

XÉT NGHIỆM SÀNG LỌC NGƯỜI MANG GEN BỆNH TAN MÁU BẨM SINH (THALASSEMIA) SỬ DỤNG PHỔ HẤP THỤ PHÂN TỬ

Mai Anh Tuấn, Hà Tuấn Duy, Nguyễn Minh Quân,
Bùi Thị Thu Hương*, Đặng Văn Thành, Nguyễn Tiến Dũng
Trường Đại học Y Dược – Đại học Thái Nguyên

*Email: huongbuihithu@tmmc.edu.vn

Ngày nhận bài: 28/5/2024

Ngày phản biện: 29/7/2024

Ngày duyệt đăng: 10/8/2024

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Bước đầu thử nghiệm phân biệt độ đục của thuốc thử trong xét nghiệm OF test bằng phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử. Nghiên cứu hướng tới việc định lượng hóa xét nghiệm định tính từ đó có thể đưa ra các chỉ số đánh giá độ chính xác của xét nghiệm như độ nhạy độ đặc hiệu của phương pháp đo. **Mục tiêu nghiên cứu:** Đánh giá giá trị xét nghiệm sàng lọc người mang gen bệnh tan máu bẩm sinh sử dụng quang phổ hấp thụ phân tử. **Đối tượng, phương pháp nghiên cứu:** 80 mẫu máu tĩnh mạch người bình thường và người mang gen bệnh thalassemia, thực hiện tại labo Bộ môn Sinh hóa - và labo bộ môn Vật lý – Lý sinh trường Đại Học Y Dược. **Kết quả:** Tuổi trung bình đối tượng nghiên cứu là $30\pm 4,5$. Độ hấp thụ quang trung bình tại đỉnh có bước sóng 416 nm của mẫu âm tính là $3,45 \pm 0,31$, của mẫu dương tính là $2,1\pm 0,78$, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. OF test cho độ nhạy và độ đặc hiệu lần lượt là 85,2% và 80,0%. Diện tích dưới đường cong ROC (AUC) của Abs416=0,9; AUC của OF test là 0,725 ($p<0,05$). **Kết luận:** Đỉnh hấp thụ ở bước sóng 416 nm cho giá trị tiên lượng tốt nhất với diện tích dưới đường cong ROC = 0,90 trong khi của OF test chỉ đạt 0,725 khi so sánh với đường chuẩn. Sự khác biệt là có ý nghĩa thống kê.

Từ khóa: OF test, độ hấp thụ quang, thalassemia, phổ hấp thụ phân tử.

ABSTRACT

SCREENING FOR THALASSEMIA CARRIERS USING MOLECULAR ABSORPTION SPECTROSCOPY

Mai Anh Tuan, Ha Tuan Duy, Nguyen Minh Quan,
Bui Thi Thu Huong*, Dang Van Thanh, Nguyen Tien Dung
University of Medicine and Pharmacy - Thai Nguyen University

Background: The first step is to test the turbidity of the reagents in the OF test by molecular adsorption spectroscopy. The research aims to quantify the qualitative test from which it is possible to provide the indicators to evaluate the accuracy of the test such as the sensitivity and specificity of the measurement method. **Objective:** To evaluate the value of screening test for carriers of congenital hemolytic disease using molecular absorption spectroscopy. **Materials and methods:** 80 samples of venous blood from normal people and people carrying thalassemia gene, performed at the Department of Biochemistry - and the laboratory of Physics - Biophysics of the University of Medicine and Pharmacy. **Results:** The mean age of study subjects was 30 ± 4.5 . The average optical absorbance at the 416 nm peak of the negative sample is 3.45 ± 0.31 , of the positive sample is 2.1 ± 0.78 , the difference is statistically significant. OF test showed sensitivity and specificity of 85.2% and 80.0%, respectively. Area under the ROC curve (AUC) of Abs416=0.9; The AUC of the OF test was 0.725 ($p<0.05$). **Conclusion:** The absorption peak at 416 nm gives the best prognostic value with the area under the curve ROC = 0.90 while that of the OF test is only 0.725 when compared with the standard curve. The difference is statistically significant.

Keywords: OF test, optical absorbance, thalassemia, molecular absorption spectrum.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thalassemia là nhóm bệnh lý di truyền dòng hồng cầu do đột biến nhiễm sắc thể thường trên các gen tổng hợp phân tử hemoglobin gây ra và đây là bệnh có tỷ lệ mắc cao trên thế giới cũng như tại Việt Nam [1], [2]. Cơ chế gây bệnh là do các đột biến gen dẫn đến sự thiếu hoặc không tổng hợp các chuỗi globin tương ứng làm thiếu hụt phân tử hemoglobin trong hồng cầu. Mặt khác sự dư thừa các chuỗi globin tương ứng sẽ ảnh hưởng đến tính bền vững của màng hồng cầu dẫn đến hiện tượng tan máu.

