

Đánh giá hiệu quả của xét nghiệm sàng lọc alen *HLA-A*31:01* và *HLA-B*15:02* bằng kỹ thuật multiplex real-time PCR trong giảm nguy cơ dị ứng thuốc Carbamazepine

Võ Thị Ngọc Hảo¹, Chu Văn Sơn¹, Nguyễn Đoàn Thủy², Nguyễn Văn Liệu^{2,3}, Nguyễn Thị Vân Anh^{1*}

¹Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein,
Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

²Khoa Thần kinh - Đột quỵ, Bệnh viện Đa khoa Tâm Anh

³Khoa Thần kinh, Trường Đại học Y Hà Nội

Ngày nhận bài 15/6/2022; ngày chuyển phản biện 20/6/2022; ngày nhận phản biện 11/7/2022; ngày chấp nhận đăng 14/7/2022

Tóm tắt:

Hai đa hình kháng nguyên bạch cầu người *HLA-A*31:01* và *HLA-B*15:02* đã được chứng minh có liên quan chặt chẽ với các phản ứng có hại nghiêm trọng trên da (SCAR) do Carbamazepine (CBZ) gây ra và được khuyến cáo cần phải sàng lọc cho các bệnh nhân trước khi sử dụng CBZ để giảm nguy cơ dị ứng thuốc. Trong nghiên cứu này, các tác giả đã áp dụng xét nghiệm sàng lọc đồng thời *HLA-A*31:01* và *HLA-B*15:02* bằng kỹ thuật multiplex real-time PCR Taqman Locked-nucleic acid (LNA) probe có độ nhạy và độ đặc hiệu cao trên 35 bệnh nhân được chẩn đoán mắc các bệnh lý thần kinh. Trong số 13 bệnh nhân dương tính với một hoặc cả hai alen *HLA-B*15:02* và *HLA-A*31:01* (37,14%) được kê thuốc thay thế cho CBZ và theo dõi các tác dụng phụ, chỉ có 1 bệnh nhân bị phản ứng có hại nhẹ trên da sau 24 ngày dùng Trileptal (Oxcarbazepine) với liều 600 mg/ngày, 12 bệnh nhân còn lại không có biểu hiện dị ứng. Các bệnh nhân âm tính với hai alen này không xuất hiện dị ứng khi chỉ định điều trị bằng CBZ. Khi so sánh với 30 mẫu đối chứng dương tính với một hoặc hai alen này và 21 trường hợp SCAR khi điều trị bằng CBZ (OR=28, 95%CI: 3,15-248,78), kết quả thu được khẳng định sự cần thiết của việc sàng lọc alen *HLA-A*31:01* và *HLA-B*15:02* trước khi sử dụng CBZ trong tư vấn điều trị một số bệnh thần kinh, giúp giảm tỷ lệ SCAR khi thay thế CBZ bằng thuốc khác cho các bệnh nhân dương tính với một trong hai alen này.

Từ khóa: Carbamazepine, *HLA-A*31:01*, *HLA-B*15:02*, multiplex real-time PCR, phản ứng có hại nghiêm trọng trên da (SCAR).

Chỉ số phân loại: 3.5

Đặt vấn đề

CBZ là thuốc đầu tay trong điều trị một số bệnh lý thần kinh như động kinh, đau dây thần kinh sọ não V và rối loạn lưỡng cực, dưới dạng liệu pháp đơn trị liệu hoặc kết hợp điều trị ở cả người lớn và trẻ em. Một trong những điều đáng lo ngại nhất khi sử dụng CBZ là người bệnh sử dụng thuốc có nguy cơ mắc SCAR, bao gồm hội chứng hệ thống tăng bạch cầu ái toan do thuốc (DRESS), hội chứng Stevens-Johnson (SJS) và hoại tử biểu bì nhiễm độc (TEN) được quyết định bởi các yếu tố di truyền khác nhau. Nhiều nghiên cứu trên thế giới đã chỉ ra mối liên quan chặt chẽ giữa những người mang alen kháng nguyên bạch cầu người *HLA-B*15:02* với SJS/TEN do CBZ gây ra ở nhiều quần thể người châu Á và alen *HLA-A*31:01* ở quần thể người châu Âu [1-5]. Để giảm nguy cơ tử vong và gánh nặng bệnh tật do dị ứng thuốc CBZ, năm 2007 Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) đã khuyến cáo kiểm tra sự có mặt của *HLA-B*15:02* trước khi kê đơn CBZ điều trị động kinh cho những bệnh nhân gốc Á. Tổ chức Thực hành lâm sàng dược di truyền (Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium) khuyến cáo bệnh nhân mang

alen *HLA-A*31:01* hoặc *HLA-B*15:02* nên được loại trừ khỏi liệu pháp CBZ. Vai trò của xét nghiệm phát hiện alen *HLA-B*15:02* và *HLA-A*31:01* trước khi điều trị CBZ cho bệnh nhân trong việc phòng chống dị ứng thuốc đã được nhiều nhóm nghiên cứu thực hiện, cụ thể một nghiên cứu được thực hiện với 4.877 bệnh nhân tại Đài Loan (Trung Quốc) cho thấy, sàng lọc alen *HLA-B*15:02* trước khi bắt đầu điều trị với CBZ hiệu quả trong ngăn ngừa SJS/TEN hoàn toàn do CBZ gây ra [2]. Tại Việt Nam, xét nghiệm xác định kiểu gen *HLA-B*15:02* đã được thực hiện tại một số cơ sở y tế, tuy nhiên theo tìm hiểu của chúng tôi, chưa có nghiên cứu nào báo cáo kết quả đánh giá vai trò của xét nghiệm sàng lọc 2 alen *HLA-B*15:02* và *HLA-A*31:01* trong tư vấn điều trị thuốc cho quần thể bệnh nhân động kinh người Việt Nam. Vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng phương pháp multiplex real-time PCR với cặp mồi và đầu dò LNA được thiết kế đặc hiệu với alen *HLA-B*15:02* và *HLA-A*31:01* để sàng lọc đồng thời 2 alen *HLA-B*15:02* và *HLA-A*31:01* ở các bệnh nhân có chỉ định dùng CBZ trước khi bác sỹ lâm sàng kê đơn thuốc điều trị, giúp làm giảm nguy cơ tử vong hoặc các biến chứng do dị ứng thuốc CBZ.

