

Giải trình tự gen thế hệ mới phát hiện biến thể gen từ mẫu mô ung thư phổi không tế bào nhỏ

Next-generation sequencing for detection of gene variants in non-small cell lung cancer tissue samples

Trần Văn Khoa^{1*}, Bạch Quốc Tuấn²,
Nguyễn Văn Phong¹ và Triệu Tiến Sang¹

¹Học viện Quân Y,
²Bệnh viện Quân y 103

Tóm tắt

Mục tiêu: Áp dụng giải trình tự gen thế hệ mới (NGS) để phát hiện nhiều biến thể gen khác nhau trong ung thư phổi không tế bào nhỏ (NSCLC) phục vụ điều trị đích và kiểm chứng kết quả đảm bảo kết quả chính xác tránh dương tính hoặc âm tính giả bằng phương pháp khác. **Đối tượng và phương pháp:** Nghiên cứu tiến hành xác định biến thể gen phục vụ điều trị đích trên 30 mẫu mô sinh thiết kim nhỏ và phẫu thuật từ người bệnh NSCLC tại Bệnh viện Quân y 103, sử dụng hệ thống NGS-Ion Torrent và bộ kit giải trình tự mục tiêu DNA và RNA khảo sát biến thể trên 81 gen, kiểm chứng một số biến thể bằng Digital PCR (dPCR) và Minisequencing. **Kết quả:** Áp dụng được giải trình tự thế hệ mới DNA và RNA, phát hiện nhiều biến thể thuộc các gen khác nhau, kiểm tra một số biến thể bằng phương pháp Digital PCR (dPCR) và Minisequencing trên 30% mẫu cho thấy tỷ lệ trùng khớp 100% với kết quả NGS. **Kết luận:** Đã áp dụng được quy trình giải trình tự gen thế hệ mới xác định đồng thời nhiều biến thể gen trong mẫu mô NSCLC phục vụ điều trị đích. Các biến thể: EGFR: c.2573T>G(p.L858R); EGFR: c.2236_2250del(p.E746_A750del); EGFR: c.2156G>C (p.G719A) và KRAS: c.35G>T (p.G12V) của 9/9 mẫu được kiểm tra bằng hai phương pháp Minisequencing và Digital PCR cho kết quả phù hợp với NGS.

Từ khóa: Giải trình tự gen thế hệ mới; ung thư phổi không tế bào nhỏ.

Summary

Objective: Applying of next-generation sequencing (NGS) to detect different gene variants in non-small cell lung cancer (NSCLC) for targeted treatment and verifying the results to ensure accurate results and avoid false positives or negatives using other methods. **Subject and method:** The study was conducted to determine gene variants for targeted treatment on 30 fine needle biopsy and surgical tissue samples from NSCLC patients at Military Hospital 103, using the NGS-Ion Torrent system and DNA and RNA target sequencing kits to examine variants on 81 genes, verifying some variants by Digital PCR (dPCR) and Minisequencing. **Result:** Successfully applying next-generation sequencing of DNA and RNA, detecting many variants in different genes. checking some variants by Digital PCR (dPCR) and Minisequencing on 30% of samples showed a 100% match rate with NGS results. **Conclusion:** The next-generation sequencing process was applied to simultaneously identify multiple gene variants in NSCLC tissue samples for targeted therapy. The variants: EGFR: c.2573T>G(p.L858R); EGFR: c.2236_2250del(p.E746_A750del); EGFR: c.2156G>C (p.G719A) and KRAS: c.35G>T (p.G12V) of 9/9 samples were checked by two methods Minisequencing and Digital PCR for results consistent with NGS.

Ngày nhận bài: 24/4/2025, ngày chấp nhận đăng: 12/6/2025

* Tác giả liên hệ: tvkhoabio@gmail.com - Học viện Quân y

c.2236_2250del(p.E746_A750del); EGFR: c.2156G>C (p.G719A) and KRAS: c.35G>T (p.G12V) of 9/9 samples tested by two Minisequencing and Digital PCR methods gave results consistent with NGS.

Keywords: Next-generation sequencing; Non-small cell lung cancer.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Y học chính xác trong ung thư đang nhanh chóng trở thành xu hướng phổ biến trong thực hành lâm sàng và nghiên cứu. Các liệu pháp điều trị đích (targeted therapy) ngày càng được ứng dụng rộng rãi, mở ra khả năng điều trị ung thư hiệu quả hơn và ít tác dụng phụ hơn so với các phương pháp điều trị truyền thống. Hiện nay, ung thư phổi không tế bào nhỏ (NSCLC) - một loại ung thư có sự đa dạng lớn về các biến thể gen đã được Mạng lưới Ung thư Toàn diện Quốc gia (NCCN) khuyến nghị sử dụng giải trình tự gen thế hệ mới (NGS) để phát hiện các biến thể gen với thông lượng cao và phục vụ điều trị đích¹⁻³.

