACTTATTAGACTTATGCATAAACCTAAATTCGTTGTAATCTGGAAGA	50302
CDS:Bruton's tyrosin			
Query	601	GCTGAAGTGCCACATATGCATCTGTTTAGGAGAGCAAGAACTACAAATTTGGTCTTCAG	660
Sbjct	50303	GCTGAAGTGCCACATATGCATCTGTTTAGGAGAGCAAGAACTACAAATTTGGTCTTCAG	50361
CDS:Bruton's tyrosin			

Query 661 TTTGGCT 667
Sbjct 50362 TTTGGCT 50368
CDS:Bruton's tyrosin ~~~~~

EXON 5:

Query 1 TGATGCTATAAACTCTGTGAGGGTTGGAACCACATCTTATATATTTTCATGCATCTTCGT 60
Sbjct 50711 TGATGCTATAAACTCTGTGAGGGTTGGAACCACATCTTATATATTTTCATGCATCTTCGT 50770
CDS:Bruton's tyrosin ~~~~~

Query 61 AACACCTAGCATGATGCCTTGACATGGTAAAAAATACTATTGACTTGATGATATTG 120
Sbjct 50771 AACACCTAGCATGATGCCTTGACATGGTAAAAAATACTATTGACTTGATGATATTG 50830
CDS:Bruton's tyrosin ~~~~~

Query 121 CTTATTATATACCTTACCCTTTTTGAAGTAGGTTGTAGTTCCAAATTTGATTTATTTTG 180
Sbjct 50831 CTTATTATATACCTTACCCTTTTTGAAGTAGGTTGTAGTTCCAAATTTGATTTATTTTG 50890
CDS:Bruton's tyrosin ~~~~~

Query 181 GCTAATATTGGTGAGGGGAGGCCACTAGGTAGTGGAGGTGGAGGTAATTAGCCATGAATT 240
Sbjct 50891 GCTAATATTGGTGAGGGGAGGCCACTAGGTAGTGGAGGTGGAGGTAATTAGCCATGAATT 50950
CDS:Bruton's tyrosin ~~~~~

Query 241 AAAATTTTACTCCATATTATCCAAGTGAATAACCCATATGTACTAATCAAGACTTAATTT 300
Sbjct 50951 AAAATTTTACTCCATATTATCCAAGTGAATAACCCATATGTACTAATCAAGACTTAATTT 51010
CDS:Bruton's tyrosin ~~~~~

Query 301 ATATAGATTATCACTTCATTTCTCTTCTATACAAAGTCAGAATTTAATAATAAGATAAAA 360
Sbjct 51011 ATATAGATTATCACTTCATTTCTCTTCTATACAAAGTCAGAATTTAATAATAAGATAAAA 51070
CDS:Bruton's tyrosin ~~~~~

Query 361 TACCCCTTTGTTGGATAAACAAAAATGTTATCTCCAGCAAGGGCAGACGGAGACCTTATAA 420
Sbjct 51071 TACCCCTTTGTTGGATAAACAAAAATGTTATCTCCAGCAAGGGCAGACGGAGACCTTATAA 51130
CDS:Bruton's tyrosin ~~~~~

Query 421 AATAAGTTTATGCATGAATTGAAGCACAAGTCAGGAGGACCTAAGAGTATGAAAAATTCT 480
Sbjct 51131 AATAAGTTTATGCATGAATTGAAGCACAAGTCAGGAGGACCTAAGAGTATGAAAAATTCT 51190
CDS:Bruton's tyrosin ~~~~~

Query 481 AAGAGCTTTTAAACGCTACATTCCTAGATATGAAGAGTTCAGGAATCCTTCAGATAGTTC 540
Sbjct 51191 AAGAGCTTTTAAACGCTACATTCCTAGATATGAAGAGTTCAGGAATCCTTCAGATAGTTC 51250
CDS:Bruton's tyrosin ~~~~~

Query 541 ACATAACCTGAACACCATTTGCTGACTGAAGATTCTGCCTTCTTTGTTTTCTACAATAAA 600
Sbjct 51251 ACATAACCTGAACACCATTTGCTGACTGAAGATTCTGCCTTCTTTGTTTTCTACAATAAA 51310
CDS:Bruton's tyrosin ~~~~~

Query 601 TATACAAATTGTCCCTAAGATTAGTACTTTCAAGGTCCTTCTCCTTTTTCTGAATCCT 660
Sbjct 51311 TATACAAATTGTCCCTAAGATTAGTACTTTCAAGGTCCTTCTCCTTTTTCTGAATCCT 51370
CDS:Bruton's tyrosin ~~~~~

5F →

CDS: Putative 1 1 V V Y D E G P L Y
Query 661 AACTGCTGAAGTCTGTGTTTTTCATCGACCCAGGTTGTATATGATGAAGGCCTCTCTACG 720
Sbjct 51371 AACTGCTGAAGTCTGTGTTTTTCATCGACCCAGGTTGTATATGATGAAGGCCTCTCTACG 51430
CDS:Bruton's tyrosin 104 ~~~~~ V V Y D E G P L Y

CDS: Putative 1 10 V F S P T E E L R K R W I H Q L K N
Query 721 TCTTCTCCCAACTGAAGAACTAAGGAAGCGGTGGATTACCAGCTCAAAACGGTGAGA 780
Sbjct 51431 TCTTCTCCCAACTGAAGAACTAAGGAAGCGGTGGATTACCAGCTCAAAACGGTGAGA 51490
CDS:Bruton's tyrosin 113 V F S P T E E L R K R W I H Q L K N ~~~~~

Query	781	ATTATTTGGAAAAATAATGTTTCCAAAGAAAGGAAAGG	821
Sbjct	51491	ATTATTTGGAAAAATAATGTTTCCAAAGAAAGGAAAGG	51531
CDS:Bruton's tyrosin		~~~~~←~~~~~	
		5R	

EXON 6-7:

Query	2	AAAACATGCAAAATGGTGGCTTCTCCTCCATGTCAGATGTGATCTCTCTCTTCTTCTC	61
Sbjct	58721	AAAACATGCAAAATGGTGGCTTCTCCTCCATGTCAGATGTGATCTCTCTCTTCTTCTC	58780
CDS:Bruton's tyrosin		~~~~~→~~~~~	
		6F	
CDS: Putative 1	1	I R Y N S D L V Q K Y H P C F W I D	
Query	62	TACAGTAATCCGGTACAACAGTATCTGGTTCAGAAATATCACCCCTTGCTTCTGGATCGA	121
Sbjct	58781	TACAGTAATCCGGTACAACAGTATCTGGTTCAGAAATATCACCCCTTGCTTCTGGATCGA	58840
CDS:Bruton's tyrosin	131	~~~~~V I R Y N S D L V Q K Y H P C F W I D	
CDS: Putative 1	19	G Q Y L C C S Q T A K N A M G C Q I L E	
Query	122	TGGGCAGTATCTCTGCTGCTCTCAGACAGCCAAAAATGCTATGGGCTGCCAAATTTTGA	181
Sbjct	58841	TGGGCAGTATCTCTGCTGCTCTCAGACAGCCAAAAATGCTATGGGCTGCCAAATTTTGA	58900
CDS:Bruton's tyrosin	150	G Q Y L C C S Q T A K N A M G C Q I L E	
CDS: Putative 1	39	N R N G ~~~~~	
Query	182	GAACAGGAATGGAAGTAAGCAATCTGATCGATATAATTTCTTCTCCTTGACTGTTTCC	241
Sbjct	58901	GAACAGGAATGGAAGTAAGCAATCTGATCGATATAATTTCTTCTCCTTGACTGTTTCC	58960
CDS:Bruton's tyrosin	170	N R N G ~~~~~←	
CDS: Putative 1		~~~~~	
Query	242	ATCACTCTCCCAAGGGTCTGTCAAGCCAGGGTCATAGCATAAGGTTGTACACTTTGGGT	301
Sbjct	58961	ATCACTCTCCCAAGGGTCTGTCAAGCCAGGGTCATAGCATAAGGTTGTACACTTTGGGT	59020
CDS:Bruton's tyrosin		~~~~~	
		6R	
CDS: Putative 1		~~~~~	
Query	302	GCTAAACAAGGGTCTGGGGGAGGAGGACATGGGGCTGAAATCCAGCTGGTAA	361
Sbjct	59021	GCTAAACAAGGGTCTGGGGGAGGAGGACATGGGGCTGAAATCCAGCTGGTAA	59080
CDS:Bruton's tyrosin		~~~~~	
CDS: Putative 1		~~~~~	
Query	362	TCTGCTCTCCGAGCTATGTGACCTGGCATGCCTAGCTACTTTTCTAACTTGCCTAAAGG	421
Sbjct	59081	TCTGCTCTCCGAGCTATGTGACCTGGCATGCCTAGCTACTTTTCTAACTTGCCTAAAGG	59140
CDS:Bruton's tyrosin		~~~~~	
CDS: Putative 1		~~~~~	
Query	422	CACTCAATATGGACGGCAAAGTCCCTGACCAACCTGTCCTTGGCCCTTTCCTAAAGTG	481
Sbjct	59141	CACTCAATATGGACGGCAAAGTCCCTGACCAACCTGTCCTTGGCCCTTTCCTAAAGTG	59200
CDS:Bruton's tyrosin		~~~~~→~~~~~	
		7F	
CDS: Putative 1	43	~~~~~S L K P G S S H R	
Query	482	CATTCCATATCATCACTGGCTTCTGTTTGCAGGCTTAAACCTGGGAGTTCTACCCGG	541
Sbjct	59201	CATTCCATATCATCACTGGCTTCTGTTTGCAGGCTTAAACCTGGGAGTTCTACCCGG	59260
CDS:Bruton's tyrosin	174	~~~~~S L K P G S S H R	
CDS: Putative 1	52	K T K K P L P P T P E E D Q	
Query	542	AAGACAAAAAGCCTCTTCCCCAACGCCTGAGGAGGACCAGGTATACAGGAAACTGGG	601
Sbjct	59261	AAGACAAAAAGCCTCTTCCCCAACGCCTGAGGAGGACCAGGTATACAGGAAACTGGG	59320
CDS:Bruton's tyrosin	183	K T K K P L P P T P E E D Q ~~~~~	
Query	602	TGCTGCCACTGCTTAAATGGAACTTATAGTCAAGCCCTAAGAACACACT	649
Sbjct	59321	TGCTGCCACTGCTTAAATGGAACTTATAGTCAAGCCCTAAGAACACACT	59368
CDS:Bruton's tyrosin		~~~~~←~~~~~	
		7R	