*Tác giả liên hệ: Email: vananhbiolab@gmail.com

Evaluating the effect of screening dual *HLA-A*31:01* and *HLA-B*15:02* alleles by multiplex real-time PCR technique on reducing the risk of Carbamazepine-induced hypersensitivity reactions

Thi Ngoc Hao Vo¹, Van Son Chu¹, Doan Thuy Nguyen², Van Lieu Nguyen^{2,3}, Thi Van Anh Nguyen^{1*}

¹Key Laboratory of Enzyme and Protein Technology, University of Science, Vietnam National University, Hanoi
²Neurology and Stroke Department, Tam Anh General Hospital
³Department of Neurology, Hanoi Medical University

Received 15 June 2022; accepted 14 July 2022

Abstract:

Human leukocyte antigen (HLA) gene polymorphisms *HLA-A*31:01* and *HLA-B*15:02* are strongly associated with Carbamazepine (CBZ)-induced severe cutaneous adverse reactions (SCARs). As a result, it is recommended to screen these two alleles before CBZ therapy to reduce the risk of drug allergy. In this study, the authors applied the simultaneous screening test for *HLA-A*31:01* and *HLA-B*15:02* alleles by multiplex real-time PCR Taqman LNA probe with high sensitivity and specificity in 35 patients that were diagnosed with neurological diseases. Among thirteen patients (37.14% of total) who were positive for single or dual *HLA-B*15:02* and *HLA-A*31:01* alleles were prescribed alternatives to CBZ and monitored for adverse events, only one patient had a mild skin adverse reaction after 24 days using Trileptal (Oxcarbazepine) at a dose of 600 mg/day, 12 patients had no symptoms or allergic reactions. The remaining negative patients showed good tolerance to CBZ therapy without any allergy symptoms. Compared to the data of 30 control samples carrying these one or two alleles and 21 patients exhibiting CBZ-induced severe hypersensitivity reactions (OR=28, 95%CI: 3.15-248.78), these results confirm the importance of screening for *HLA-A*31:01* and *HLA-B*15:02* alleles before using CBZ in neurological diseases treatment to reduce SCAR rates by replacing CBZ with another drug in patients positive for one of these two alleles.

Keywords: Carbamazepine, *HLA-A*31:01*, *HLA-B*15:02*, multiplex real-time PCR, severe cutaneous adverse reactions (SCARs).

Classification number: 3.5

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng

Nghiên cứu được tiến hành trên tổng cộng 35 bệnh nhân nhóm thử nghiệm. Các bệnh nhân được chẩn đoán mắc các bệnh lý thần kinh được thăm khám tại Khoa Thần kinh - Đột quỵ, Bệnh viện Đa khoa Tâm Anh từ tháng 4/2021 đến tháng 4/2022 và được sàng lọc đa hình gen HLA để tư vấn trước khi điều trị thuốc. Các bệnh nhân nhóm thử nghiệm được đưa vào nghiên cứu đánh giá nguy cơ dị ứng do CBZ hoặc Oxcarbazepin phải thỏa mãn đủ các tiêu chuẩn sau: được khám, chẩn đoán bệnh lý thần kinh, có đủ bằng chứng chẩn đoán bệnh trên lâm sàng và cận lâm sàng; có chỉ định điều trị bằng CBZ nếu kết quả sàng lọc không mang alen *HLA-B*15:02* và *HLA-A*31:01* hoặc chỉ định điều trị bằng Oxcarbazepin nếu kết quả sàng lọc dương tính mang alen *HLA-B*15:02* và/hoặc *HLA-A*31:01*; hiện tại, không dùng các thuốc có nguy cơ dị ứng cao và bệnh nhân đồng ý tham gia nghiên cứu. Tiêu chuẩn loại trừ của nhóm thử nghiệm bao gồm: bệnh nhân đã điều trị bằng CBZ, các trường hợp đã xuất hiện tình trạng dị ứng trên lâm sàng trước khi sàng lọc và khởi đầu dùng thuốc; bệnh nhân không đủ xét nghiệm cần thiết cho nghiên cứu; bệnh nhân từ chối tham gia nghiên cứu.

Song song với nhóm thử nghiệm, thông tin của 30 bệnh nhân mang các gen *HLA-B*15:02* và/hoặc *HLA-A*31:01* thuộc nhóm đối chứng được tập hợp để so sánh dữ liệu với nhóm thử nghiệm. Các bệnh nhân này được chẩn đoán mắc các bệnh lý thần kinh được điều trị bằng CBZ dưới 3 tháng và có biểu hiện dị ứng hoặc bệnh nhân dùng CBZ trên 3 tháng và không biểu hiện dị ứng, không dùng các thuốc có nguy cơ dị ứng khác được các bác sỹ theo dõi dị ứng; các bệnh nhân này được thực hiện xét nghiệm sàng lọc 2 alen nêu trên trong quá trình điều trị thuốc (không phải trước khi điều trị thuốc); bệnh nhân đồng ý tham gia nghiên cứu.

Thu nhận mẫu bệnh phẩm

Trước khi điều trị với CBZ, bác sỹ lâm sàng sẽ thu nhận 2-5 ml máu của bệnh nhân. Quá trình xác định kiểu gen *HLA-B*15:02*, *HLA-A*31:01* được thực hiện tại Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein (Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội).

