

Kết quả ngoại kiểm một số xét nghiệm gene đích trong bệnh máu ác tính

Results of external quality assessment for target gene mutation in haematological diseases

Ngô Tất Trung, Đào Phương Giang, Lê Hữu Song

Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

Tóm tắt

Mục tiêu: Đánh giá chất lượng xét nghiệm một số dấu ấn chuyển gene AML1-ETO, PML-RARA, Tel-AML1, BCR-ABL, CBFB-MYH11 và đột biến Jak2, NPM-1, FLT3 qua chương trình ngoại kiểm quốc tế. **Đối tượng và phương pháp:** Trung tâm Kiểm chuẩn Quốc gia Vương Quốc Anh (UK-NEQAS) cung cấp các mẫu chuẩn “mù” và yêu cầu chúng tôi tiến hành các xét nghiệm xác định chuyển gene AML1-ETO, PML-RARA, Tel-AML1, BCR-ABL, CBFB-MYH11, đột biến gene Jak2 V617F, NPM-1, FLT3. Kết quả được gửi lại UK-NEQAS và nhận thông báo kết quả so sánh. **Kết quả:** Tất cả các xét nghiệm định tính phát hiện đột biến chuyển gene AML1-ETO, PML-RARA, Tel-AML1, BCR-ABL, CBFB-MYH11 và đột biến điểm Jak2 V617F, NPM-1, FLT3 có độ chính xác 100% so với panel chuẩn do UK NEQAS cung cấp, trong đó có xét nghiệm được kiểm chuẩn 6 lần đều không sai khác. Các xét nghiệm định lượng có độ chính xác cao khi tỷ lệ gene đột biến cao hơn 1%. **Kết luận:** Các xét nghiệm phát hiện gene đích ứng dụng trong chẩn đoán và điều trị bệnh máu ác tính có độ chính xác cao đáp ứng được yêu cầu trong thực hành lâm sàng.

Từ khóa: Bệnh máu, đột biến gene.

Summary

Objective: The aim of this script is to report 108 Military Central Hospital's current external quality assessment (EQA) results of molecular assays used for identification of common leukemia related fusion genes: AML1-ETO, PML-RARA, Tel-AML1, BCR-ABL, CBFB-MYH11 and somatic mutations: Jak2, NPM-1, FLT3. **Subject and method:** Blind samples from UK-NEQAS were provided for detecting of fusion genes AML1-ETO, PML-RARA, Tel-AML1, BCR-ABL, CBFB-MYH11, and somatic mutation Jak2 V617F, NPM-1, FLT3 by the 108 Military Central Hospital established assays. **Result:** All qualitative diagnostics results gained by institutional approach were consensus to that provided by United Kingdom National External Quality Assessment Service (UK-NEQAS). Whereas, the quantification of samples with more than 1% mutational load was also at high level of agreement to that of UK-NEQAS. **Conclusion:** 108 Military Central Hospital institutional molecular assays meet the UK-NEQAS's quality standards for identification of common genetics lesions in leukemia patients.

Keywords: Haematological diseases, gene mutation.

Ngày nhận bài: 24/5/2019, ngày chấp nhận đăng: 05/6/2019

Người phản hồi: Ngô Tất Trung, Email: tatrungngo@gmail.com – Bệnh viện TƯQĐ 108

1. Đặt vấn đề

Cả thế hoá trong điều trị ung thư đang là xu thế hiện nay và các xác định gene đột biến đang là xét nghiệm thường quy tại các cơ sở y tế có hệ thống sinh học phân tử. Để điều trị các bệnh máu ác tính người ta cần có các xét nghiệm phát hiện dạng bất chéo nhiễm sắc AML1-ETO, PML-RARA, Tel-AML1, BCR-ABL, CBFB-MYH11 hay xét nghiệm phát hiện đột biến gene Jak2, NPM-1, FLT3 [1].