EXON 8-9:

Query	2	GTAAGCCAGAGAGTTGGGAGAGAAGAGAGTGTGGTATCTTGACAAACCTCCTAC	61
-------	---	--	----

Seq. ID	Accession	Start	End	Strand	Orientation	Sequence	Length
Sbjct	CDS:Bruton's tyrosin	60640	60699	+	5'	GTAAGCCAGAGAGTTGGGAGA	10
CDS: Putative 1	Query	1	62	+	5'	CTTTTCCTCACTACATAGATCTTTGAAAAAGCCACTACCGCCTGAGCCAGCAGCAGCAC	62
Sbjct	CDS:Bruton's tyrosin	60700	60759	+	5'	CTTTTCCTCACTACATAGATCTTTGAAAAAGCCACTACCGCCTGAGCCAGCAGCAGCAC	10
CDS: Putative 1	Query	14	122	+	5'	P V S T S E L K K K V V A L Y D Y M P M N	109
Sbjct	CDS:Bruton's tyrosin	60760	60819	+	5'	CAGTCTCCACAAGTGAGCTGAAAAAGGTTGTGGCCCTTTATGATTACATGCCAATGAATG	10
CDS: Putative 1	Query	34	182	+	5'	A N D L Q L R K G D E Y F I L E E S N L	148
Sbjct	CDS:Bruton's tyrosin	60820	60879	+	5'	CAAAATGATCTACAGCTGCGGAAGGTTGATGAATATTTATCTTGAGGAAGAAGCAATTCAC	10
CDS: Putative 1	Query	54	242	+	5'	P W W R A R D K N G	188
Sbjct	CDS:Bruton's tyrosin	60880	60939	+	5'	CATGGTGGAGAGCAGAGATAAAAATGGTGAGTCCACACCAGCCCTTCTTGAGCCTGGT	10
CDS: Putative 1	Query	302	60940	+	5'	GCCTGCCCACTCCCTACACGCAAAAAGTGCTGCGGCATAATTCCTGATCAGCATCCTC	10
Sbjct	CDS:Bruton's tyrosin	60940	60999	+	5'	GCCTGCCCACTCCCTACACGCAAAAAGTGCTGCGGCATAATTCCTGATCAGCATCCTC	10
CDS: Putative 1	Query	362	61000	+	5'	ATCAGAGACTGTTCTTCCACACCCAGACTGAACATGCTCTCCCTCCAAGTACTTCCAGC	10
Sbjct	CDS:Bruton's tyrosin	61000	61059	+	5'	ATCAGAGACTGTTCTTCCACACCCAGACTGAACATGCTCTCCCTCCAAGTACTTCCAGC	10
CDS: Putative 1	Query	422	61060	+	5'	GTGAGCTCCCTATACATGGCCTCTGCCACATCTCTGAGCCTCTGTTGTTGGGCACATAT	10
Sbjct	CDS:Bruton's tyrosin	61060	61119	+	5'	GTGAGCTCCCTATACATGGCCTCTGCCACATCTCTGAGCCTCTGTTGTTGGGCACATAT	10
CDS: Putative 1	Query	482	61120	+	5'	AACCAATGCAACATGTGCATAGGCTCTGCACCTCACTGGCTCACTGCCTAACCATGCATC	10
Sbjct	CDS:Bruton's tyrosin	61120	61179	+	5'	AACCAATGCAACATGTGCATAGGCTCTGCACCTCACTGGCTCACTGCCTAACCATGCATC	10
CDS: Putative 1	Query	542	61180	+	5'	AGAGACATGATTGTCTTTGAGGGAGGTGCATGATACATATACCTCCATTGAGATTGTT	10
Sbjct	CDS:Bruton's tyrosin	61180	61239	+	5'	AGAGACATGATTGTCTTTGAGGGAGGTGCATGATACATATACCTCCATTGAGATTGTT	10
CDS: Putative 1	Query	602	61240	+	5'	CTGAGCTCAGGGAGCTGGGCATATGAATCTGTCTCTGGAGGCTGGGAGGTGCTGGATG	10
Sbjct	CDS:Bruton's tyrosin	61240	61299	+	5'	CTGAGCTCAGGGAGCTGGGCATATGAATCTGTCTCTGGAGGCTGGGAGGTGCTGGATG	10
CDS: Putative 1	Query	64	662	+	5'	AACGCCACATGTTTCCCTTCACAGGCAGGAAGGCTACATTCTAGTAACATATGTCATG	118
Sbjct	CDS:Bruton's tyrosin	61300	61359	+	5'	AACGCCACATGTTTCCCTTCACAGGCAGGAAGGCTACATTCTAGTAACATATGTCATG	10
CDS: Putative 1	Query	75	722	+	5'	E A E D S I E M Y	147
Sbjct	CDS:Bruton's tyrosin	61360	61419	+	5'	AAGCAGAAGACTCCATAGAAATGTATGAGTAAGTATGTTTATGTCAGTCCCAATCTTCC	10

Query 782 AGGAGGAACTCTCTCT 794
Sbjct 61420 AGGAGGAACTCTCTCT 61432
CDS:Bruton's tyrosin

9R

EXON 10-11-12-13:

Query 1 TGCTGTAACCTCCAATCTGCTTATGACCAGGAGCCACTCAAGCAGCACTCTCCCTTCACA 60
Sbjct 62067 TGCTGTAACCTCCAATGCTTATGACCAGGAGCCACTCAAGCAGCACTCTCCCTTCACA 62126
CDS:Bruton's tyrosin
10F
CDS: Putative 1 1 W Y S K H M T R S Q A E Q L L K Q E ~~~~
Query 61 GGTGGTATTCCAAACACATGACTCGGAGTCAGGCTGAGCAACTGCTAAAGCAAGAGGTAA 120
Sbjct 62127 GGTGGTATTCCAAACACATGACTCGGAGTCAGGCTGAGCAACTGCTAAAGCAAGAGGTAA 62186
CDS:Bruton's tyrosin 281 ~ W Y S K H M T R S Q A E Q L L K Q E ~~~~
CDS: Putative 1
Query 121 GTGTGGAACCACTAGCACACAGCATTCTCCTTGCAATAAGTGAGGATCTTGAAGTGAAGGC 180
Sbjct 62187 GTGTGGAACCACTAGCACACAGCATTCTCCTTGCAATAAGTGAGGATCTTGAAGTGAAGGC 62246
CDS:Bruton's tyrosin
CDS: Putative 1
Query 181 CTGTCTGCCCCCTACCTTTGGGCAAGGCAGTGTCAAAGCTGCCATCGTCTGGGATCCCA 240
Sbjct 62247 CTGTCTGCCCCCTACCTTTGGGCAAGGCAGTGTCAAAGCTGCCATCGTCTGGGATCCCA 62306
CDS:Bruton's tyrosin
10R
CDS: Putative 1
Query 241 ATTACACCAtttttttgttttttCTGAGACGGAAGTCTCGGTCTGTCAAGTCAAGGC 300
Sbjct 62307 ATTACACCAtttttttgttttttCTGAGACGGAAGTCTCGGTCTGTCAAGTCAAGGC 62366
CDS:Bruton's tyrosin
CDS: Putative 1
Query 301 TGGAGTCAGTGGCGTGATCTGGGCTCACTGCAACCTCCGCCTTCTGGGTCAAGTAATT 360
Sbjct 62367 TGGAGTCAGTGGCGTGATCTGGGCTCACTGCAACCTCCGCCTTCTGGGTCAAGTAATT 62426
CDS:Bruton's tyrosin
CDS: Putative 1
Query 361 CTCCTACCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGGATTACAGGCACATGCCACCACGCCGACTAA 420
Sbjct 62427 CTCCTACCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGGATTACAGGCACATGCCACCACGCCGACTAA 62486
CDS:Bruton's tyrosin
CDS: Putative 1
Query 421 TTTTGTATTTTTAGCAGAGACGGGGTTTCAACATGTGGCCAGGCTGGTCTCGAACTCC 480
Sbjct 62487 TTTTGTATTTTTAGCAGAGACGGGGTTTCAACATGTGGCCAGGCTGGTCTCGAACTCC 62546
CDS:Bruton's tyrosin
CDS: Putative 1
Query 481 TGACCTCAGGTGATCCGCCACCTCGGCCTCCCAAAATGCTGGGATTACAGGCATGAGCC 540
Sbjct 62547 TGACCTCAGGTGATCCGCCACCTCGGCCTCCCAAAATGCTGGGATTACAGGCATGAGCC 62606
CDS:Bruton's tyrosin
CDS: Putative 1
Query 541 ACCATGCCCGGCCTGCACCTTTTAATATTTAAAGCAATGAGGCTGTAGCTCAAGCGTGA 600
Sbjct 62607 ACCATGCCCGGCCTGCACCTTTTAATATTTAAAGCAATGAGGCTGTAGCTCAAGCGTGA 62666
CDS:Bruton's tyrosin
11F
CDS: Putative 1
Query 601 ACTTGGCAGTAAATCAGGGGTGTTCTATTTCTCTCAAGTTGGGCAGGTGGGATG 660
Sbjct 62667 ACTTGGCAGTAAATCAGGGGTGTTCTATTTCTCTCAAGTTGGGCAGGTGGGATG 62726
CDS:Bruton's tyrosin
CDS: Putative 1 19 ~~~~~~ G K E
Query 661 CAGGTGTGAGCACCCTTCTCTACAGACAGCTTCTTTTTCGTTGTTTCAGGGGAAAGA 720