Multiplex real-time PCR sử dụng đầu dò Taqman LNA probe xác định kiểu gen *HLA-A*31:01* và *HLA-B*15:02*

Mẫu máu được xử lý trong vòng 24 giờ kể từ lúc lấy của bệnh nhân. DNA tổng số từ mẫu máu ngoại vi của bệnh nhân được tách chiết bằng bộ QIAamp DNA minikit

(Qiagen, Hilden, Đức) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Kiểu gen *HLA-B*15:02* và *HLA-A*31:01* được xác định bằng phản ứng multiplex real-time PCR sử dụng đầu dò Taqman LNA probe với hệ thống máy PCR LightCycler 96 (Roche Diagnostics, Đức). Phản ứng được thiết kế gồm một cặp mồi và đầu dò oligonucleotide nhân bản đặc hiệu gen *HLA-A*31:01*, *HLA-B*15:02* và gen nội chuẩn *beta-actin* (*ACTB*) để kiểm soát hiện tượng âm tính giả trong phản ứng multiplex real-time PCR. Đầu dò dùng phát hiện alen *HLA-A*31:01* có gắn chất phát huỳnh quang HEX (525/556 nm) và đầu dò phát hiện *HLA-B*15:02* được gắn chất phát huỳnh quang FAM (495/520), cả 2 đầu dò này được thiết kế cải biến theo dạng Taqman LNA probe, một dạng nucleotide đặc biệt có nhiệt độ biến tính cao hơn so với nucleotide thông thường, có thể giúp làm giảm độ dài probe, giảm khoảng cách giữa các dye huỳnh quang quencher và reporter mà vẫn đảm bảo nhiệt động nóng chảy của đầu dò. Từ đó giảm nhiễu và tăng độ nhạy, độ đặc hiệu cho phản ứng multiplex real-time PCR với mục đích phân biệt được alen đích *HLA-A*31:01/HLA-B*15:02* với các biến thể phức tạp của gen HLA phổ biến trong tộc người Kinh và quần thể người Đông Nam Á. Đầu dò gắn đặc hiệu gen *ACTB* được thiết kế có gắn chất phát huỳnh quang Texas Red (590/610 nm). Trình tự mồi và đầu dò được mô tả trong giải pháp hữu ích đã được chấp nhận đơn hợp lệ số 9826w/QĐ-SHTT ngày 17/6/2021 của Cục Sở hữu trí tuệ cho đơn đăng ký sáng chế “Kit để phát hiện gen kháng nguyên bạch cầu người gây dị ứng thuốc điều trị bệnh động kinh *HLA-A*31:01*, *HLA-B*15:02* và quy trình sản xuất kit này” (mã số 1-2021-02498) [6].

Xác định kiểu gen HLA bằng kỹ thuật Sequence-specific oligonucleotide (PCR-SSO)

Kết quả xác định kiểu gen HLA bằng kỹ thuật multiplex real-time PCR được khẳng định lại bằng kỹ thuật PCR-SSO. Kỹ thuật này được thực hiện tại Trung tâm Máu quốc gia, Viện Huyết học - Truyền máu Trung ương sử dụng lifecodes HLA SSO Typing kit (Luminex Technology, Mỹ).

Tư vấn kê đơn thuốc điều trị động kinh

Kết quả xác định kiểu gen *HLA-A*31:01* và *HLA-B*15:02* được gửi tới bác sĩ lâm sàng trong 1-2 ngày kể từ khi nhận được mẫu máu. Sau khi có kết quả sàng lọc gen, ở các trường hợp bệnh nhân dương tính với *HLA-B*15:02* hoặc/ và *HLA-A*31:01* khi các bệnh nhân quay lại tái khám được tư vấn về nguy cơ dị ứng và lựa chọn liệu pháp điều trị với thuốc khác thay thế cho CBZ. Các đối tượng âm tính đồng thời với cả alen *HLA-B*15:02* và *HLA-A*31:01* được tư vấn điều trị bằng CBZ (các bác sĩ vẫn tiến hành tư vấn về

nguy cơ dị ứng). Các bệnh nhân sau khi được kê đơn điều trị tiếp tục theo dõi các triệu chứng phản ứng có hại của thuốc và phải thông báo ngay cho bác sĩ lâm sàng khi xuất hiện các triệu chứng dị ứng.

Phân tích dữ liệu

Số liệu được thu thập và xử lý với biến số định lượng có phân phối chuẩn trình bày giá trị trung bình $\pm$ SD, không phân phối chuẩn sẽ trình bày giá trị trung vị và tỷ lệ phần trăm. Các tiêu chuẩn phân tích, so sánh dựa vào phân bố chuẩn kiểm định T-test hoặc Fisher's exact test.

Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu đã được thông qua Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu y sinh học của Trường Đại học Y Hà Nội (mã số 118/GCN-HDDNCYSH-DHYHN ngày 8/6/2020) và theo đề cương của đề tài mã số 63/19-DTDL.CN-XNT được hội đồng khoa học của Bộ Khoa học và Công nghệ phê duyệt. Nghiên cứu được thực hiện theo đúng các quy định về đạo đức nghiên cứu trong y học. Bệnh nhân được cung cấp đầy đủ thông tin về nghiên cứu, được bảo mật thông tin cá nhân và xác nhận đồng thuận tham gia nghiên cứu.