NGS có khả năng phân tích dữ liệu gen lớn từ lượng mẫu mô nhỏ trong một lần xét nghiệm, vượt trội so với các phương pháp phát hiện một vài biến thể gen như lai phân tử, FISH hay realtime-PCR. Tuy nhiên, kết quả từ NGS chưa phải lúc nào cũng chính xác hoàn toàn, đặc biệt khi ứng dụng trong nghiên cứu ung thư với mẫu mô sinh thiết có lượng vật liệu di truyền rất ít, như các mẫu mô ung thư phổi. Vì vậy, việc xác nhận lại các kết quả NGS bằng các phương pháp khác có độ nhạy cao là rất cần thiết.

Bên cạnh đó, một yếu tố quan trọng khác là mẫu mô tại Việt Nam hiện nay vẫn thường được bảo quản bằng cách cố định bằng formalin và nhúng paraffin (FFPE) để có thể thuận tiện lưu trữ và sử dụng ở nhiệt độ phòng. Quá trình cố định bằng formalin là nguyên nhân chính gây ra sự phân mảnh, suy thoái và các thay đổi do deamin hóa, dẫn đến sự chuyển đổi C:G > T:A^{4,5}. Những thay đổi này có thể làm sai lệch kết quả giải trình tự gen, ảnh hưởng đến việc chẩn đoán và chỉ định liệu pháp điều trị trong thực hành lâm sàng.

Với những thách thức trên, chúng tôi tiến hành áp dụng NGS để phân tích các biến thể gen liên quan đến điều trị đích từ mẫu mô FFPE trong NSCLC,

đồng thời kiểm tra lại một số biến thể bằng phương pháp khác có độ nhạy cao (digital PCR và minisequencing) nhằm đánh giá độ chính xác và khả năng áp dụng trong điều kiện thực tiễn tại Việt Nam.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Đối tượng

30 mẫu mô đúc nén (FFPE) NSCLC được thu thập từ các bệnh nhân đã được chẩn đoán mắc NSCLC tại Trung tâm Ung bướu và Trung tâm Hô hấp, Bệnh viện Quân y 103, các mẫu mô được sinh thiết kim nhỏ hoặc lấy thông qua phẫu thuật trong giai đoạn từ tháng 4/2023 đến tháng 2/2025, bao gồm: 25 mẫu sinh thiết kim nhỏ (NC01-NC25) và 5 mẫu mô được lấy thông qua phẫu thuật (các mẫu AD02, AD05, AD06, AD07, AD10). Các mẫu được tiến hành giải trình tự tại thời điểm dưới hai năm kể từ khi lấy mẫu.

2.2. Phương pháp

Giải trình tự NGS xác định biến thể gen phục vụ điều trị đích

Tách chiết DNA và RNA từ mẫu mô đúc nén, sử dụng bộ kit FFPE DNA/RNA Isolation kit (Capitalbio Technology). Nồng độ DNA và RNA sau tách chiết được đo bằng phương pháp Qubit, sử dụng bộ Equalbit 1 × dsDNA HS Assay Kit và Equalbit RNA HS Assay Kit (Vazyme).

Tổng hợp cDNA từ RNA bằng bộ kit cDNA Reverse Transcription Kit (Capitalbio Technology).

Chuẩn bị thư viện NGS, sử dụng bộ kit của Capitalbio Technology: Bộ Individualized Lung Cancer Medication Detection Kit (63 Gene) cho mục tiêu DNA và Individualized Lung Cancer Medication Detection Kit (18 gene) cho mục tiêu RNA. Đây là hai bộ kit RUO khác nhau về panel gen mục tiêu, có thể phát hiện được đồng thời nhiều biến thể trên nhiều gen phục vụ điều trị đích bệnh NSCLC theo khuyến cáo. Lượng DNA và RNA đầu vào theo hướng dẫn

của kit để lập thư viện NGS lần lượt tối thiểu là 2,67ng/μl cho DNA và 2,38ng/μl cho RNA).

Giải trình tự trên hệ thống Ion Torrent, sử dụng bộ kit Sequencing Reaction Universal Kit (Semiconductor Sequencing - Capitalbio Technology). Phần mềm phân tích PiVAT (Pooled indexed Variant Analysis Tool) dùng để xác định các biến thể gen. Độ dài đoạn đọc trong khoảng 150 - 200bp, trung bình là 170bp. Dữ liệu trung bình 1.2Gb/mẫu và đảm bảo chỉ số đánh giá chất lượng Q20. Các biến thể được lọc đảm bảo độ sâu 400x với panel 63 gen và 800x với panel 18 gen. Thời gian tách và lập thư viện khoảng 8 giờ, thời gian chạy giải trình tự và phân tích là khoảng 8 giờ.