Sbjct	62727	CAGGTGTGAGCACCCTCTCTCTACAGACAGCTTCTTTTCGTGTTTCAGGGGAAAGA	62786
CDS:Bruton's tyrosin	299	~ ~ ~ ~ ~ G K E ~ ~ ~ ~ ~	
CDS: Putative 1	22	G G F I V R D S S K A G K Y T V S V F A	
Query	721	AGGAGGTTTCATTGTCAGAGACTCCAGCAAAGCTGGCAAATATACAGTGTCTGTGTTTGC	780
Sbjct	62787	AGGAGGTTTCATTGTCAGAGACTCCAGCAAAGCTGGCAAATATACAGTGTCTGTGTTTGC	62846
CDS:Bruton's tyrosin	302	G G F I V R D S S K A G K Y T V S V F A	
CDS: Putative 1	42	K S T G ~ ~ ~ ~ ~	
Query	781	TAAATCCACAGGGTGAGTGCTACTATTCCAAGGCCCTGAGGACAAAAGAACAGGGGTACCC	840
Sbjct	62847	TAAATCCACAGGGTGAGTGCTACTATTCCAAGGCCCTGAGGACAAAAGAACAGGGGTACCC	62906
CDS:Bruton's tyrosin	322	K S T G ~ ~ ~ ~ ~	
CDS: Putative 1		~ ~ ~ ~ ~	
Query	841	TCCTAATAGCTCCTTGATGCTGTGCCCGTCCCACTTCCTCTGTCTCTGAAACTCAAACT	900
Sbjct	62907	TCCTAATAGCTCCTTGATGCTGTGCCCGTCCCACTTCCTCTGTCTCTGAAACTCAAACT	62966
CDS:Bruton's tyrosin		~ ~ ~ ~ ~	
CDS: Putative 1		~ ~ ~ ~ ~	
Query	901	CATCTCACTTCACTTCCTGGGTTCTGTTGACCTTTGTGCCCAAGTTACTGACTAAGCATC	960
Sbjct	62967	CATCTCACTTCACTTCCTGGGTTCTGTTGACCTTTGTGCCCAAGTTACTGACTAAGCATC	63026
CDS:Bruton's tyrosin		~ ~ ~ ~ ~	
CDS: Putative 1	46	~ ~ ~ ~ ~ D P Q G V I R H Y V V C S T P Q	
Query	961	CACCTTCTCAGGGACCCTCAAGGGGTGATACGTATTATGTTGTGTGTTCCACACCTCAG	1020
Sbjct	63027	CACCTTCTCAGGGACCCTCAAGGGGTGATACGTATTATGTTGTGTGTTCCACACCTCAG	63086
CDS:Bruton's tyrosin	326	~ ~ ~ ~ ~ D P Q G V I R H Y V V C S T P Q	
CDS: Putative 1	62	S Q Y Y L A E K H L F S T I P E L I N Y	
Query	1021	AGCCAGTATTACCTGGCTGAGAAGCACCTTTTCAGCACCATCCCTGAGCTCATTAACTAC	1080
Sbjct	63087	AGCCAGTATTACCTGGCTGAGAAGCACCTTTTCAGCACCATCCCTGAGCTCATTAACTAC	63146
CDS:Bruton's tyrosin	342	S Q Y Y L A E K H L F S T I P E L I N Y	
CDS: Putative 1	82	H Q H N S A ~ ~ ~ ~ ~	
Query	1081	CATCAGCACAACTCTGCAGGTGAGTACCAGGGGCAACTGAGAAGGGAGTTACAGACACCA	1140
Sbjct	63147	CATCAGCACAACTCTGCAGGTGAGTACCAGGGGCAACTGAGAAGGGAGTTACAGACACCA	63206
CDS:Bruton's tyrosin	362	H Q H N S A ~ ~ ~ ~ ~	
CDS: Putative 1		~ ~ ~ ~ ~	
Query	1141	GGATAAGCAATGCAGGACAAGGTGATAAGAGGAAGAATCTGCCTCACAGGACAGTGTGAA	1200
Sbjct	63207	GGATAAGCAATGCAGGACAAGGTGATAAGAGGAAGAATCTGCCTCACAGGACAGTGTGAA	63266
CDS:Bruton's tyrosin		~ ~ ~ ~ ~	
CDS: Putative 1		~ ~ ~ ~ ~	
Query	1201	TTCACTGTGAAAGGAAATCCCTGTGATACTGGGTAGAAGCTGGTAAAGAGGTGGTCAGAG	1260
Sbjct	63267	TTCACTGTGAAAGGAAATCCCTGTGATACTGGGTAGAAGCTGGTAAAGAGGTGGTCAGAG	63326
CDS:Bruton's tyrosin		~ ~ ~ ~ ~	
CDS: Putative 1		~ ~ ~ ~ ~	
Query	1261	GCAGACCTACACCAACAGGGACTGACTCTTTATTGGTGATTGATGTTTCAGTGTTAAGA	1320
Sbjct	63327	GCAGACCTACACCAACAGGGACTGACTCTTTATTGGTGATTGATGTTTCAGTGTTAAGA	63386
CDS:Bruton's tyrosin		~ ~ ~ ~ ~	
CDS: Putative 1		~ ~ ~ ~ ~	
Query	1321	GAAGACACAAAAGAGGCTGGTGACTGATTTCATCAGCAAGTATTCATTGAGTTCCTACTGT	1380
Sbjct	63387	GAAGACACAAAAGAGGCTGGTGACTGATTTCATCAGCAAGTATTCATTGAGTTCCTACTGT	63446
CDS:Bruton's tyrosin		~ ~ ~ ~ ~	
CDS: Putative 1		~ ~ ~ ~ ~	
Query	1381	GTACTCAGCGATTTCCTCAGTTCTAGAGGAGAACACGGGAACATTCTGAGTCGAGGTCCT	1440
Sbjct	63447	GTACTCAGCGATTTCCTCAGTTCTAGAGGAGAACACGGGAACATTCTGAGTCGAGGTCCT	63506
CDS:Bruton's tyrosin		~ ~ ~ ~ ~	
CDS: Putative 1		~ ~ ~ ~ ~	