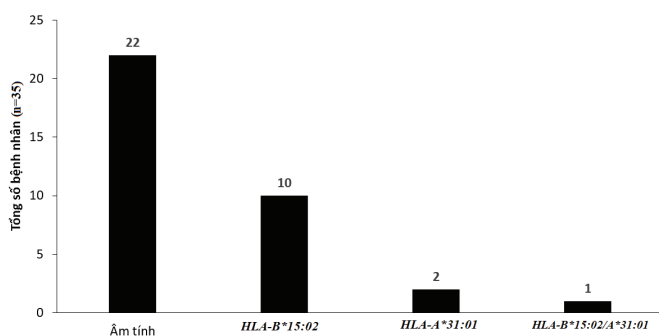
Kết quả

Phân tích đặc điểm lâm sàng của các bệnh nhân nhóm thử nghiệm

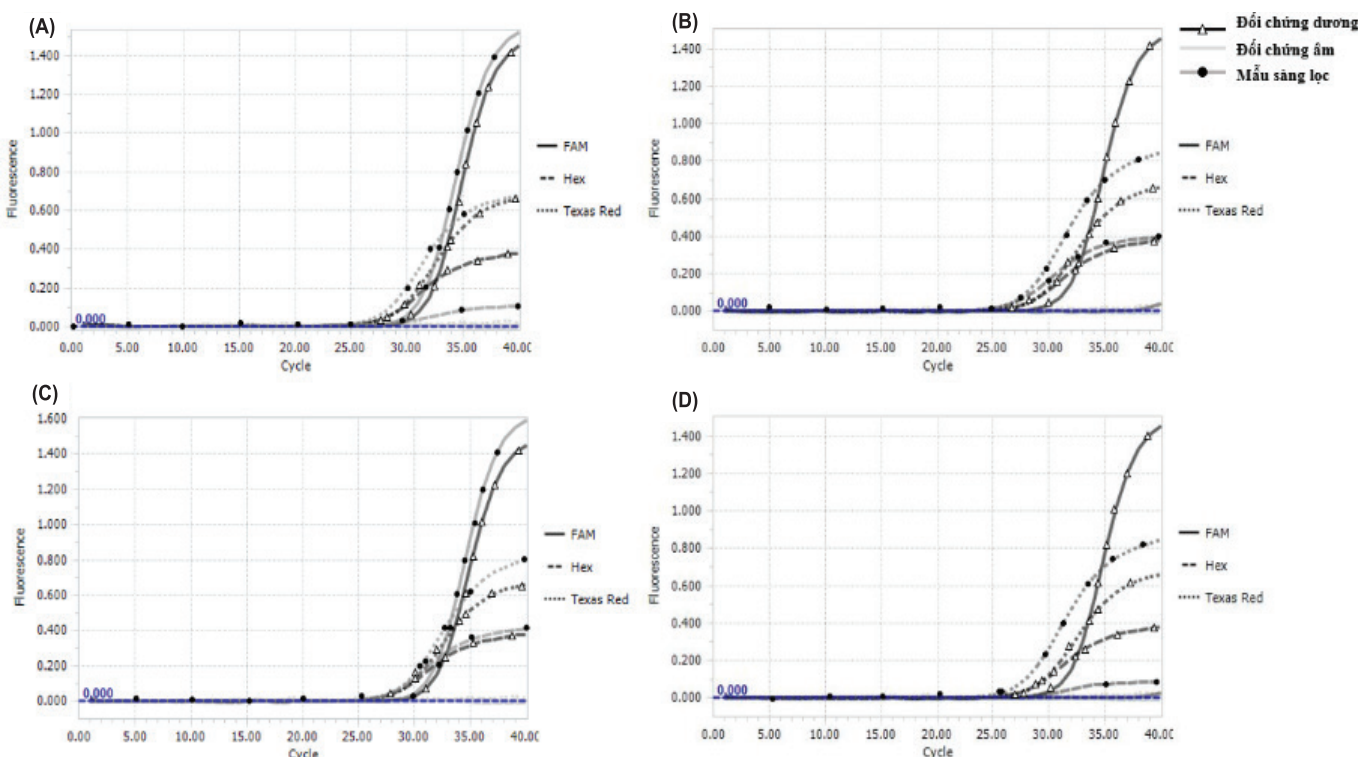
Thông tin tổng hợp về tuổi, giới, bệnh lý thần kinh trên lâm sàng của bệnh nhân nhóm thử nghiệm được mô tả ở bảng 1. Trong 35 bệnh nhân thu thập, tỷ lệ nam (chiếm 57,14%) nhiều hơn nữ, độ tuổi trung bình là 26 tuổi (2-63 tuổi). Phần lớn các đối tượng tham gia nghiên cứu được chẩn đoán động kinh với số lượng 32 bệnh nhân (chiếm 91,43%) và 2 trường hợp đau dây thần kinh tam thoa/dây thần kinh sọ não V (chiếm 5,71%), còn lại 1 trường hợp chẩn đoán bệnh thần kinh khác (2,86%) (bảng 1).

Bảng 1. Đặc điểm lâm sàng các bệnh nhân nhóm thử nghiệm.

Đặc điểm	Tổng số bệnh nhân (n=35)
Tuổi trung bình (nhỏ nhất - lớn nhất)	26 (2-63)
Giới tính	
Nam	20 (57,14%)
Nữ	15 (42,86%)
Chẩn đoán lâm sàng	
Động kinh	32 (91,43%)
Đau dây thần kinh sọ não V (đau dây thần kinh tam thoa)	2 (5,71%)
Bệnh thần kinh khác	1 (2,86%)



Hình 1. Kết quả sàng lọc alen *HLA-A*31:01* và *HLA-B*15:02* ở bệnh nhân nhóm thử nghiệm.



Hình 2. Đường biểu diễn tín hiệu kết quả multiplex real-time PCR ở các mẫu bệnh nhân nhóm thử nghiệm. (A) Dương tính với *HLA-B*15:02*; (B) Dương tính với *HLA-A*31:01*; (C) Dương tính với cả 2 alen; (D) Âm tính với cả 2 alen.

Xác định kiểu gen *HLA-B*15:02* và *HLA-A*31:01* ở bệnh nhân nhóm thử nghiệm bằng kỹ thuật multiplex real-time PCR sử dụng dụng cụ đầu dò Taqman LNA probe

Xét nghiệm sàng lọc kiểu gen *HLA-A*31:01* và *HLA-B*15:02* được thực hiện trên 35 bệnh nhân đưa vào nghiên cứu. Kết quả ghi nhận có 13 (37,14%) bệnh nhân được phát hiện mang các alen *HLA-B*15:02* (28,57%), *HLA-A*31:01* (5,71%) hay dương tính cả 2 alen (2,86%) và có 22 (62,86%) trường hợp âm tính (hình 1). Kết quả đường tín hiệu huỳnh quang sàng lọc 2 alen trên một số mẫu đại diện được thể hiện ở hình 2. Mẫu bệnh nhân dương

tính với alen *HLA-B*15:02* cho tín hiệu khuếch đại gen đích *HLA-B*15:02* (FAM) và gen nội chuẩn *ACTB* (Texas Red) (hình 2A), bệnh nhân dương tính với alen *HLA-A*31:01* cho tín hiệu khuếch đại gen đích *HLA-A*31:01* (HEX) và gen nội chuẩn *ACTB* (Texas Red) (hình 2B), bệnh nhân dương tính với cả 2 alen *HLA-A*31:01* và *HLA-B*15:02* cho tín hiệu khuếch đại FAM, HEX và Texas Red rõ ràng (hình 2C), bệnh nhân âm tính chỉ mang tín hiệu khuếch đại Texas Red của gen nội chuẩn *ACTB* (hình 2D).