Ở Việt Nam, đã có một số cơ sở y tế triển khai những xét nghiệm này, tuy nhiên vẫn chưa nhiều nơi thực hiện ngoại kiểm quốc tế. Hơn nữa, hầu hết các trung tâm xét nghiệm chỉ mới triển khai những xét nghiệm mang tính chất định tính, còn những xét nghiệm định lượng thì chưa thực hiện. Trong khi đó, giá trị của xét nghiệm định lượng là rất lớn, nó giúp không chỉ phát hiện các đột biến mà còn giúp theo dõi hiệu quả điều trị cũng như tiên lượng điều trị. Theo như hiểu biết của chúng tôi thì chưa có cơ sở nào triển khai đầy đủ các xét nghiệm phát hiện các dấu ấn có nhiều biến thể như MLL-AF9, CALR, hay các biến thể hiếm khác của BCR-ABL, NPM-1, CBFB-MYH11.

Từ thực tiễn như vậy và dựa trên các đồng thuận quốc tế về chẩn đoán, điều trị các bệnh máu ác tính như Tổ chức Y tế Thế giới WHO hay mạng lưới ung thư máu châu Âu (ELN) [1], hay Mạng lưới Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ NCCN, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu thiết kế chế tạo một số bộ sinh phẩm để phục vụ công tác chẩn đoán và điều trị tại Bệnh viện TƯQĐ 108. Để hoàn thiện quy trình và khẳng định tính chính xác, ổn định của bộ sinh phẩm được tạo ra chúng tôi đã tiến hành đăng ký ngoại kiểm quốc tế.

Trung tâm đánh giá chất lượng ngoại kiểm quốc gia Vương quốc Anh (United Kingdom National External Quality Assessment Service - UK NEQAS <http://www.ukneqas.org.uk/>) là chương trình kiểm chuẩn quốc tế lớn và lâu đời nhất, có tiêu chuẩn cao nhất trong lĩnh vực kiểm chuẩn các xét nghiệm di

truyền học liên quan đến bệnh máu ác tính. UK NEQAS cung cấp cho hơn 650 phòng thí nghiệm toàn thế giới về mô hình miễn dịch bệnh bạch cầu, các phân tích về các tế bào lympho, và gần đây là các xét nghiệm về tế bào dòng chảy và các bảng xét nghiệm di truyền học. Do đó, chúng tôi lựa chọn trung tâm này nhằm Đánh giá chất lượng xét nghiệm sinh học phân tử xác định một số gene đích trong bệnh máu ác tính của Bệnh viện TƯQĐ 108.

2. Đối tượng và phương pháp

2.1. Đối tượng

Các xét nghiệm đã được nghiên cứu triển khai tại Trung tâm Nghiên cứu Y học Việt Đức và Khoa Sinh học phân tử, Bệnh viện TƯQĐ 108, bao gồm:

Các xét nghiệm đột biến dạng chuyển gene: AML1-ETO, PML-RARA, Tel-AML1, BCR-ABL, CBFB-MYH11.

Các xét nghiệm đột biến dạng thay đổi điểm, mất, chèn đoạn: Jak2 V617F, NPM-1, FLT3.

46 mẫu bệnh phẩm “mù” chưa biết tình trạng đột biến gene được gửi từ UK NEQAS theo chương trình (từ tháng 1 năm 2018 đến tháng 3 năm 2019).

2.2. Phương pháp

Mở 01 tài khoản kiểm chuẩn tại UK NEQAS và thanh toán các chi phí theo yêu cầu của UK NEQAS.

Tiếp nhận định kỳ các bệnh phẩm “mù” từ UK NEQAS.

Tiến hành xét nghiệm các đột biến gene, chuyển đoạn gene theo yêu cầu của UK NEQAS tại Khoa Sinh học phân tử, Bệnh viện TƯQĐ 108. Quy trình của những xét nghiệm này đã được thông qua tại Hội đồng Khoa học của Bệnh viện TƯQĐ 108.