Query	1441	TGTCCTCAAAGAACATACAGGTTAGACAACATCAGAAGAAAGTTTATAAGCACTGTAAAA	1500
Sbjct	63507	TGTCCTCAAAGAACATACAGGTTAGACAACATCAGAAGAAAGTTTATAAGCACTGTAAAA	63566
CDS:Bruton's tyrosin			
CDS: Putative 1		~ ~ ~ ~ ~	
Query	1501	TTTCTAAAACTGAGACATTAGTGAGGGCATGGATATGGGGAACAGCTTCATCAAGAAG	1560
Sbjct	63567	TTTCTAAAACTGAGACATTAGTGAGGGCATGGATATGGGGAACAGCTTCATCAAGAAG	63626
CDS:Bruton's tyrosin			
CDS: Putative 1		~ ~ ~ ~ ~	
Query	1561	GTAGGATGTGAGCTAAGCCTGGGCTGGGAGGTGGGAATATATTCAGTTAGGCAGTGTATT	1620
Sbjct	63627	GTAGGATGTGAGCTAAGCCTGGGCTGGGAGGTGGGAATATATTCAGTTAGGCAGTGTATT	63686
CDS:Bruton's tyrosin			
CDS: Putative 1		~ ~ ~ ~ ~	
Query	1621	TCAATTAGTATTTTCTCTTTTTTGTCCCTGAAAAGTATTTTGTGAGAGGAGAAACCTCTG	1680
Sbjct	63687	TCAATTAGTATTTTCTCTTTTTTGTCCCTGAAAAGTATTTTGTGAGAGGAGAAACCTCTG	63746
CDS:Bruton's tyrosin			
CDS: Putative 1		~ ~ ~ ~ ~	
Query	1681	GAAATATGTGGGTTTCATGGAGGTCTTCTGGGATTCAAAATGTACTAGAAAGATACACACC	1740
Sbjct	63747	GAAATATGTGGGTTTCATGGAGGTCTTCTGGGATTCAAAATGTACTAGAAAGATACACACC	63806
CDS:Bruton's tyrosin			
CDS: Putative 1		~ ~ ~ ~ ~	
Query	1741	GGAAGTGTGAGGCTTTAAGTGAGGATGTGTGAGGCATCCCACCTCCTACACCACACCAAC	1800
Sbjct	63807	GGAAGTGTGAGGCTTTAAGTGAGGATGTGTGAGGCATCCCACCTCCTACACCACACCAAC	63866
CDS:Bruton's tyrosin			
CDS: Putative 1		~ ~ ~ ~ ~	
Query	88	~ ~ ~ ~ ~G L I S R L K Y P V S Q	
Sbjct	1801	AGCATGACCTCTCTCTCTGTTTCAGGACTCATATCCAGGCTCAAATATCCAGTGTCTCAA	1860
CDS:Bruton's tyrosin	63867	AGCATGACCTCTCTCTCTGTTTCAGGACTCATATCCAGGCTCAAATATCCAGTGTCTCAA	63926
	368	~ ~ ~ ~ ~G L I S R L K Y P V S Q	
CDS: Putative 1		~ ~ ~ ~ ~	
Query	100	Q N K N A P S T A G L G Y	
Sbjct	1861	CAAACAAAGATGCACCTCCACTGCAGGCCTGGGATACGGTAACCTCTTATTTCTCTGG	1920
CDS:Bruton's tyrosin	63927	CAAACAAAGATGCACCTCCACTGCAGGCCTGGGATACGGTAACCTCTTATTTCTCTGG	63986
	380	Q N K N A P S T A G L G Y	
Query	1921	GGTAGGGTGGA 1932	
Sbjct	63987	GGTAGGGTGGA 63997	
CDS:Bruton's tyrosin		~ ~ ~ ~ ~	

13R

EXON 14-15:

Query	1	TCCTATTCTACCCAGTAGGGATTTTGTCTATTGTAAGAATTATACATTCATGACCCC	60
Sbjct	64431	TCCTATTCTACCCAGTAGGGATTTTGTCTATTGTAAGAATTATACATTCATGACCCC	64490
CDS:Bruton's tyrosin			
CDS: Putative 1		~ ~ ~ ~ ~	
Query	1	~ ~ ~ ~ ~S W E I D P K D L T	
Sbjct	61	AAAGAATCACACCAAGACTTTATTGTTAGGATCATGGGAAATTGATCCAAAGACCTGAC	120
CDS:Bruton's tyrosin	64491	AAAGAATCACACCAAGACTTTATTGTTAGGATCATGGGAAATTGATCCAAAGACCTGAC	64550
	393	~ ~ ~ ~ ~G S W E I D P K D L T	
CDS: Putative 1		~ ~ ~ ~ ~	
Query	11	F L K E L G T G Q F G V V K Y G K W R G	
Sbjct	121	CTTCTTGAAGGAGCTGGGGACTGGACAATTTGGGGTAGTGAAGTATGGGAAATGGAGAGG	180
CDS:Bruton's tyrosin	64551	CTTCTTGAAGGAGCTGGGGACTGGACAATTTGGGGTAGTGAAGTATGGGAAATGGAGAGG	64610
	404	F L K E L G T G Q F G V V K Y G K W R G	
CDS: Putative 1		~ ~ ~ ~ ~	
Query	31	Q Y D V A I K M I K E G S M S E D E F I	
Sbjct	181	CCAGTAGCAGCTGGCCATCAAGATGATCAAGAAGGCTCCATGTCTGAAGATGAATTCAT	240
CDS:Bruton's tyrosin	64611	CCAGTAGCAGCTGGCCATCAAGATGATCAAGAAGGCTCCATGTCTGAAGATGAATTCAT	64670

CDS:Bruton's tyrosin	424	Q Y D V A I K M I K E G S M S E D E F I	
CDS: Putative 1	51	E E A K V M M	
Query	241	TGAAGAAGCCAAAGTCATGATGTGAGTTATAGCCCAAACCTCAACTCTCAATCTATTGCT	300
Sbjct	64671	TGAAGAAGCCAAAGTCATGATGTGAGTTATAGCCCAAACCTCAACTCTCAATCTATTGCT	64730
CDS:Bruton's tyrosin	444	E E A K V M M	
CDS: Putative 1	301	GGAGTCTAGGAATTCACACAACAACCCACTGAGGCTTAAAGATGACTTACAGTAAGAGAG	360
Query	64731	GGAGTCTAGGAATTCACACAACAACCCACTGAGGCTTAAAGATGACTTACAGTAAGAGAG	64790
Sbjct	64731	GGAGTCTAGGAATTCACACAACAACCCACTGAGGCTTAAAGATGACTTACAGTAAGAGAG	64790
CDS:Bruton's tyrosin		14R	
CDS: Putative 1	361	GTTTGGGACGAGGACTGAAGTTTACCTTTAACTGGCGGTAGTCTTAAGTGCTAAGATAA	420
Query	64791	GTTTGGGACGAGGACTGAAGTTTACCTTTAACTGGCGGTAGTCTTAAGTGCTAAGATAA	64850
Sbjct	64791	GTTTGGGACGAGGACTGAAGTTTACCTTTAACTGGCGGTAGTCTTAAGTGCTAAGATAA	64850
CDS:Bruton's tyrosin			
CDS: Putative 1	421	TAGTTTCTGTGCCTTAGATATTGGTTGAGAATAGTGGTGATCATGGGTGTGTACCATCTC	480
Query	64851	TAGTTTCTGTGCCTTAGATATTGGTTGAGAATAGTGGTGATCATGGGTGTGTACCATCTC	64910
Sbjct	64851	TAGTTTCTGTGCCTTAGATATTGGTTGAGAATAGTGGTGATCATGGGTGTGTACCATCTC	64910
CDS:Bruton's tyrosin			
CDS: Putative 1	481	AGTAGCATTGGGGGTAGATGTAGAAAATTAACTTTCAAGAGAAATATTCTAATTTAGC	540
Query	64911	AGTAGCATTGGGGGTAGATGTAGAAAATTAACTTTCAAGAGAAATATTCTAATTTAGC	64970
Sbjct	64911	AGTAGCATTGGGGGTAGATGTAGAAAATTAACTTTCAAGAGAAATATTCTAATTTAGC	64970
CDS:Bruton's tyrosin			
CDS: Putative 1	541	CTTAGCGTTCTTTTCATTCCTGGACTTGTTCCTTTTCAATTGATGGGCTCCAAATCCCTG	600
Query	64971	CTTAGCGTTCTTTTCATTCCTGGACTTGTTCCTTTTCAATTGATGGGCTCCAAATCCCTG	65030
Sbjct	64971	CTTAGCGTTCTTTTCATTCCTGGACTTGTTCCTTTTCAATTGATGGGCTCCAAATCCCTG	65030
CDS:Bruton's tyrosin			
CDS: Putative 1	601	CTTGCTTCCACATTTTAAGCACTTTTGAGATTAGGGTGGGAAAGAGGAAAATAAACTTG	660
Query	65031	CTTGCTTCCACATTTTAAGCACTTTTGAGATTAGGGTGGGAAAGAGGAAAATAAACTTG	65090
Sbjct	65031	CTTGCTTCCACATTTTAAGCACTTTTGAGATTAGGGTGGGAAAGAGGAAAATAAACTTG	65090
CDS:Bruton's tyrosin			
CDS: Putative 1	661	CTGGTGTGACCCCTTATCTGATGCTCTACTCCTAGGTCAGCCCTTCCTCCCCAGCCCT	720
Query	65091	CTGGTGTGACCCCTTATCTGATGCTCTACTCCTAGGTCAGCCCTTCCTCCCCAGCCCT	65150
Sbjct	65091	CTGGTGTGACCCCTTATCTGATGCTCTACTCCTAGGTCAGCCCTTCCTCCCCAGCCCT	65150
CDS:Bruton's tyrosin		15F	
CDS: Putative 1	58		N
Query	721	TTATTGCTATTATGCAGAGCCAAAAGGAGAAGACTAGTTTCCTTGCCTTTCCTGTAGGAAT	780
Sbjct	65151	TTATTGCTATTATGCAGAGCCAAAAGGAGAAGACTAGTTTCCTTGCCTTTCCTGTAGGAAT	65210
CDS:Bruton's tyrosin	451		N
CDS: Putative 1	59	L S H E K L V Q L Y G V C T K Q R P I F	
Query	781	CTTTCCCATGAGAAGCTGGTGCAAGTTGATGGCGTCTGCACCAAGCAGCGCCCATCTTC	840
Sbjct	65211	CTTTCCCATGAGAAGCTGGTGCAAGTTGATGGCGTCTGCACCAAGCAGCGCCCATCTTC	65270
CDS:Bruton's tyrosin	452	L S H E K L V Q L Y G V C T K Q R P I F	
CDS: Putative 1	79	I I T E Y M A N G C L L N Y L R E M R H	
Query	841	ATCATCACTGAGTACATGGCCAATGGCTGCCTCCTGAACCTACCTGAGGGAGATGCGCCAC	900
Sbjct	65271	ATCATCACTGAGTACATGGCCAATGGCTGCCTCCTGAACCTACCTGAGGGAGATGCGCCAC	65330
CDS:Bruton's tyrosin	472	I I T E Y M A N G C L L N Y L R E M R H	
CDS: Putative 1	99	R F Q T Q Q L L E M C K D V C E A M E Y	
Query	901	CGCTTCCAGACTCAGCAGCTGCTAGAGATGTGCAAGGATGTCTGTGAAGCCATGGAATAC	960
Sbjct	65331	CGCTTCCAGACTCAGCAGCTGCTAGAGATGTGCAAGGATGTCTGTGAAGCCATGGAATAC	65390
CDS:Bruton's tyrosin	492	R F Q T Q Q L L E M C K D V C E A M E Y	
CDS: Putative 1	119	L E S K Q F L H R D L	
Query	961	CTGGAGTCAAAGCAGTTCTCTCACCGAGACCTGGTGGGACCTTAGAAGGATTGGCCTAGG	1020

```

Sbjct          65391 CTGGAGTCAAAGCAGTTCCTTACCAGAGACCTTGGTGGGACCTTAGAAGGATTGGCCTAGG 65450
CDS:Bruton's tyrosin 512  L E S S K Q F L H R D L ~~~~~
Query          1021  ACAAAAGGGCTGATGGGTGGAAAGTAGCACTGGAAGATATA 1060
Sbjct          65451  ACAAAAGGGCTGATGGGTGGAAAGTAGCACTGGAAGATATA 65490
CDS:Bruton's tyrosin          ~~~~~
                                     15R