Song song với nhóm bệnh nhân thử nghiệm, chúng tôi đã tiến hành sàng lọc các alen *HLA-B*15:02* và *HLA-A*31:01* bằng phương pháp multiplex real-time PCR ở 30 bệnh nhân thuộc nhóm đối chứng. Kết quả cho thấy, có 24 (chiếm 80%) trường hợp mang alen *HLA-B*15:02*, 5 (chiếm 16,67%) trường hợp mang alen *HLA-A*31:01* và 1 (chiếm 3,33%) trường hợp mang đồng thời 2 alen *HLA-B*15:02* và *HLA-A*31:01* (phụ lục 1, 2).

Bên cạnh kết quả sàng lọc bằng phương pháp multiplex real-time PCR, chúng tôi đã tiến hành xác định kiểu gen HLA của 18 mẫu bệnh nhân bằng phương pháp tham chiếu

Phụ lục 1. Kết quả multiplex real-time PCR và PCR-SSO trong sàng lọc alen *HLA-B*15:02*, *HLA-A*31:01* ở một số mẫu bệnh nhân nhóm thử nghiệm (n=18).

STT	Mã mẫu	Kết quả multiplex real-time PCR (chu kỳ ngưỡng - C _t)			Kết luận	PCR-SSO	
		<i>FAM B1502</i>	<i>HEX A3101</i>	<i>TEXAS ACTB</i>		<i>Locus A</i>	<i>Locus B</i>
1	NTL.TV01	-	-	26,33	Âm tính	11:01/11:02	38:02/46:01
2	TQL.TV03	-	-	26,57	Âm tính	24:02/29:01	07:05/52:01
3	DDH.TV04	23,32	-	28,19	Dương tính B15:02	11:01/24:02	15:02/15:25
4	NTL.TV08	25,38	-	25,96	Dương tính B15:02	02:01/24:02	15:02/46:01
5	LHV.TV09	-	-	25,41	Âm tính	02:03/02:03	15:25/46:01
6	PQM.TV13	-	-	26,58	Âm tính	02:06/24:07	15:01/44:03
7	PDLT.TV15	-	-	25,06	Âm tính	11:01/24:07	15:01/51:01
8	TKT.TV17	26,69	-	25,81	Dương tính B15:02	11:01/24:02	15:02/15:02
9	HHQ.TV18	29,31	-	27,22	Dương tính B15:02	02:03/29:01	15:02/58:01
10	NBN.TV21	-	-	23,44	Âm tính	02:03/24:02	18:02/46:01
11	ĐTH.TV22	-	-	24,42	Âm tính	11:01/24:07	35:05/51:01
12	TĐT.TV23	-	-	26,13	Âm tính	02:01/24:02	35:05/46:01
13	NTV.TV29	30,13	28,03	28,00	Dương tính B15:02/A31:01	11:01/31:01	15:02/51:02
14	PKV.TV32	-	27,05	26,89	Dương tính A31:01	11:01/31:01	13:01/40:01
15	MTL.TV33	-	-	25,00	Âm tính	02:03/11:01	54:01/55:02
16	NTH.TV34	-	-	26,11	Âm tính	01:01/24:02	27:04/55:02
17	LTT.TV35	-	-	27,87	Âm tính	01:01/33:01	38:02/57:01
18	TMT.TV36	-	-	27,20	Âm tính	29:01/33:01	07:05/58:01

Phụ lục 2. Kết quả multiplex real-time PCR (n=30) và PCR-SSO (n=14) trong sàng lọc alen *HLA-B*15:02*, *HLA-A*31:01* ở các mẫu bệnh nhân nhóm đối chứng.

STT	Mã mẫu	Kết quả multiplex real-time PCR (chu kỳ ngưỡng - C _t)			Kết luận	PCR-SSO	
		<i>FAM B1502</i>	<i>HEX A3101</i>	<i>TEXAS ACTB</i>		<i>Locus A</i>	<i>Locus B</i>
1	HLA/CA 19.04	-	26,15	24,25	Dương tính A31:01		
2	HLA/CA 19.08	18,32	-	20,94	Dương tính B15:02		
3	HLA/CA 19.13	19,55	-	21,86	Dương tính B15:02		
4	HLA/CA 19.14	20,08	-	23,09	Dương tính B15:02		
5	HLA/CA 19.17	20,01	-	23,0	Dương tính B15:02		
6	HLA/CA 19.21	-	26,91	25,22	Dương tính A31:01		
7	HLA/CA 19.22	21,06	-	24,94	Dương tính B15:02		
8	HLA/CA 19.25	23,07	-	23,41	Dương tính B15:02	02:01/11:01	15:02/15:11
9	HLA/NP 19.28	-	25,89	24,9	Dương tính A31:01	11:02/31:01	35:03/40:02
10	HLA/NP 20.29	30,74	-	32,72	Dương tính B15:02	24:02/33:03	15:02/58:01
11	HLA/NP 20.32	24,12	-	24,03	Dương tính B15:02	02:03/11:01	15:02/27:04
12	HLA/NP 20.33	24,72	-	24,32	Dương tính B15:02	02:06/11:02	15:02/40:01
13	HLA/NP 20.36	22,42	-	25,15	Dương tính B15:02	11:02/24:07	15:02/15:02
14	HLA/CA 20.46	21,89	-	24,77	Dương tính B15:02	02:01/33:03	15:02/58:01
15	HLA/DP 20.51	22,58	22,56	25,7	Dương tính A31:01/B15:02	02:01/31:01	15:02/15:18
16	HLA/DP 20.55	24,38	-	26,84	Dương tính B15:02		
17	HLA/DP 20.56	24,36	-	27,26	Dương tính B15:02	02:03/02:06	15:02/51:01
18	HLA/DP 20.59	-	25,58	27,55	Dương tính A31:01	31:01/68:01	51:01/51:02
19	HLA/DP 20.61	25,3	-	26,32	Dương tính B15:02		
20	HLA/DP 20.62	21,84	-	25,32	Dương tính B15:02		
21	HLA/DP 20.67	25,85	-	26,5	Dương tính B15:02	02:01/11:01	15:02/46:01
22	HLA/DP 20.73	24,32	-	24,85	Dương tính B15:02		
23	HLA/DP 20.77	27,57	-	25,44	Dương tính B15:02	11:01/24:07	15:02/15:25
24	HLA/DP 20.80	28,37	-	25,73	Dương tính B15:02		
25	HLA/DP 21.92	28,19	-	25,61	Dương tính B15:02	02:01/02:01	15:02/15:25
26	HLA/DP 21.93	28,66	-	25,19	Dương tính B15:02	02:03/11:01	15:02/56:04
27	HLA/DP 21.94	-	24,55	25,49	Dương tính A31:01		
28	HLA/DP 21.96	30,5	-	27,15	Dương tính B15:02		
29	HLA/DP 22.98	27,01	-	25,49	Dương tính B15:02		
30	HLA/DP 22.107	29,88	-	27,48	Dương tính B15:02		