Kiểm tra kết quả giải trình tự NGS

9 trong số các mẫu phát hiện biến thể bằng giải trình tự NGS được lựa chọn để kiểm tra lại bằng hai phương pháp: PCR kỹ thuật số (Digital PCR) và Single-base extension (Minisequencing). Việc lựa chọn mẫu dựa trên loại biến thể và tần suất alen biến thể (VAF) thu được từ dữ liệu NGS. Cụ thể là,

digital PCR được áp dụng đối với các biến thể phổ biến có trong bộ panel thương mại, trong khi Minisequencing được sử dụng cho các biến thể có VAF trên 10% và thuộc loại có thể phát hiện bằng kỹ thuật kéo dài một base (như biến thể thay thế nucleotide...).

Digital PCR: Sử dụng bộ EGFR driver panel assay (ThermoFisher Scientific), thực hiện trên đĩa QuantStudio™ Absolute Q MAP 16 Digital PCR Plate (ThermoFisher Scientific) để phát hiện hai biến thể hay gặp là *EGFR*:c.2573T>G (p.L858R) và *EGFR*:c.2236_2250del (p.E746_A750del). Dữ liệu thu được sẽ được phân tích trên phần mềm QuantStudio Absolute Q Digital PCR System Software và tính toán số lượng bản sao DNA mục tiêu.

Minisequencing: Sử dụng bộ SNaPshot™ Multiplex Kit (Thermo Fisher) và nghiên cứu tự thiết kế mỗi theo biến thể (Bảng 1) để phát hiện hai biến thể *EGFR*: c.2156G>C(p.G719A) và *KRAS*:c.35G>T(p.G12V). Dữ liệu được phân tích bằng phần mềm Genemapper ID 6.0.

Bảng 1. Trình tự mỗi tự thiết kế cho phản ứng Minisequencing phát hiện *EGFR*: c.2156G>C(p.G719A) và *KRAS*:c.35G>T(p.G12V).

Biến thể	Mỗi	Trình tự (5'-3')	Kích thước
<i>EGFR</i> : c.2156G>C (p.G719A)	EGF719f	TGTGGAGCCTCTTACACCCA	137bp
	EGF719r	GTGCCAGGGACCTTACCTTATAC	
	EGF719s	TCAAAAAGATCAAAGTGCTGG	21bp
<i>KRAS</i> : c.35G>T (p.G12V)	KRAS12f	CAAGAATGGTCCTGCACCAGTAATAT	171bp
	KRAS12r	AGGCCTGCTGAAAATGACTGAATATAA	
	KRAS35sr	GCACTCTTGCCTACGCCA	18bp

2.3. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu được Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu Y sinh Học viện Quân y thông qua ngày 26/03/2024 (Số: 01/2024/CNChT-HĐĐĐ). Việc lấy mẫu được thực hiện theo đúng quy định và chỉ phục vụ cho nghiên cứu. Nhóm tác giả cam kết không có xung đột lợi ích trong nghiên cứu.

III. KẾT QUẢ

3.1. Kết quả giải trình tự NGS xác định biến thể gen phục vụ điều trị đích

Bảng 2. Đặc điểm giải trình tự NGS từ các mẫu mô vùi nền

Đặc điểm	Mô sinh thiết	Mô phẫu thuật
Nồng độ DNA sau tách chiết (ng/μl)	3,368 ± 2,95	150,80 ± 21,60
Nồng độ RNA sau tách chiết (ng/μl)	42,812 ± 74,57	41,56 ± 46,97
Nồng độ lập thư viện 63 gen (ng/μl)	16,36 ± 13,21	22,00 ± 2,69
Nồng độ lập thư viện 18 gen (ng/μl)	6,16 ± 3,20	6,92 ± 2,63

Các mẫu DNA và RNA tách chiết từ mẫu mô sinh thiết kim nhỏ có giá trị trung bình nồng độ thấp hơn so với mô phẫu thuật (Bảng 2). Sự khác biệt này cho thấy lượng mẫu bệnh phẩm đầu vào ảnh hưởng đến số lượng DNA và RNA tách chiết được do mẫu phẫu thuật có số lượng mô nhiều hơn mẫu sinh thiết kim nhỏ. Mặc dù mẫu mô sinh thiết lỏng có nồng độ DNA và RNA thấp hơn so với mẫu mô phẫu thuật, nhưng với kỹ thuật tách chiết sử dụng, nồng độ vẫn đảm bảo yêu cầu đầu vào cho lập thư viện NGS.