```

EXON 16-17-18:

Query	1	GCTTTGTGCCTTTAAACCTCTGTGCTGGGACGGAGTCTCACTGGTCTCTGTTTGCACATC	60
Sbjct	66719	GCTTTGTGCCTTTAAACCTCTGTGCTGGGACGGAGTCTCACTGGTCTCTGTTTGCACATC	66778
CDS:Bruton's tyrosin		16F	
CDS: Putative 1	1	A A R N C L V N D Q G V V K V S D F G	
Query	61	AGGCAGCTCGAAACTGTGTTGAACGATCAAGAGTGTGTTAAAGTATCTGATTTCGGCC	120
Sbjct	66779	AGGCAGCTCGAAACTGTGTTGAACGATCAAGAGTGTGTTAAAGTATCTGATTTCGGCC	66838
CDS:Bruton's tyrosin	523	~ A A R N C L V N D Q G V V K V S D F G	
CDS: Putative 1	20	L S R	
Query	121	TGTCAGGTGAGTGTGGCTTTTTCATCTTTCCCTCCAGAAGTAAAAATAGCACAGTATGA	180
Sbjct	66839	TGTCAGGTGAGTGTGGCTTTTTCATCTTTCCCTCCAGAAGTAAAAATAGCACAGTATGA	66898
CDS:Bruton's tyrosin	542	L S R	
CDS: Putative 1			
Query	181	AACATGGGTAGGTGTACAGTTTTAATCCTCTCCTTTTCTTTTTTCTCATTCTAGCGT	240
Sbjct	66899	AACATGGGTAGGTGTACAGTTTTAATCCTCTCCTTTTCTTTTTTCTCATTCTAGCGT	66958
CDS:Bruton's tyrosin		16R	
CDS: Putative 1			
Query	241	TTTCGCGGATCTTCTATCTTTTTCTTCCTCTGAGTTATTTAAGCCACCTCTTTCATC	300
Sbjct	66959	TTTCGCGGATCTTCTATCTTTTTCTTCCTCTGAGTTATTTAAGCCACCTCTTTCATC	67018
CDS:Bruton's tyrosin			
CDS: Putative 1			
Query	301	cttttgttttatgtcataatccctttcccttcccttcccttatactcactcctcttt	360
Sbjct	67019	CTTTTGTTTATTGTCAATATCCCTTTCCCTCTCCTTTTATCTCTACCTCCTCTTT	67078
CDS:Bruton's tyrosin			
CDS: Putative 1			
Query	361	tttAAATCTATTTCCTCAATACCTTATCTTGATCTATTATCCTGATGACTTTACTCCAT	420
Sbjct	67079	TTTAAATCTATTTCCTCAATACCTTATCTTGATCTATTATCCTGATGACTTTACTCCAT	67138
CDS:Bruton's tyrosin			
CDS: Putative 1			
Query	421	TCCTCCTCTTTCTTAATCAGTCTAATTCCCAGTGACAACCTGCagataaaagggaaggaa	480
Sbjct	67139	TCCTCCTCTTTCTTAATCAGTCTAATTCCCAGTGACAACCTGCAGATAAAAGGAAGGGAA	67198
CDS:Bruton's tyrosin			
CDS: Putative 1			
Query	481	ggagaagagcagagaaaggaaaggtggatagagaaggaagggaaggagTACCTACTAGATCT	540
Sbjct	67199	GGAGAAGAGCAGAGAAAGGAAAGTGGATAGAGAAGGAGGAAGGAGTACCTACTAGATCT	67258
CDS:Bruton's tyrosin			
CDS: Putative 1			
Query	541	TATTTCACTTCATCCTCTCTGTAACCATATTGTCAATCAGGAAAGCTCAATCAGATACAA	600
Sbjct	67259	TATTTCACTTCATCCTCTCTGTAACCATATTGTCAATCAGGAAAGCTCAATCAGATACAA	67318
CDS:Bruton's tyrosin			
CDS: Putative 1			
Query	601	AAACAGGAAATTCGTTAAAGATAACGTTTGTAGAAGATACTAGTTGAGGAGGAGAGACTT	660
Sbjct	67319	AAACAGGAAATTCGTTAAAGATAACGTTTGTAGAAGATACTAGTTGAGGAGGAGAGACTT	67378

16B

CDS:Bruton's tyrosin

CDS: Putative 1
Query 661 TTGAGAAAAGCCTGTGTGTGTTTGTGACACTCTTGTGACCGTGCCAAGAAAACGTAAGCAA 720

Sbjct 67379 TTGAGAAAAGCCTGTGTGTGTTTGTGACACTCTTGTGACCGTGCCAAGAAAACGTAAGCAA 67438

CDS:Bruton's tyrosin

17F

CDS: Putative 1
Query 23 Y V L D
721 ATATCAAGCCTCCAAATCCTAATGCAACAAGTCCTGAATCCCTTGCAAGTATGTCCTGGA 780

Sbjct 67439 ATATCAAGCCTCCAAATCCTAATGCAACAAGTCCTGAATCCCTTGCAAGTATGTCCTGGA 67498

CDS:Bruton's tyrosin

Y V L D

CDS: Putative 1
Query 27 D E Y T S S V G S K F P V R W S P P E V
781 TGATGAATACACAAGCTCAGTAGGCTCCAAATTTCCAGTCCGGTGGTCCCCACCGGAAGT 840

Sbjct 67499 TGATGAATACACAAGCTCAGTAGGCTCCAAATTTCCAGTCCGGTGGTCCCCACCGGAAGT 67558

CDS:Bruton's tyrosin

D E Y T S S V G S K F P V R W S P P E V

CDS: Putative 1
Query 47 L M Y S K F S S K S D I W A F
841 CCTGATGTATAGCAAGTTCAGCAGCAAATCTGACATTGGGCTTTTGGTAAGTGGATAAG 900