Chú thích: -: không có tín hiệu, tương đương với giá trị C_t=0.

PCR-SSO sử dụng bộ kit LIFECODES HLA SSO Typing kit (Luminex Technology). Ở nhóm đối chứng, chúng tôi chỉ có điều kiện thực hiện phân tích 14/30 mẫu bằng kỹ thuật PCR-SSO sử dụng bộ kit LIFECODES HLA SSO Typing kit (Luminex Technology) để kiểm tra khẳng định lại kết quả. Kết quả thể hiện ở bảng 2 đã cho thấy sự tương đồng của 2 phương pháp là 100%.

Bảng 2. Kết quả multiplex real-time PCR và PCR-SSO trong sàng lọc alen *HLA-B*15:02*, *HLA-A*31:01* ở một số mẫu bệnh nhân nhóm thử nghiệm (n=18) và nhóm đối chứng (n=14).

Nhóm thử nghiệm (n=18)				Nhóm đối chứng (n=14)			
PCR-SSO	Multiplex real-time PCR		Tổng cộng	PCR-SSO	Multiplex real-time PCR		Tổng cộng
	+	-			+	-	
+	6	0	6	+	14	0	14
-	0	12	12	-	0	0	0
Tổng cộng	6	12	18	Tổng cộng	14	0	14

Chú thích: +: dương tính với alen *HLA-A*31:01* hoặc/và *HLA-B*15:02*; -: không mang 2 alen *HLA-A*31:01* và *HLA-B*15:02*; độ đặc hiệu: 100%.

Tất cả những trường hợp có kết quả sàng lọc dương tính với alen *HLA-B*15:02* và *HLA-A*31:01* đã được tư vấn về nguy cơ dị ứng do CBZ gây ra và chỉ định các thuốc điều trị thay thế ở dạng đơn điều trị hoặc kết hợp điều trị. Thuốc thay thế ở dạng đơn điều trị và kết hợp điều trị bao gồm: Trileptal, Lamotrigine, Depakine, Levetiracetam và Topamax. Với các bệnh nhân có kết quả sàng lọc gen âm tính, sau khi quay lại tái khám được các bác sỹ tư vấn và tiến hành kê đơn điều trị với CBZ (Tegretol). Tất cả các bệnh nhân đều được theo dõi, thăm hỏi tình trạng sức khỏe, các trường hợp bệnh nhân có xuất hiện dị ứng sau khi dùng thuốc được yêu cầu dừng thuốc và tái khám.

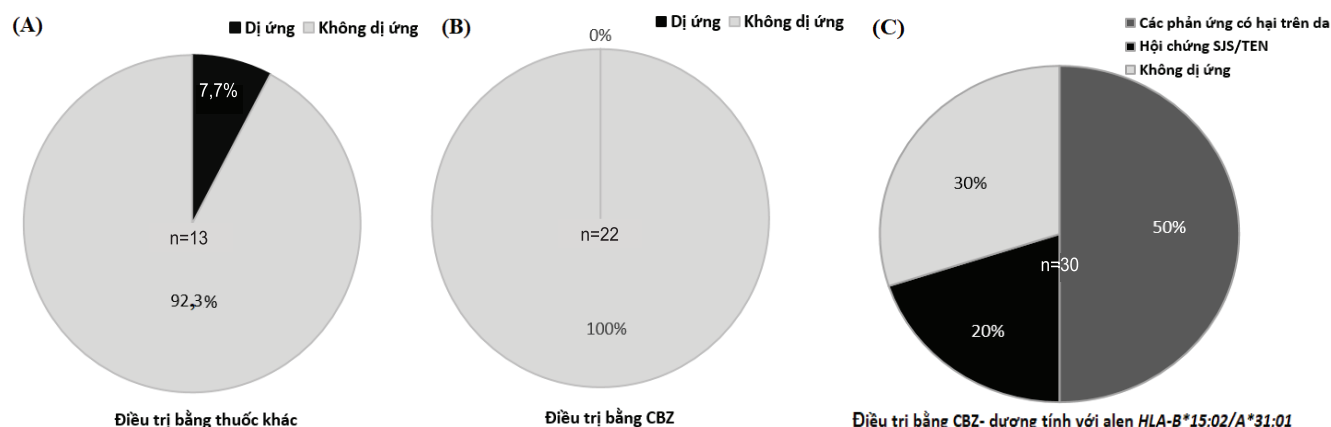
Tỷ lệ xuất hiện SCAR ở nhóm thử nghiệm sau khi được tư vấn điều trị dùng thuốc so sánh với nhóm đối chứng