Bảng 3. Kết quả giải trình tự NGS xác định biến thể gen

Mẫu	Biến thể nhóm Tier 1*	Biến thể nhóm Tier 2**	Biến thể nhóm Tier 3***
NC01	<i>EGFR</i> c.2236_2250del(p.E746_A750del) VF = 41,47%	-	<i>ATM</i> c.1009C>T(p.R337C) VF=47,78%
NC02	<i>EGFR</i> c.2240_2254del (p.L747_T751del) VF = 49,02%	-	-
NC03	-	-	-
NC04	-	<i>KRAS</i> c.35G>T(p.G12V) VF = 22,92%	-
NC05	<i>EGFR</i> c.2235_2249del(p.E746_A750del) VF= 23,17%	-	<i>BRAF</i> c.1797del(p.V600*) VF = 2,43%
NC06	<i>EGFR</i> c.2156G>C(p.G719A) VF = 36,07% <i>EGFR</i> c.2303G>T(p.S768I) VF = 52,75%	-	-
NC07	-	-	<i>BRAF</i> c.1797del(p.V600*) VF = 7,27%
NC08	<i>EGFR</i> c.2156G>C(p.G719A) VF = 29,41%	-	-
NC09	<i>EGFR</i> c.2236_2250del(p.E746_A750del) VF = 19,09%	-	<i>BRAF</i> c.1797del(p.V600*) VF = 5,66%
NC10	-	-	-
NC11	-	-	-
NC12	<i>KRAS</i> c.34G>T(p.G12C) VF = 25,25%	<i>CDKN2A</i> c.220G>A(p.D74N) VF = 1,26%	-
NC13	<i>EGFR</i> c.2573T>G(p.L858R) VF = 46,18%	<i>EGFR</i> CNV AmpCNV=3.93	-
NC14	-	<i>KRAS</i> c.35G>T(p.G12V) VF = 10,16%	-
NC15	<i>EGFR</i> c.2236_2250del(p.E746_A750del) VF = 20,48%	-	<i>BRAF</i> c.1797del(p.V600*) VF = 7,14%
NC16	-	-	<i>BRAF</i> c.1797del(p.V600*) VF =

Mẫu	Biến thể nhóm Tier 1*	Biến thể nhóm Tier 2**	Biến thể nhóm Tier 3***
			6,06%
NC17	<i>EGFR</i> c.2573T>G(p.L858R) VF = 38,60%	-	<i>HRAS</i> c.38G>A(p.G13D) VF = 2,07%
NC18	-	-	<i>BRAF</i> c.1797del(p.V600*) VF = 15,62%
NC19	-	-	-
NC20	<i>KRAS</i> c.34G>T(p.G12C) VF = 12,16%	-	<i>BRAF</i> c.1797del(p.V600*) VF = 17,17%
NC21	-	<i>KRAS</i> c.35G>A(p.G12D) VF = 24,26%	-
NC22	-	-	<i>BRAF</i> c.1797del(p.V600*) VF = 4,77%
NC23	-	-	<i>BRAF</i> c.1797del(p.V600*) VF = 14,44% <i>EGFR</i> c.2214_2216del(p.K739del) VF = 3,40%
NC24	<i>EGFR</i> c.2573T>G(p.L858R) VF = 65,07%	-	<i>TP53</i> c.713G>A(p.C238Y) VF = 73,22%
NC25	<i>EGFR</i> c.2235_2249del(p.E746_A750del) VF = 16,13%	-	
AD02	-	<i>KRAS</i> c.35G>T(p.G12V) VF = 1,41%	-
AD05	-	<i>KRAS</i> c.35G>A(p.G12D) VF = 9,92%	-
AD06	-	-	-
AD07	<i>EGFR</i> c.2237_2255delinsT(p.E746_S752delinsV) VF = 81,45%	-	<i>EGFR</i> c.2255C>T(p.S752F) VF = 92,57% <i>TP53</i> c.711G>A(p.M237I) VF = 48,32%
AD10	<i>KRAS</i> c.34G>T(p.G12C) VF = 10,11%	-	-

*Biến thể nhóm Tier 1**: Các biến thể có ý nghĩa lâm sàng mạnh mẽ trong điều trị, tiên lượng và chẩn đoán (bằng chứng cấp A và B).

*Biến thể nhóm Tier 2***: Các biến thể có ý nghĩa lâm sàng tiềm năng trong điều trị, tiên lượng và chẩn đoán (bằng chứng cấp C và D).

*Biến thể nhóm Tier 3****: Các biến thể có ý nghĩa lâm sàng chưa rõ ràng, không có bằng chứng lâm sàng.

VF (Variant Allele Frequency): Tần suất biến thể alen.

CNV amp: Thay đổi số lượng bản sao.