Sbjct 67559 CCTGATGTATAGCAAGTTCAGCAGCAAATCTGACATTGGGCTTTTGGTAAGTGGATAAG 67618

CDS:Bruton's tyrosin

L M Y S K F S S K S D I W A F

CDS: Putative 1
Query 901 ATTACACAGATTATACAGCTCAAAGGATAAGAAATGCAAT-GGGAAAATTCACACTTTGC 959

Sbjct 67619 ATTACACAGATTATACAGCTCAAAGGATAAGAAATGCAATGGGGAAAATTCACACTTTGC 67678

CDS:Bruton's tyrosin

17R

CDS: Putative 1
Query 960 AACCTCCACAGAGATATTGTTCTTGCTTTTCATTCTTCCAATCCTTGGGGAGTGCCTACTG 1019

Sbjct 67679 AACCTCCACAGAGATATTGTTCTTGCTTTTCATTCTTCCAATCCTTGGGGAGTGCCTACTG 67738

CDS:Bruton's tyrosin

17R

CDS: Putative 1
Query 1020 TGTGTACGCCACCAAGGGGTTTCTGAGGATGAAAACCTAACTGGACATGATCTCTGCCT 1079

Sbjct 67739 TGTGTACGCCACCAAGGGGTTTCTGAGGATGAAAACCTAACTGGACATGATCTCTGCCT 67798

CDS:Bruton's tyrosin

CDS: Putative 1
Query 1080 TTTTAGAACTTAAACCATGTTAAGGAAAACAATTCATTGAGTTTCAACAGCTTCTGAAT 1139

Sbjct 67799 TTTTAGAACTTAAACCATGTTAAGGAAAACAATTCATTGAGTTTCAACAGCTTCTGAAT 67858

CDS:Bruton's tyrosin

CDS: Putative 1
Query 1140 ACTGATTATGTACCAGGCACTCTGCCAGCCCTATAACTGCAAGACAAATAAGATGCTG 1199

Sbjct 67859 ACTGATTATGTACCAGGCACTCTGCCAGCCCTATAACTGCAAGACAAATAAGATGCTG 67918

CDS:Bruton's tyrosin

CDS: Putative 1
Query 1200 TCTCTCTTCTAGAGGAGTTAATAGTCTAGTACGACCTTGATCTCCATCTAGTGTGGTCAG 1259

Sbjct 67919 TCTCTCTTCTAGAGGAGTTAATAGTCTAGTACGACCTTGATCTCCATCTAGTGTGGTCAG 67978

CDS:Bruton's tyrosin

CDS: Putative 1
Query 1260 TACTATAGCAGAAAATTTGGGCAAAATATAAAAAGCACAGAGCGGGGAACCAACTGATTCT 1319

Sbjct 67979 TACTATAGCAGAAAATTTGGGCAAAATATAAAAAGCACAGAGCGGGGAACCAACTGATTCT 68038

CDS:Bruton's tyrosin

CDS: Putative 1
Query 1320 AATCTTTGAGGTTGATCTAGGAAGACTAGGACCCCTGCTATCCAAAAGACTGCAAAACCA 1379

Sbjct 68039 AATCTTTGAGGTTGATCTAGGAAGACTAGGACCCCTGCTATCCAAAAGACTGCAAAACCA 68098

CDS:Bruton's tyrosin

18F

CDS: Putative 1
Query 62 G V L M W E I Y S L G K
1380 ATTTAATAAAttttttCACCTTCTAGGGGTTTGTATGTTGGAAATTTACTCCCTGGGGAA 1439

Sbjct	68099		68158
CDS:Bruton's tyrosin	584	~~~~~G V L M W E I Y S L G K	
CDS: Putative 1	74	M P Y E R F T N S E T A E H I A Q G L R	
Query	1440	GATGCCATATGAGAGATTACTAACAGTGAGACTGCTGAACACATTGCCCAAGGCTACG	1499
Sbjct	68159	GATGCCATATGAGAGATTACTAACAGTGAGACTGCTGAACACATTGCCCAAGGCTACG	68218
CDS:Bruton's tyrosin	596	M P Y E R F T N S E T A E H I A Q G L R	
CDS: Putative 1	94	L Y R P H L A S E K V Y T I M Y S C W H	
Query	1500	TCTCTACAGGCCTCATCTGGCTTCAGAGAAGGTATATACCATCATGTACAGTTGCTGGCA	1559
Sbjct	68219	TCTCTACAGGCCTCATCTGGCTTCAGAGAAGGTATATACCATCATGTACAGTTGCTGGCA	68278
CDS:Bruton's tyrosin	616	L Y R P H L A S E K V Y T I M Y S C W H	
CDS: Putative 1	114	E	
Query	1560	TGAGGTAAGTGCTTTATTAGGATCTCTTAAATTATTCCTTGAATCTACTTGCCCATTTA	1619
Sbjct	68279	TGAGGTAAGTGCTTTATTAGGATCTCTTAAATTATTCCTTGAATCTACTTGCCCATTTA	68338
CDS:Bruton's tyrosin	636	E	
Query	1620	GCTGGCCATTCAGCCACCAAGACTG	1645
Sbjct	68339	GCTGGC CATTTCAGCCACCAAGACTG	68364
CDS:Bruton's tyrosin		~~~~~	

18R

EXON 19:

CDS: Putative 4		~~~~~	
Query	71401	ACAGGGCATGCTACTGGGCATAGAGCATATATTTAATAACATTGCTGCTTACTCATTG	71460
Sbjct	71401	ACAGGGCATGCTACTGGGCATAGAGCATATATTTAATAA ACATTGCTGCTTACTCATTG	71460
CDS:Bruton's tyrosin		~~~~~	
		19F	
CDS: Putative 4		~~~~~	
Query	71461	CATTTCCCTTGAATTCTGGATTCTAGCCACTCTAACACTTTACTTTTCTTTGGTTT	71520
Sbjct	71461	C ATTTCCCTTGAATTCTGGATTCTAGCCACTCTAACACTTTACTTTTCTTTGGTTT	71520
CDS:Bruton's tyrosin		~~~~~	
CDS: Putative 4	637	K A D E R P T F K I L L S N I L D V M D	
Query	71521	AAAGCAGATGAGCGTCCCACTTTCAAATTTCTCTGAGCAATATTCTAGATGTCATGGAT	71580
Sbjct	71521	AAAGCAGATGAGCGTCCCACTTTCAAATTTCTCTGAGCAATATTCTAGATGTCATGGAT	71580
CDS:Bruton's tyrosin	637	K A D E R P T F K I L L S N I L D V M D	
CDS: Putative 4	657	E E S *	
Query	71581	GAAGAATCCTGAGCTCGCCAATAAGCTTCTTGGTTCTACTTCTCTTCTCCACAAGCCCCA	71640
Sbjct	71581	GAAGAATCCTGAGCTCGCCAATAAGCTTCTTGGTTCTACTTCTCTTCTCCACAAGCCCCA	71640
CDS:Bruton's tyrosin	657	E E S	
Query	71641	ATTTCACTTTCTCAGAGGAAATCCCAAGCTTAGGAGCCCTGGAGCCTTTGTGCTCCCACT	71700
Sbjct	71641	ATTTCACTTTCTCAGAGGAAATCCCAAGCTTAGGAGCCCTGGAGCCTTTGTGCTCCCACT	71700
Query	71701	CAATACAAAAAGGCCCTCTCTACATCTGGGAATGCACCTCTTCTTTGATTCCCTGGGAT	71760
Sbjct	71701	CAATACAAAAAGGCCCTCTCTACATCTGGGAATGCACCTCTTCTTTGATTCCCTGGGAT	71760
Query	71761	AGTGGCTTCTGAGCAAAGGCCAAGAAATATTGTGCTGAAATTTCCCGAGAGAATTAAG	71820
Sbjct	71761	AGTGGCTTCTGAGCAAAGGCCAAGAAATATTGTGCTGAAATTTCCCGAGAGAATTAAG	71820
Query	71821	ACAGACTGAATTTGCGATGAAAAATATTTTATAGGAGGAGGATGTAAATAGCCGCACAAA	71880
Sbjct	71821	ACAGACTGAATTTGCGATGAAAAATATTTTATAGGAGGAGGATGTAAATAGCCGCACAAA	71880
Query	71881	GGGGTCCAACAGCTCTTTGAGTAGGCATTTGGTAGAGCTTgggggtgtgtgtgtgggggt	71940
Sbjct	71881	GGGGTCCAACAGCTCTTTGAGTAGGCATTTGGTAGAGCTTGGGGGTGTGTGTGGGGGT	71940

Query	71941	gGACCGAATTTGGCAAGAATGAAATGGTGTGCATAAAGATGGGAGGGGAGGGTGTGTTTGAT	72000
Sbjct	71941	GGACCGAATTTGGCAAGAATGAAATGGTGTGCATAAAGATGGGAGGGGAGGGTGTGTTTGAT	72000
Query	72001	AAAAATAAAATTACTAGAAAGCTTGAAAGTCTTTGGTATCTCTATTAATCATGCAGCCTCC	72060
Sbjct	72001	AAAAATAAAATTACTAGAAAGCTTGAAAGTCTTTGGTATCTCTATTAATCATGCAGCCTCC	72060
Query	72061	CTGAAGCGCCCTATCTCAGTATTCAGAAAGCTGCTGTGTAGCATTAGTTTGGCATATTC	72120
Sbjct	72061	CTGAAGCGCCCTATCTCAGTATTCAGAAAGCTGCTGTGTAGCATTAGTTTGGCATATTC	72120
Query	72121	CTACACTGAGAACTCGACAGGATCCTCCAGGTTTAAGCCCTCTTGTTAACTCCTGCCTCT	72180
Sbjct	72121	CTACACTGAGAACTCGACAGGATCCTCCAGGTTTAAGCCCTCTTGTTAACTCCTGCCTCT	72180