Sau khi tiến hành kê đơn điều trị dựa trên các kết quả chẩn đoán lâm sàng và sàng lọc gen, chúng tôi tiếp tục theo

dõi sự xuất hiện dị ứng ở các bệnh nhân nhóm thử nghiệm nếu có. Trong tổng số 13 trường hợp dương tính với các alen *HLA-B*15:02* và *HLA-A*31:01* được kê đơn điều trị bằng thuốc thay thế, có 1 bệnh nhân xuất hiện tình trạng dị ứng với các phản ứng trên da ở thể nhẹ và 12 (92,3%) trường hợp dương tính còn lại không xuất hiện dị ứng (hình 3A). Cụ thể, bệnh nhân này sàng lọc mang alen *HLA-B*15:02* được chỉ định điều trị bằng Trileptal (Oxcarbazepine, 600 mg/ngày) xuất hiện mẩn ngứa tay, chân, bụng, không gây loét ở ngày điều trị thứ 24. 22 trường hợp âm tính với *HLA-B*15:02* và *HLA-A*31:01* được điều trị bằng CBZ (Tegretol) không ghi nhận ca nào có biểu hiện dị ứng (hình 3B).

Bên cạnh xét nghiệm gen trước khi kê đơn, nghiên cứu cũng tiến hành theo dõi dị ứng trên 30 mẫu bệnh nhân đối chứng đã được kê đơn điều trị với CBZ và sàng lọc mang các alen *HLA-A*31:01* và/hoặc *HLA-B*15:02*. Trong đó, có 21 (70,0%) bệnh nhân xuất hiện tình trạng dị ứng, bao gồm các phản ứng có hại trên da như xuất hiện ban đỏ và mẩn ngứa ở mặt, tay, bụng hay toàn thân với 16 trường hợp bệnh nhân (53,3%). Đặc biệt, có 6 trường hợp bệnh nhân (20,0%) xuất hiện tình trạng dị ứng là SCAR với hội chứng SJS ở 5 bệnh nhân (16, 7%) và 1 bệnh nhân xuất hiện hội chứng TEN. Ngoài ra, vẫn xuất hiện 9 (30,0%) bệnh nhân được điều trị bằng CBZ và dương tính với *HLA-B*15:02* và/hoặc *HLA-A*31:01* không xuất hiện dị ứng (hình 3C).

Khi phân tích mối liên hệ ở 13 bệnh nhân đã sàng lọc mang các alen *HLA-B*15:02* và/hoặc *HLA-A*31:01* trước khi kê đơn điều trị bằng thuốc khác và 30 bệnh nhân đã điều trị bằng CBZ mang các alen này, tỷ số chênh (OR) được tính toán có giá trị là 28 với khoảng tin cậy 95%CI: 3,15-248,78 (p=0,0028).



Hình 3. Kết quả theo dõi dị ứng ở các bệnh nhân tham gia trong nghiên cứu. (A-B) Nhóm thử nghiệm. Các bệnh nhân dương tính với *HLA-B*15:02* và/hoặc *HLA-A*31:01* được điều trị bằng các thuốc khác (A) và bệnh nhân âm tính với 2 alen này được điều trị bằng CBZ (B); (C) Nhóm đối chứng. Các bệnh nhân đối chứng đã điều trị với CBZ và dương tính với *HLA-B*15:02* và/hoặc *HLA-A*31:01*.

Bàn luận

*HLA-B*15:02* được nhiều nhóm nghiên cứu chứng minh là có liên quan chặt chẽ với SJS/TEN do CBZ gây ra trong các quần thể thuộc khu vực Đông Á và Đông Nam Á như Đài Loan (Trung Quốc), Thái Lan, Malaysia và cả Việt Nam [2, 4, 7-9]. Mỗi liên quan giữa sự có mặt của alen *HLA-A*31:01* và SCAR đã được các tác giả như T. Ozeki và cs (2011) [10] nghiên cứu trên quần thể người Nhật Bản; M. McCormack và cs (2011) [5] nghiên cứu trên quần thể người châu Âu; X. Wu và cs (2010) [9] nghiên cứu trên quần thể người Hán. Tại Việt Nam, Minh Duc Do và cs (2020) [11] khi nghiên cứu về đa hình gen HLA ở tộc người Kinh đã phát hiện thấy tần suất xuất hiện cao của *HLA-B*15:02* (11,88%), *HLA-A*31:01* (1,5%) và như vậy tiềm ẩn nguy cơ dị ứng thuốc CBZ khá cao đối với bệnh nhân động kinh Việt Nam. Trong một nghiên cứu khác về mối liên quan giữa tình trạng dị ứng CBZ và đa hình HLA của người Việt Nam, Dinh Van Nguyen và cs (2015) [4] (thực hiện chủ yếu tại Úc và lấy mẫu trên 38 bệnh nhân điều trị CBZ tại Bệnh viện Bạch Mai) đã chỉ ra các trường hợp SCAR bao gồm 52,6% SJS, 18,4% TEN, 21,1% các hội chứng chồng chéo và 7,9% bệnh nhân DRESS. Trong đó, 34/38 bệnh nhân SCAR do CBZ có *HLA-B*15:02* (89,47%) và có mối liên quan chặt chẽ giữa *HLA-B*15:02* và hội chứng SJS/TEN với OR: 33,78, 95%CI: 7,55-151,03 ($p < 0,0001$). Nghiên cứu này là nghiên cứu đầu tiên thực hiện tại Việt Nam công bố đánh giá hiệu quả của sàng lọc 2 alen *HLA-A*31:01* và *HLA-B*15:02* trước khi kê đơn điều trị CBZ cho bệnh nhân động kinh. Tuy cỡ mẫu (35 bệnh nhân nhóm thử nghiệm) còn nhỏ, nghiên cứu bước đầu ghi nhận 13 bệnh nhân mang alen *HLA-A*31:01* và *HLA-B*15:02* (10 bệnh dương tính *HLA-B*15:02*, 2 bệnh nhân *HLA-A*31:01* và 1 bệnh nhân dương tính với cả 2 alen *HLA-A*31:01* và *HLA-B*15:02*). Trong số 13 trường hợp dương tính mang gen *HLA-A*31:01*, *HLA-B*15:02* (37,14%), bệnh nhân đã được điều trị bằng thuốc thay thế như: Trileptal, Lamotrigine, Depakine, Levetiracetam, Topamax và được theo dõi trong 2 tháng. Duy nhất có 1 trường hợp mang alen *HLA-B*15:02* xuất hiện triệu chứng nhẹ khi điều trị bằng Trileptal (Oxcarbazepine). Oxcarbazepine là thuốc chống động kinh có cấu trúc vòng thơm tương tự như CBZ, nhưng được báo cáo là có ít tác dụng phụ hơn so với CBZ [12]. Việc xuất hiện bệnh nhân dị ứng thuốc Trileptal cho thấy cần có nhiều nghiên cứu đánh giá nguy cơ dị ứng loại thuốc này ở các bệnh nhân điều trị động kinh. Kết quả có 22 bệnh nhân âm tính với 2 alen *HLA-B*15:02* và *HLA-A*31:01* được lựa chọn điều trị CBZ (Tegretol) không ghi nhận hiện tượng dị ứng thuốc cho thấy tính chính xác và hiệu quả của việc sàng lọc 2 alen này trong tư vấn điều trị thuốc cho bệnh nhân. Kết hợp cùng kết quả theo dõi dị ứng trên 30 mẫu đối chứng điều trị bằng CBZ mang các alen *HLA-A*31:01* và/hoặc *HLA-B*15:02* với OR: 28, 95%CI: 3,15-248,78 ($p = 0,0028$) đã giúp giảm và phòng ngừa các trường hợp dị ứng khi điều trị bằng CBZ, đặc biệt là các SCAR như hội chứng SJS/TEN. Việc sàng lọc alen *HLA-A*31:01* và *HLA-B*15:02* là các dấu chuẩn sinh học giúp bệnh nhân giảm chi phí điều trị khi được kê đơn CBZ có giá rẻ hơn so với các thuốc khác mà không bị dị ứng thuốc.