Có 20 trong tổng số 30 mẫu (66,67%) phát hiện được các biến thể thuộc nhóm Tier 1 và/hoặc Tier 2, trong đó, biến thể nhóm Tier 1 xuất hiện trong 15

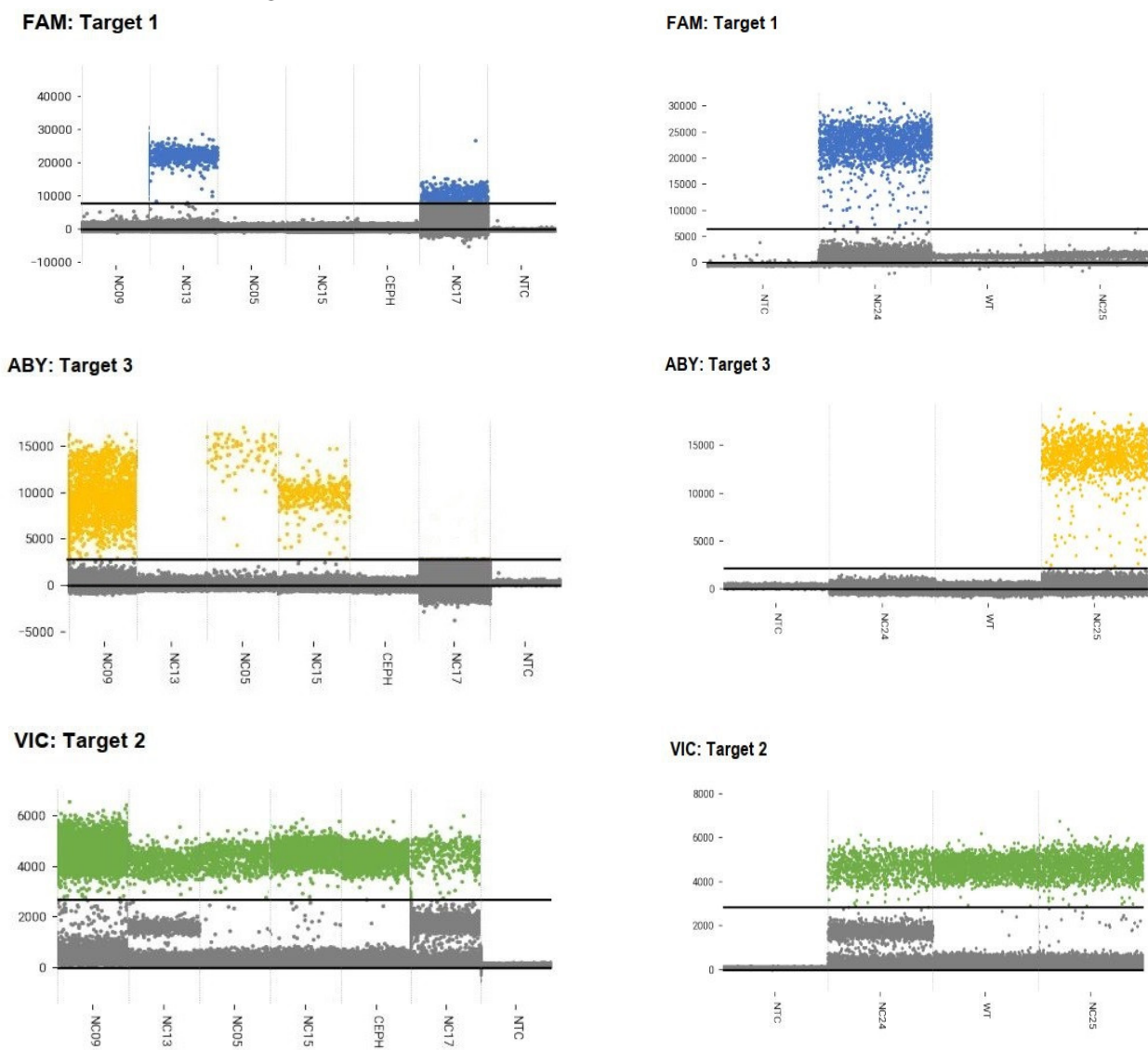
mẫu, biến thể nhóm Tier 2 xuất hiện trong 7 mẫu, với 2 mẫu có sự kết hợp của cả hai nhóm. Biến thể nhóm Tier 3 được phát hiện với tỷ lệ tương đối cao,

với 13 mẫu (43,33%). Có 5 mẫu (16,67%) không phát hiện bất kỳ biến thể nào. Biến thể EGFR: c.2236_2250del(p.E746_A750del) và biến thể EGFR: c.2573T>G(p.L858R) là hai biến thể phổ biến trong các biến thể nhóm Tier 1. Biến thể KRAS:

c.35G>A(p.G12D) và biến thể KRAS: c.35G>T(p.G12V) là hai biến thể phổ biến ở nhóm Tier 2. Nhóm Tier 3 có BRAF: c.1797del(p.V600*) là biến thể phổ biến nhất (9/30 mẫu) (Bảng 3).