Phụ lục 5

TRÌNH TỰ MỖI PHẦN ỨNG PCR MỖI ĐƠN

Đoạn	Tên	Mỗi xuôi (sense)	Tên	Mỗi ngược (antisene)
X1	E1F	AAGACATTGGTTTAGGTCAGGA	E1R	AGCCATGCTGTCTCTCTGGT
X2	E2F	GAAACTAGGTAGCTAGGCTGA	E2R	AAGAAAGATCTAAGGCCAAGTC
	E3F	CCTGGTGCCACCTCACTTTG	E3R	CATCACCAGTCTATTTACAGAG
X3	E4F	AAAGGCTTCTAGTACCTAAGGA	E4R	ACCCCTTCTAATTGTGTTACAG
	E5F	AGTACTTTCAAGGTCTTTCTCC	E5R	CCTTTCCTTCTTTCTTTGGAAAC
X4	E6F	AAAACATGCAAATGGTGGCTTC	E6R	ACCCTTGGGAGAGTGATGGA
	E7F	TCCCTGACCAAACCTGTCCTT	E7R	AGTGTGTTCTTAGGGCTTGAC
X5	E8F	GTAAGCCAGAGAGTTGGGAGA	E8R	GGGAATTATGCCGCAGCACT
	E9F	GGCATATGAATCTGTCTCCTG	E9R	AGAGAGAGTTCCTCCTGGAAG
X6	E10F	GGGTGCTGTAACCTCCAATC	E10R	GAACAGGCCCTCAGTTCAAG
	E11F	CAAGCGTGGAACCTGGCAGTA	E12R	CTCTTATCACCTTGTCTGTCAT
	E13F	AAGTGAGGATGTGTGAGGCAT	E13R	CCACCCTCACCCAGAGAAAT
X7	E14F	TCCTATTCTACCCAGTAGG	E14R	CTTTAAGCCTCAGTGGGTTGT
	E15F	GATGCTCTACTCCTAGGTCAG	E15R	ATATCTTCCACTGCTACTCCA
X8	E16F	GCTTTGTGCCTTTAACCTCTG	E16R	CTGTAACACCTACCCATGTTTC
	E17F	TTGTGACACTCTTGTGACCGT	E17R	TGTGGAGGTTGCAAAGTGTGA
	E18F	TGTTCTAGGGAGACTGGTCC	E18R	CAGTCTTTGGTGGCTGAATGG
X9	E19F	ACATTTGCTGCTTACTCATTGC	E19R	CTTCAGGGAGGCTGCATGAT

THÀNH PHẦN PHẦN ỨNG PCR MỖI ĐƠN

Thành phần phản ứng	Thể tích (μl)
Bigdye v3.1	2
5X buffer	4
Mỗi xuôi/mỗi ngược 10 μM	1
H ₂ O	12
Sản phẩm PCR tinh sạch	1
Tổng thể tích	20

Asscess number của gen **BTK** là: U78027.1.

Phụ lục 6

PHƯƠNG PHÁP MLPA

Bước 1: Biến tính sợi ADN (Denaturation).

Bước 2: Lai các đầu dò (Hybridization):

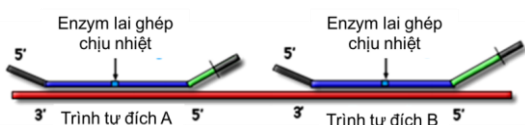
Hỗn hợp đầu dò MLPA sẽ được thêm vào mẫu ADN đã được biến tính.

Hai phần của đầu dò sẽ được bắt cặp với trình tự đích.



Bước 3: Ghép nối

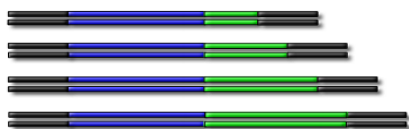
Các đầu dò sẽ được ghép nối nhờ enzyme lai ghép chịu nhiệt.



Bước 4: Khuếch đại

Một cặp mồi duy nhất sẽ được sử dụng để khuếch đại tất cả các đầu dò đã được ghép nối.

Mỗi sản phẩm khuếch đại của các đầu dò có độ lớn khác nhau và không trùng với nhau (130 480 bp).



- Quy trình:

+ Biến tính và lai các đầu dò:

Lấy 5 µl ADN (50- 200 ng ADN) cho vào ống PCR 0,2 ml.

Ủ mẫu theo chu trình 98°C trong 5 phút, sau đó đợi mẫu giảm nhiệt độ xuống 25°C.

Thêm 1,5 µl dung dịch SALSA probemix và 1,5 µl dung dịch MLPA buffer vào mỗi tube và trộn đều.

Ủ mẫu theo chu trình

95°C 1 phút

60°C 16 giờ

+ Phản ứng ghép nối:

Giảm nhiệt độ mẫu xuống 54°C. Trong khi nhiệt độ của mẫu 54°C, thêm 32 µl dung dịch Ligase-65 và trộn đều.

Ủ 15 phút ở 54°C, sau đó ủ 15 phút ở 98°C.

Pha dung dịch Ligation: Pha 3 µl dung dịch Ligase-65 buffer A, 3 µl dung dịch Ligase-65 buffer B, 25 µl nước dH₂O, 1 µl dung dịch Ligase-65 (brown cap) và trộn đều.

+ Phản ứng PCR:

Trộn hỗn hợp mới: 4 µl dung dịch SALSA PCR buffer + 26 µl water + 10 µl sản phẩm của phản ứng ghép nối trên.

Pha hỗn hợp dung dịch Polymerase: 2 µl dung dịch SALSA PCR-primers + 2 µl dung dịch SALSA Enzyme Dilution buffer + 5,5 µl dH₂O + 0.5 µl SALSA Polymerase.

Đặt mẫu vào máy gia nhiệt ở nhiệt độ 60°C, thêm 10 µl hỗn hợp Polymerase vào mỗi tube, sau đó trộn đều và thực hiện phản ứng PCR.

Chu trình nhiệt:

95°C	30 giây	35 chu kỳ
60°C	30 giây	
72°C	60 giây	
72°C	20 phút	

Chuyển các mẫu vào rack 96 giếng dùng cho máy 3130 Genetic Analyser.

Đặt tên các mẫu, phương pháp phân tích.

Chọn chương trình Fragment.

Chạy mẫu.

Phụ lục 7

KẾT QUẢ TÁCH ADN TỔNG SỐ CỦA 31 BỆNH NHÂN

Stt	Mã số BN	Họ và tên	Năm sinh	Nồng độ ADN (ng/ μ l)	Độ tinh sạch (A_{260}/A_{280})
1	XLA-01	Nguyễn A	2012	56	1,9
2	XLA-02	Hồ Nam P	2011	44	1,8
3	XLA-03	Phùng Minh H	2010	66	1,85
4	XLA-04	Lê Khải A	2011	46	1,95
5	XLA-05	Hoàng Duy A	2011	45	1,8
6	XLA-06	Nguyễn Tiến Đ	2003	65	1,9
7	XLA-07	Nguyễn Xuân L	2013	35	1,9
8	XLA-08	Đỗ Đại D	2011	44	2,0
9	XLA-09	Đỗ Gia H	2012	48	2,0
10	XLA-10	Đỗ Văn N	2014	54	1,9
11	XLA-11	Nguyễn Hoàng H	2015	36	1,8
12	XLA-12	Đường Minh P	2001	48	1,9
13	XLA-13	Đỗ Đình D	2011	66	1,85
14	XLA-14	Nghiêm Xuân H	2010	55	1,95
15	XLA-15	Vũ Nguyên K	2008	38	1,9
16	XLA-16	Cao Viết Á	2011	55	1,8
17	XLA-17	Nguyễn Duy H	2008	34	1,9
18	XLA-18	Phạm Văn Đ	2015	42	1,9
19	XLA-19	Lê Việt B	2016	35	1,9
20	XLA-20	Nguyễn Gia B	2005	45	2,0
21	XLA-21	Trình Công H	2006	46	2,0

22	XLA-22	Đoàn Đình Gia B	2013	23	2,8
23	XLA-23	Vũ Đăng K	2010	28	1,9
24	XLA-24	Vũ Đức P	2013	75	1,9
25	XLA-25	Trần Công H	2012	49	2,0
26	XLA-26	Mai Quang V	2014	35	1,9
27	XLA-27	Mai Xuân P	2016	33	1,8
28	XLA-28	Bùi Văn Q	2008	78	2,0
29	XLA-29	Vũ Văn H	2004	54	1,9
30	XLA-30	Lê Tuấn A	2011	56	1,9
31	XLA-31	Lò Văn T	2008	38	2.0