Trả lời kết quả qua hệ thống đúng hạn.

Nhận kết quả ngoại kiểm từ UK NEQAS qua email và hệ thống.

3. Kết quả

Bảng 1. Kết quả ngoại kiểm xét nghiệm chuyển đoạn gene BCR-ABL 1

Lần thứ	Phương pháp	Kết quả của UK NEQAS	Kết quả do bộ sinh phẩm của Bệnh viện TƯQĐ 108 tạo ra
1	Định tính	+	+
2	Định tính	+	+
3	Định lượng	0,1% BCR-ABL1/ABL1	0% BCR-ABL1/ABL1

4	Định lượng	0,1% BCR-ABL1/ABL1	0% BCR-ABL1/ABL1
---	------------	--------------------	------------------

Bảng 1. Kết quả ngoại kiểm xét nghiệm chuyển đoạn gene BCR-ABL1 (Tiếp theo)

Lần thứ	Phương pháp	Kết quả của UK NEQAS	Kết quả do bộ sinh phẩm của Bệnh viện TƯQĐ 108 tạo ra
5	Định lượng	6,2% BCR-ABL1/ABL1	5% BCR-ABL1/ABL1
6	Định lượng	0,034% BCR-ABL1/ABL1	5% BCR-ABL1/ABL1
7	Định lượng	4,5% BCR-ABL1/ABL1	7,13% BCR-ABL1/ABL1
8	Định lượng	0,25% BCR-ABL1/ABL1	0,25% BCR-ABL1/ABL1
9	Định lượng	1,6% BCR-ABL1/ABL1	3% BCR-ABL1/ABL1
10	Định lượng	0,05% BCR-ABL1/ABL1	0% BCR-ABL1/ABL1

Nhận xét: Cả 2 lần ngoại kiểm bằng phương pháp định tính đều cho kết quả chính xác hoàn toàn so với UK NEQAS. Tuy nhiên, khi ngoại kiểm bằng phương pháp định lượng thì có sự khác biệt về tỷ lệ gene mang đột biến trong mẫu. Cụ thể, 3 mẫu có tỷ lệ gene đột biến quá thấp (0,05 đến 0,1% theo UK NEQAS) thì kết quả của chúng tôi là 0%, tức không phát hiện được. Trong khi đó, một mẫu có tỷ lệ chỉ 0,034% nhưng kết quả của chúng tôi là 5%. 1 mẫu có tỷ lệ gene đột biến là 0,25% thì kết quả của chúng tôi hoàn toàn phù hợp với UK NEQAS. 3 mẫu có tỷ lệ gene đột biến từ 1,6% đến 6,2% thì kết quả của chúng tôi là tương đương và có phần nhạy hơn.

Bảng 2. Kết quả ngoại kiểm xét nghiệm đột biến gene FLT3

Lần thứ	Phương pháp	Kết quả của UK NEQAS	Kết quả do bộ sinh phẩm của Bệnh viện TƯQĐ 108 tạo ra
1	Định tính	+	+
2	Định tính	+	+
3	Định tính	+	+
4	Định tính	+	+

Nhận xét: Cả 4 lần ngoại kiểm kết quả của chúng tôi đều phù hợp với UK NEQAS.

Bảng 3. Kết quả ngoại kiểm xét nghiệm đột biến gene JAK2 p.Val617Phe (V617F)

Lần thứ	Phương pháp	Kết quả của UK NEQAS	Kết quả do bộ sinh phẩm của Bệnh viện TƯQĐ 108 tạo ra
1	Định tính	+	+
2	Định tính	+	+
3	Định tính	+	+
4	Định tính	+	+
5	Định tính	+	+
6	Định tính	-	-

Nhận xét: Cả 6 lần ngoại kiểm kết quả của chúng tôi đều phù hợp với UK NEQAS.