3.2. Kết quả kiểm tra kết quả NGS bằng phương pháp khác

Kết quả Multiplexed digital PCR:



Hình 1. Kết quả chạy Multiplexed digital PCR phát hiện biến thể gen *EGFR* trên một số mẫu.

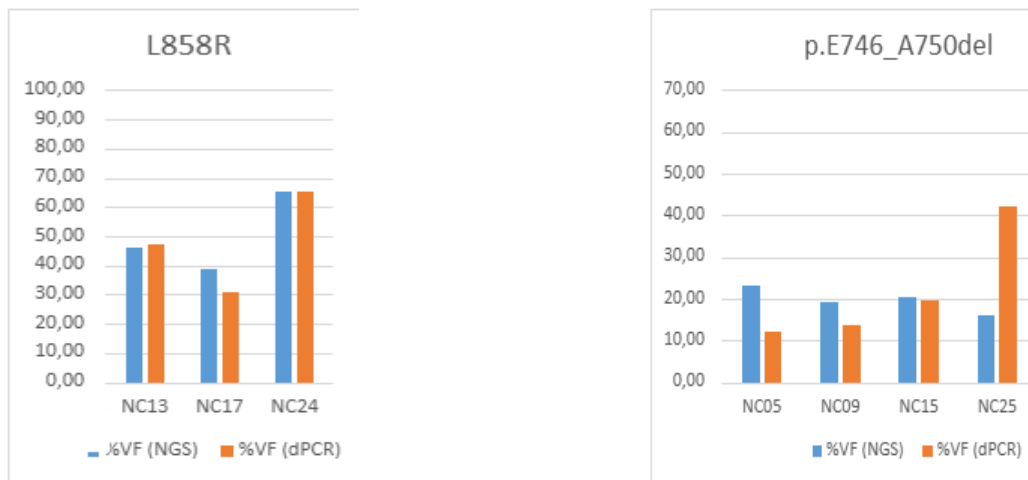
Các mẫu ký hiệu như trong hình; NTC: Mẫu chứng âm; WT/ CEPH: Mẫu đối chứng không mang hai biến thể trên

FAM: Kênh màu phát hiện *EGFR*: c.2573T>G(p.L858R)

ABY: Kênh màu phát hiện *EGFR*: c.2236_2250del(p.E746_A750del)

VIC: Kênh màu phát hiện alen wildtype *EGFR*: c.2573T (p.L858)

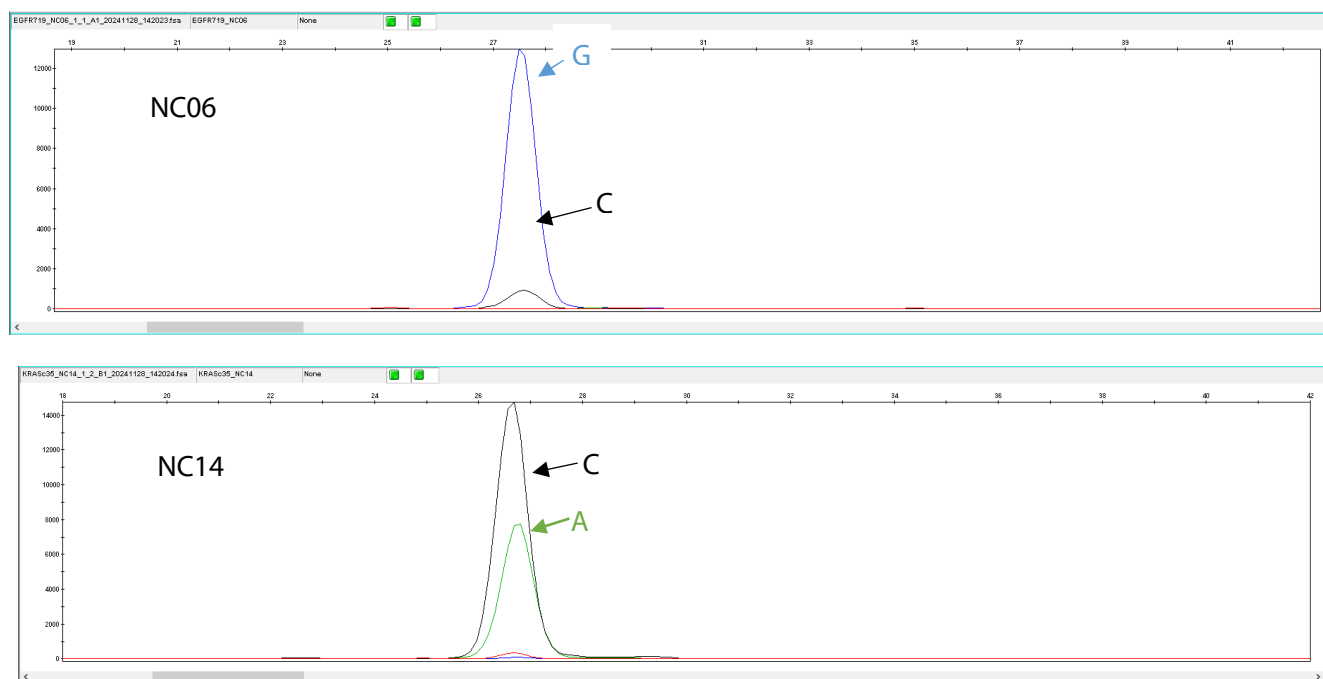
Kết quả chạy Multiplexed digital PCR cho thấy các mẫu mang biến thể EGFR: c.2573T>G(p.L858R) là các mẫu NC13, NC17 và NC24; các mẫu mang biến thể EGFR: c.2236_2250del(p.E746_A750del) là các mẫu NC05, NC09, NC15, NC25 (Hình 1). Kết quả này đồng nhất với kết quả giải trình tự NGS mà chúng tôi đã tiến hành.