Phụ Lục 8

DANH SÁCH ĐỘT BIẾN GEN CỦA 31 BỆNH NHÂN

Mã số BN	Phân tích gen của bệnh nhân			
	c.DNA	Protein	Dạng đột biến	Vị trí
XLA-01	c.1735G>C	p.Asp579His	Sai nghĩa	Exon 17
XLA-02	c.1908+2_11delinsC	p.IVS18+2_11delinsC	Vị trí cắt, nối	Intron 18
XLA-03	c.752G>A	p.Trp251Ter	Vô nghĩa	Exon 8
XLA-04	c.117_119del	p.Tyr39Tyrfs*	Dịch khung	Exon 2
XLA-05	c.521-1G>A	p.IVS6-1G>A	Vị trí cắt, nối	Intron 6
XLA-06	c.37C>T	p.Arg13Ter	Vô nghĩa	Exon 2
XLA-07	c.1876delG	p.Ala582Leufs*5	Dịch khung	Exon 17
XLA-08	c.1768A>T	p.Ile590Phe	Sai nghĩa	Exon 18
XLA-09	Không tìm thấy đột biến			
XLA-10	Không tìm thấy đột biến			
XLA-11	c.763C>T	p.Arg255Ter	Vô nghĩa	Exon 8
XLA-12	c.1782delG	p.Gly594Glyfs*52	Dịch khung	Exon 18
XLA-13	c.1714_1715insTA	p.Ser572Ilefs*15	Dịch khung	Exon 17
XLA-14	c.1657delA	p.Ser553Alafs*3	Dịch khung	Exon 17
XLA-15	c.1610delT	p.Val537Aspfs*2	Dịch khung	Exon 16
XLA-16	c.1908+2_11delinsC	p.IVS18+2_11delinsC	Vị trí cắt, nối	Intron 18
XLA-17	c.953C>T	p.Ser318Phe	Sai nghĩa	Exon 11
XLA-18	c.843G>A	p.Trp281Ter	Vô nghĩa	Exon 10
XLA-19	c.1578_1581del	p.Cys527Trpfs*2	Dịch khung	Exon 16
XLA-20	Không tìm thấy đột biến			
XLA-21	c.1249A>T	p.Lys417Ter	Vô nghĩa	exon 14
XLA-22	c.649+5G>C	p.IVS11+5G>C	Vị trí cắt, nối	Intron 11
XLA-23	c.118T>G	p.Tyr40Asp	Sai nghĩa	Exon 2
XLA-24	c.628insA	p.Pro210Thrfs*6	Dịch khung	Exon 8
XLA-25	c.1651T>A	p.Tyr551Asn	Sai nghĩa	Exon 17
XLA-26	Mất đoạn exon 2-5		Mất đoạn	Exon 2-5
XLA-27	Mất đoạn exon 2-5		Mất đoạn	Exon 2-5
XLA-28	c.862C>T	p.Arg288Trp	Sai nghĩa	Exon 10
XLA-29	c.456delT	p.Tyr152Tyrfs*19	Dịch khung	Exon 6
XLA-30	Không tìm thấy đột biến			
XLA-31	c.753G>A	p.Trp251Ter	Vô nghĩa	exon 8

Phụ lục 9

DANH SÁCH MẸ VÀ CHỊ EM GÁI BỆNH NHÂN XLA

Stt	Labcode	Họ và tên	Đột biến	Tiền sử
1	XLA-01M	Nguyễn Thị Nhung	Dị hợp tử đột biến p.Asp579His	Mẹ của bệnh nhân Nguyễn Anh (XLA-01)
2	XLA-01S	Nguyễn Thị Thu An	Dị hợp tử đột biến p.Asp579His	Chị của bệnh nhân Nguyễn Anh (XLA-01)
3	XLA-02M	Nguyễn Thị Long	Dị hợp tử đột biến p.IVS18+2delTAAGTGCTTinsC	Mẹ của bệnh nhân Hồ Nam Phong (XLA-02)
4	XLA-03M	Vũ Thị Thuỳ Dương	Không phát hiện đột biến gene BTK	Mẹ của bệnh nhân Phùng Minh Hiếu (XLA-03)
5	XLA-04M	Bùi Hương Giang	Dị hợp tử đột biến p.Tyr39Tyrfs*	Mẹ của bệnh nhân Lê Khải Anh (XLA-04)
6	XLA-05M	Hoàng Thị Thuỷ	Dị hợp tử đột biến p.IVS6-1G>A	Mẹ của bệnh nhân Hoàng Duy Anh (XLA-05)
7	XLA-06M	Lương Thị Thu Hà	Dị hợp tử đột biến p.Arg13Ter	Mẹ của bệnh nhân Nguyễn Tiến Đạt (XLA-06)
8	XLA-07M	Nguyễn Thị Huyền	Dị hợp tử đột biến p.Ala582Leufs*5	Mẹ của bệnh nhân Nguyễn Xuân Long (XLA-07)
9	XLA-08M	Nguyễn Thị Hường	Dị hợp tử đột biến p.Ile590Phe	Mẹ của bệnh nhân Đỗ Đại Dương (XLA-08)
10	XLA-11M	Phan Thị Phụng	Dị hợp tử đột biến p.Arg255Ter	Mẹ của bệnh nhân Nguyễn Hoàng Hải (XLA-11)
11	XLA-12M	Lê Thị Bích Ngọc	Dị hợp tử đột biến p.K595RfsX52	Mẹ của bệnh nhân Đường Minh Phúc (XLA-12)
12	XLA-12S	Đường Nam Khanh	Dị hợp tử đột biến p.K595RfsX52	Chị của bệnh nhân Đường Minh Phúc (XLA-12)

13	XLA-13M	Đinh Thị Ánh Nguyệt	Dị hợp tử đột biến p.S572fsX15	Mẹ của bệnh nhân của Đỗ Đình Duy (XLA-13)
14	XLA-14M	Phan Thị Thu	Dị hợp tử đột biến p.S553AfsX3	Mẹ của bệnh nhân Nghiêm Xuân Huy (XLA-14)
15	XLA-15M	Nguyễn Thị Thơ	Dị hợp tử đột biến p.V537DfsX2	Mẹ của bệnh nhân Vũ Nguyên Khôi (XLA-15)
16	XLA-15S	Vũ Thị Thanh Huyền	Không phát hiện đột biến gene BTK	Chị của bệnh nhân Vũ Nguyên Khôi (XLA-15)
17	XLA-16M	Võ Thị Phúc	Dị hợp tử đột biến p.IVS18+2delTAAGTGCTTTinsC	Mẹ của bệnh nhân Cao Viết Ánh (XLA-16)
18	XLA-17M	Mai Thị Oanh	Dị hợp tử đột biến p.Ser318Phe	Mẹ của bệnh nhân Nguyễn Duy Hoàng (XLA-17)
19	XLA-18M	Phạm Thị Lan	Không phát hiện đột biến gene BTK	Mẹ của bệnh nhân Phạm Văn Đông (XLA-18)
20	XLA-19M	Nguyễn Thị Nhân	Dị hợp tử đột biến p.C527WfsX2	Mẹ của bệnh nhân Lê Việt Bách (XLA-19)
21	XLA-21M	Mai Thị Thu Loan	Dị hợp tử đột biến p.Lys417Ter	Mẹ của bệnh nhân Trình Công Hải (XLA-21)
22	XLA-22M	Đinh Thị Thuỳ Linh	Dị hợp tử đột biến p.IVS11+5G>C	Mẹ của bệnh nhân Đoàn Đình Gia Bảo (XLA-22)
23	XLA-22S	Đoàn Ngọc Bảo Chi	Không phát hiện đột biến gene BTK	Chị của bệnh nhân Đoàn Đình Gia Bảo (XLA-22)
24	XLA-23M	Trịnh Thị Hồng Nhung	Dị hợp tử đột biến p.Tyr40Asp	Mẹ của bệnh nhân Vũ Đăng Khoa (XLA-23)
25	XLA-23S	Vũ Ngọc Bích	Dị hợp tử đột biến p.Tyr40Asp	Chị của bệnh nhân Vũ Đăng Khoa (XLA-23)
26	XLA-24M	Trần Thị Ngọc	Dị hợp tử đột biến p.P210TfsX6	Mẹ của bệnh nhân Vũ Đức Phát (XLA-24)

27	XLA-24S1	Vũ Thị Hồng Xuyên	Không phát hiện đột biến gene BTK	Chị gái của bệnh nhân Vũ Đức Phát (XLA-24)
28	XLA-24S2	Vũ Thanh Hà	Dị hợp tử đột biến p.P210TfsX6	Em gái của bệnh nhân Vũ Đức Phát (XLA-24)
29	XLA-25M	Tô Thị Hồng Hạnh	Dị hợp tử đột biến p.Tyr551Asn	Mẹ của bệnh nhân Trần Công Huân (XLA-25)
30	XLA-26M	Lâm Thị Phương Dung	Dị hợp tử đột biến mất đoạn exon 2-5	Mẹ của bệnh nhân Mai Quang Vinh (XLA-26) và Mai Xuân Phúc (XLA-27)
31	XLA-28M	Nguyễn Thị Hương	Dị hợp tử đột biến p.Arg288Trp	Mẹ của bệnh nhân Bùi Văn Quang (XLA-28)
32	XLA-28S	Bùi Thị Hà	Dị hợp tử đột biến p.Arg288Trp	Chị của bệnh nhân Bùi Văn Quang (XLA-28)
33	XLA-29M	Nguyễn Thị Thương	Dị hợp tử đột biến p.Y152YfsX19	Mẹ của bệnh nhân Vũ Văn Hải (XLA-30)
34	XLA-29S	Vũ Thị Hào	Không phát hiện đột biến gene BTK	Chị của bệnh nhân Vũ Văn Hải (XLA-30)
35	XLA-31M	Lò Thị Nôi	Dị hợp tử đột biến p.Trp251Ter	Mẹ của bệnh nhân Lò Văn Tài (XLA-31)
36	XLA-31S	Lò Thị Ngọc	Dị hợp tử đột biến p.Trp251Ter	Chị của bệnh nhân Lò Văn Tài (XLA-31)

Phụ lục 10

BỆNH ÁN NGHIÊN CỨU