Bảng 4. Kết quả ngoại kiểm xét nghiệm đột biến gene NPM1

Lần thứ	Phương pháp	Kết quả của UK NEQAS	Kết quả do bộ sinh phẩm của Bệnh viện TƯQĐ 108 tạo ra
1	Định tính	+	+

2	Định tính	-	-
---	-----------	---	---

Nhận xét: Cả 2 lần ngoại kiểm kết quả của chúng tôi đều phù hợp với UK NEQAS.

Bảng 5. Kết quả ngoại kiểm xét nghiệm đột biến gene PML-RARA

Lần thứ	Phương pháp	Kết quả của UK NEQAS	Kết quả do bộ sinh phẩm của Bệnh viện TƯQĐ 108 tạo ra
1	Định tính	-	-

Nhận xét: 1 lần ngoại kiểm kết quả của chúng tôi phù hợp với UK NEQAS.

Bảng 6. Kết quả ngoại kiểm xét nghiệm đột biến gene CBFB-MYH11

Lần thứ	Phương pháp	Kết quả của UK NEQAS	Kết quả do bộ sinh phẩm của Bệnh viện TƯQĐ 108 tạo ra
1	Định tính	+	+
2	Định tính	-	-

Nhận xét: Cả 2 lần ngoại kiểm kết quả của chúng tôi đều phù hợp với UK NEQAS.

Bảng 7. Kết quả ngoại kiểm xét nghiệm đột biến gene AML1-ETO

Lần thứ	Phương pháp	Kết quả của UK NEQAS	Kết quả do bộ sinh phẩm của Bệnh viện TƯQĐ 108 tạo ra
1	Định tính	+	+
2	Định tính	-	-
3	Định tính	-	-

Nhận xét: Cả 3 lần ngoại kiểm kết quả của chúng tôi đều phù hợp với UK NEQAS.

Bảng 8. Kết quả ngoại kiểm xét nghiệm đột biến gene MLL-AF4

Lần thứ	Phương pháp	Kết quả của UK NEQAS	Kết quả do bộ sinh phẩm của Bệnh viện TƯQĐ 108 tạo ra
1	Định tính	+	+
2	Định tính	-	-
3	Định tính	-	-
4	Định tính	-	-

Nhận xét: Cả 4 lần ngoại kiểm kết quả của chúng tôi đều phù hợp với UK NEQAS.

4. Bàn luận

Trong y học người ta vẫn nói: “Thà không có xét nghiệm còn hơn là xét nghiệm có kết quả sai”, bởi vì khi xét nghiệm cho kết quả sai thì sẽ dẫn đến những hậu quả khôn lường và làm mất đi nhiều cơ hội

trong chẩn đoán và điều trị. Do đó, sau khi đã triển khai xét nghiệm thì việc vô cùng quan trọng là phải đánh giá độ chính xác. Trong nhiều biện pháp đánh giá chất lượng xét nghiệm thì ngoại kiểm là một trong những phương pháp khách quan, có độ tin cậy cao. Vấn đề là không phải tất cả các trung tâm kiểm chuẩn đều có thể thực hiện được đầy đủ các xét nghiệm. Cho đến hiện nay các trung tâm kiểm chuẩn Việt Nam vẫn chưa có chương trình ngoại

kiểm cho các xét nghiệm về sinh học phân tử, đặc biệt là những xét nghiệm liên quan đến xác định gene trong điều trị đích. Qua tìm hiểu chúng tôi được biết UK NEQAS là trung tâm uy tín nhất trên thế giới có thực hiện các dịch vụ ngoại kiểm này. Do đó, chúng tôi đã tiến hành đăng ký và được chấp nhận để tham gia ngoại kiểm (mã phòng thí nghiệm UK NEQAS 44208).