Hình 2. So sánh kết quả định lượng biến thể phát hiện được giữa kết quả chạy Multiplexed digital PCR và NGS.

Tính toán định lượng biến thể dựa vào số bản copy biến thể và số bản copy của alen Wildtype. So sánh kết quả của hai phương pháp cho thấy có sự tương đồng về định lượng VF ở các mẫu, ngoại trừ mẫu NC05 và NC25 có sự khác biệt (Hình 2).

Kết quả Minisequencing



Hình 3. Kết quả Minisequencing kiểm tra biến thể trên hai mẫu NC06 và NC14.

Kết quả Minisequencing kiểm tra biến thể gen trên hai mẫu NC06 và NC14 cho kết quả trùng khớp với kết quả NGS: NC06 mang biến thể *EGFR*: c.2156G>C (p.G719A); NC14 mang biến thể *KRAS*: c.35G>T (p.G12V) (Hình 3).

IV. BÀN LUẬN

Trong nghiên cứu chúng tôi thực hiện, phần lớn mẫu sinh thiết được thu thập từ mô sinh thiết kim nhỏ, chiếm 25/30 mẫu. Điều này do thực tế khi chẩn đoán NSCLC, các phương pháp sinh thiết xâm lấn tối thiểu như sinh thiết kim nhỏ thường được sử dụng phổ biến bởi tính an toàn và hiệu quả trong việc lấy mẫu mô từ các tổn thương sâu trong phổi. Tuy vậy, đây lại là một thách thức lớn cho các xét nghiệm phân tích sau đó bởi lượng mô thu được ít, nồng độ DNA và RNA tách chiết thấp gây ảnh hưởng đến hiệu quả của quá trình giải trình tự và có thể giảm độ chính xác của các phân tích biến thể gen. Chính vì vậy, việc xử lý mẫu DNA và RNA là cực kỳ quan trọng, nhằm đảm bảo chất lượng đầu vào cho các phân tích NGS sau này.

Bên cạnh đó, việc cố định mô bằng formalin và nhúng paraffin (FFPE) là phương pháp phổ biến để bảo quản mô lâu dài. Đây cũng là nguyên nhân chính gây ra sự phân mảnh, suy thoái và các thay đổi do deamin hóa, dẫn đến sự chuyển đổi C:G > T:A, làm suy giảm chất lượng DNA theo thời gian, ảnh hưởng trực tiếp đến kết quả giải trình tự gen ^{4, 5}. Tuy nhiên, một nghiên cứu gần đây của Gao và các cộng sự (2020) đã chỉ ra sự tương đồng đáng kể về các biến thể gen phát hiện được khi so sánh thực hiện NGS trên mẫu mô đông lạnh tươi và mô FFPE bảo quản trong vòng hai năm ở ung thư đại trực tràng. Dù vẫn có một số ít biến thể dương tính giả (5 trong tổng số 226), song các tác giả nhận định rằng mô FFPE lưu trữ dưới hai năm có thể được sử dụng thay thế cho mô đông lạnh tươi trong việc phát hiện biến thể gen ⁶. Để xử lý khác biệt từ mẫu FFPE, Kerick và các cộng sự đã đề xuất một chiến lược cải tiến, trong đó tăng độ sâu giải trình tự nhằm giảm thiểu tỷ lệ dương tính giả và âm tính giả, từ đó nâng cao độ chính xác của kết quả ⁷. Một cách khác là lọc biến thể nghiêm ngặt

hơn, giúp loại bỏ các kết quả dương tính giả với điểm chất lượng thấp, mặc dù có thể làm giảm độ sâu đọc. Trong nghiên cứu của chúng tôi, các mẫu FFPE đều được thực hiện NGS tại thời điểm lưu trữ dưới hai năm, biến thể đã được lọc và đảm bảo độ sâu giải trình tự 400x đối với panel 63 gen và 800x đối với panel 18 gen theo khuyến cáo của kit để có thể phát hiện chính xác các biến thể.