Kết luận

Kết quả nghiên cứu đã cho thấy được giá trị của việc sàng lọc các bệnh nhân mang các alen *HLA-B*15:02* và *HLA-A*31:01* trước khi điều trị bằng CBZ đem lại hiệu quả giúp giảm nguy cơ dị ứng xuống 28 lần (95%, CI: 3,15-248,78, $p = 0,0028$), chỉ có 1/13 ca bị phản ứng có hại nhẹ trên da, đặc biệt là không xuất hiện các phản ứng nặng như hội chứng SJS-TEN. Việc sàng lọc 2 alen này bằng kỹ thuật multiplex real-time PCR có độ đặc hiệu cao, chi phí thấp và thời gian ngắn sẽ giúp cho việc tư vấn điều trị nhanh chóng, hiệu quả và giảm nguy cơ dị ứng thuốc CBZ. Nghiên cứu cần được mở rộng với cỡ mẫu lớn hơn trong tương lai để đưa ra những khuyến cáo phù hợp cho tư vấn điều trị thuốc động kinh ở người Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] C.C. Chang, et al. (2011), "Association of *HLA-B*1502* allele with carbamazepine-induced toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome in the multi-ethnic Malaysian population", *Int. J. Dermatol.*, **50**(2), pp.221-224.
- [2] P. Chen, et al. (2011), "Carbamazepine-induced toxic effects and *HLA-B*1502* screening in Taiwan", *N. Engl. J. Med.*, **364**(12), pp.1126-1133.
- [3] W.H. Chung, et al. (2004), "A marker for Stevens-Johnson syndrome", *Nature*, **428**(6982), DOI: 10.1038/428486a.
- [4] Dinh Van Nguyen, et al. (2015), "*HLA-B*1502* and carbamazepine-induced severe cutaneous adverse drug reactions in Vietnamese", *Asia Pacific Allergy*, **5**(2), pp.68-77.
- [5] M. McCormack, et al. (2011), "*HLA-A*3101* and carbamazepine-induced hypersensitivity reactions in Europeans", *N. Engl. J. Med.*, **364**(12), pp.1134-1143.
- [6] Cục Sở hữu trí tuệ (2021), "Kit để phát hiện gen kháng nguyên bạch cầu người gây dị ứng thuốc điều trị bệnh động kinh *HLA-A*31:01* và *HLA-B*15:02* và quy trình sản xuất kit này", *Công báo Sở hữu công nghiệp quyển 1: Sáng chế; giải pháp hữu ích; Thiết kế bố trí mạch tích hợp bán dẫn*, 661tr.
- [7] A.H.P. Khor, et al. (2017), "*HLA-A*31:01* and *HLA-B*15:02* association with Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis to carbamazepine in a multiethnic Malaysian population", *Pharmacogenetics and Genomics*, **27**(7), pp.275-278.
- [8] C. Locharnkul, et al. (2008), "Carbamazepine and phenytoin induced Stevens-Johnson syndrome is associated with *HLA-B*1502* allele in Thai population", *Epilepsia*, **49**(12), pp.2087-2091.
- [9] X. Wu, et al. (2010), "Association between carbamazepine-induced cutaneous adverse drug reactions and the *HLA-B*1502* allele among patients in central China", *Epilepsy and Behavior*, **19**(3), pp.405-408.
- [10] T. Ozeki, et al. (2011), "Genome-wide association study identifies *HLA-A*3101* allele as a genetic risk factor for carbamazepine-induced cutaneous adverse drug reactions in Japanese population", *Hum. Mol. Gene*, **20**(5), pp.1034-1041.
- [11] Minh Duc Do, et al. (2020), "High-resolution HLA typing of *HLA-A*, *B*, *C*, *DRB1*, and *DQB1* in Kinh Vietnamese by using next-generation sequencing", *Front. Genet.*, **11**, DOI: 10.3389/fgene.2020.00383.
- [12] D. Schmidt, C.E. Elger (2004), "What is the evidence that oxcarbazepine and carbamazepine are distinctly different antiepileptic drugs?", *Epilepsy and Behavior*, **5**(5), pp.627-635.