Do tính chất của các đột biến gene là khác nhau, có thể là chuyển đoạn gene, đột biến điểm, đột biến mất đoạn, hay thêm đoạn... nên kỹ thuật phát hiện các đột biến đó là khác nhau. Đồng thời, nhu cầu đòi hỏi của các thầy thuốc lâm sàng có thể chỉ cần biết có hay không có đột biến thì người làm xét nghiệm chỉ cần thực hiện phương pháp định tính. Trong khi đó, nếu muốn theo dõi và đánh giá kết quả điều trị thì người ta phải biết tỷ lệ đột biến gene trong số gene bình thường. Khi đó người làm xét nghiệm phải thực hiện phương pháp định lượng. Trong nghiên cứu này, hầu hết yêu cầu chỉ cần biết là có hay không có các đột biến đó, vì vậy chúng tôi tiến hành phương pháp định tính. Kết quả cho thấy, tất cả các xét nghiệm định tính của chúng tôi đều chính xác 100% so với mẫu chuẩn. Đây là một kết quả rất đáng ghi nhận, vì với yêu cầu rất cao của UK NEQAS mà đạt 100% là điều không phải lúc nào cũng làm được. Trong khi có những xét nghiệm chúng tôi đã thực hiện 6 lần đều cho kết quả 100%.

Ngoài Khoa Sinh học phân tử - Bệnh viện TWQĐ 108, còn có khoảng 60 - 80 các phòng thí nghiệm khác trên toàn thế giới là khách hàng thường quy của UK NEQAS, và trong cùng đợt kiểm chuẩn với chúng tôi, đã có 8 - 10 phòng thí nghiệm báo cáo sai kết quả ở các panel di truyền học khác nhau. Điều này thể hiện tính chất khó khăn trong duy trì chất lượng xét nghiệm di truyền học phân tử nói chung trên toàn thế giới.

Chỉ riêng xét nghiệm định lượng chuyển gene BCR-ABL thì có sự khác biệt khi tỷ lệ gene đột biến quá thấp (dưới 0,1%) trong mẫu. Tuy nhiên, với ngưỡng phát hiện trên 1% thì xét nghiệm của chúng

tôi luôn luôn phát hiện được. Điều đó có nghĩa chỉ cần 1 gene mang đột biến trong tổng số 100 gene trong mẫu là chúng tôi có thể phát hiện được. Kết quả này là đủ độ tin cậy cho các thầy thuốc lâm sàng, vì nghiên cứu cho thấy hầu hết bệnh nhân có triệu chứng lâm sàng khi tỷ lệ gene đột biến thường vượt quá 10% [2], [4].

5. Kết luận

Chúng tôi đã xây dựng thành công xét nghiệm phát hiện chuyển gene AML1-ETO, PML-RARA, Tel-AML1, BCR-ABL, CBFB-MYH11 và đột biến Jak2 V617F, NPM-1, FLT3 với độ chính xác 100% so với panel chuẩn do UK NEQAS cung cấp. Phương pháp định lượng BCR-ABL có thể định lượng được chính xác các mẫu có tỷ lệ trên 1%.

Lời cảm ơn: Nhóm nghiên cứu xin cảm ơn Bộ Khoa học Công nghệ, chương trình KC10/16-20 đã tài trợ cho đề tài KC10.13/16-20.

Tài liệu tham khảo

1. Barbui T et al (2018) *The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: Document summary and in-depth discussion*. Blood Cancer J 8(2): 15.
2. Branford S et al (2008) *Desirable performance characteristics for BCR-ABL measurement on an international reporting scale to allow consistent interpretation of individual patient response and comparison of response rates between clinical trials*. Blood 112(8): 3330-3338.
3. Vigneri P et al (2017) *High BCR-ABL/GUS(1S) levels at diagnosis of chronic phase CML are associated with unfavorable responses to standard-dose imatinib*. Clin Cancer Res 23(23): 7189-7198.
4. Zhang J et al (2018) *Early BCR-ABL1 decline in imatinib-treated patients with chronic myeloid leukemia: Results from a multicenter study of the Chinese CML alliance*. Blood Cancer J 8(7): 61.