Owen và cộng sự nghiên cứu trên bệnh nhân ung thư biểu mô tuyến phổi giai đoạn muộn cho thấy việc kết hợp RNA-NGS và DNA-NGS giúp cải thiện khả năng phát hiện các biến thể điều trị đích, với 15,3% bệnh nhân có thêm biến thể được phát hiện, trong đó biến thể dung hợp gen (fusion) tăng 14,3% so với chỉ sử dụng công nghệ DNA-NGS. Điều này cho thấy RNA-NGS nên được triển khai trong phát hiện biến thể phục vụ điều trị bệnh nhân NSCLC giai đoạn muộn ⁸. Nghiên cứu của Pisapia và cộng sự cũng khẳng định hiệu quả của RNA-NGS trong việc phát hiện các biến thể dung hợp gen và biến thể cắt nối quan trọng trong quyết định điều trị đích NSCLC so với DNA-NGS ⁹. Tương tự, bộ kit mà chúng tôi sử dụng kết hợp giải trình tự cả mục tiêu DNA và RNA để tăng khả năng phát hiện các biến thể gen so với giải trình tự mục tiêu DNA đơn độc. Kết quả kiểm tra dữ liệu qua phương pháp Digital PCR và Minisequencing trên 30% mẫu (9/30) với tần suất biến thể trên 10% cho thấy kết quả trùng khớp 100%, cho thấy tính kết quả NGS được nghiên cứu thực hiện là tin cậy. Đây là cơ sở để chúng tôi có thể ứng dụng thực tiễn trong phát hiện biến thể phục vụ điều trị đích NSCLC tại Việt Nam.

V. KẾT LUẬN

Đã áp dụng được quy trình giải trình tự gen thế hệ mới xác định đồng thời nhiều biến thể gen trong mẫu mô NSCLC phục vụ điều trị đích.

Các biến thể: *EGFR*: c.2573T>G(p.L858R); *EGFR*: c.2236_2250del(p.E746_A750del); *EGFR*: c.2156G>C (p.G719A) và *KRAS*: c.35G>T (p.G12V) của 9/9 mẫu được kiểm tra bằng hai phương pháp Minisequencing và Digital PCR cho kết quả phù hợp với NGS.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ettinger DS, Wood DE, Aisner DL et al (2022) *Non-small cell lung cancer, version 3.2022, NCCN clinical practice guidelines in oncology*. Journal of the National Comprehensive Cancer Network 20(5): 497-530.
2. Mina SA, Shanshal M, Leventakos K et al (2025) *Emerging Targeted Therapies in Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC)*. Cancers 17(3): 353.
3. Melosky B, Juergens RA, Banerji S et al (2025) *The continually evolving landscape of novel therapies in oncogene-driven advanced non-small-cell lung cancer*. Therapeutic Advances in Medical Oncology 17: 17588359241308784.
4. Williams C, Pontén F, Moberg C et al (1999) *A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens*. The American journal of pathology 155(5): 1467-1471.
5. Kim S, Park C, Ji Y, Kim DG et al (2017) *Deamination effects in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples in the era of precision medicine*. The Journal of Molecular Diagnostics 19(1): 137-146.
6. Gao XH, Li J, Gong HF et al (2020) *Comparison of fresh frozen tissue with formalin-fixed paraffin-embedded tissue for mutation analysis using a multi-gene panel in patients with colorectal cancer*. Frontiers in oncology 10: 310.
7. Kerick M, Isau M, Timmermann B et al (2011) *Targeted high throughput sequencing in clinical cancer settings: formaldehyde fixed-paraffin embedded (FFPE) tumor tissues, input amount and tumor heterogeneity*. BMC medical genomics 4: 1-13.
8. Owen D, Ben-Shachar R, Feliciano J et al (2024). *Actionable Structural Variant Detection via RNA-NGS and DNA-NGS in Patients With Advanced Non-Small Cell Lung Cancer*. JAMA network open 7(11): e2442970-e2442970.
9. Pisapia P, Iaccarino A, De Luca C et al (2024) *RNA-Based Next-Generation Sequencing in Non-Small Cell Lung Cancer patients: Data from Campania, Italy*. Pathologica-Journal of the Italian Society of Anatomic Pathology and Diagnostic Cytopathology 116.