Xét nghiệm OF (Osmotic fragility) là một phương pháp sàng lọc nhanh bệnh tan máu bẩm sinh được Bộ Y tế khuyến cáo sử dụng tại cộng đồng với giá thành rẻ và kỹ thuật xét nghiệm đơn giản [3]. Đây là xét nghiệm dựa trên việc đo sức bền thẩm thấu màng hồng cầu bằng nước muối 1 nồng độ để nhận diện hồng cầu của người bệnh. Trong khi hồng cầu của người bình thường tan hoàn toàn ở một nồng độ muối phù hợp (0,34%-0,36%) thì hồng cầu của người bệnh thalassemia sẽ không tan hoàn toàn ở cùng nồng độ. Tuy nhiên, việc nhận định vẫn dựa vào mắt thường không tránh khỏi các sai số do điều kiện ánh sáng, kinh nghiệm và chủ quan của người đọc kết quả. Do đó, nghiên cứu này tiến hành thử nghiệm phân biệt độ đục tạo ra bởi hồng cầu trong xét nghiệm OF test bằng phương pháp đo phổ hấp thụ phân tử. Dựa vào cấu tạo phân tử hemoglobin của hồng cầu có chứa các liên kết hoá trị có tính hấp thụ ánh sáng cực đại ở các mức bước sóng nhất định khi đo bằng quan phổ UV-VIS [4]. Lượng ánh sáng hấp thụ cho thấy sự hiện diện của hồng cầu về số lượng và được máy quang phổ ghi lại dưới dạng số liên tục thay vì định tính bằng mắt thường như xét nghiệm OF. Nghiên cứu hướng tới việc định lượng hóa xét nghiệm định tính từ đó có thể đưa ra các chỉ số đánh giá độ chính xác cũng như độ nhạy, độ đặc hiệu của phương pháp đo phổ hấp thụ phân tử trong việc sàng lọc người mang gen thalassemia. Nghiên cứu nhằm mục tiêu: Đánh giá giá trị xét nghiệm sàng lọc người mang gen bệnh tan máu bẩm sinh sử dụng quang phổ hấp thụ phân tử.

2. ĐỐI TƯỢNG, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu:

80 mẫu máu tĩnh mạch người bình thường và người mang gen bệnh thalassemia.

2.2. Phương pháp thực hiện nghiên cứu

Phương pháp nghiên cứu mô tả cắt ngang.

Phương pháp chọn mẫu chủ đích với cỡ mẫu là 80 mẫu máu tĩnh mạch trong đó bao gồm 40 mẫu máu của người bình thường (âm tính với thalassemia) và 40 mẫu máu của người bệnh thalassemia.

Việc xác định mẫu âm tính và dương tính được thực hiện bằng xét nghiệm điện di huyết sắc tố theo quy trình chuẩn [5].

Tiêu chuẩn chẩn đoán thalassemia: Dựa trên xét nghiệm điện di huyết sắc tố. Các mẫu âm tính với thalassemia nếu tỷ lệ $HbA_2 < 3,5\%$ và không có sự hiện diện của các huyết sắc tố bất thường. Các mẫu dương tính được xác định nếu tỷ lệ $HbA_2 > 3,5\%$ và/hoặc xuất hiện các huyết sắc tố bất thường (HbH, HbE, HbD, HbS, HbCS, Hb Bart's ...) [6],[7].

Toàn bộ mẫu nghiên cứu được thực hiện xét nghiệm OF (NaCl 0,36%) và sau đó xét nghiệm đo quang phổ hấp thụ phân tử. Đánh giá giá trị chẩn đoán của phương pháp đo quang phổ hấp thụ bằng tính toán độ nhạy, đặc hiệu, diện tích dưới đường ROC của phương pháp và so sánh với độ nhạy, đặc hiệu của xét nghiệm OF đơn thuần.

Xét nghiệm đo phổ hấp thụ: 30 ul máu toàn phần được pha loãng trong 3ml nước muối nồng độ 0,36% (OF test) chứa sẵn trong ống nghiệm. Sau đó, phổ của các mẫu được khảo sát được ghi lại bằng máy quang phổ model JASCOW UV/VIS /NIR V-570 tại Labo Vật lý Lý sinh, trường Đại học Y dược Thái Nguyên (TUMP). Dải phổ nằm trong khoảng từ 200 đến 700 nm (dải hấp thụ của Hb) với mẫu nước muối 0,36% làm đối chứng. Các giá trị độ hấp thụ được xác định bằng phương pháp đường cơ sở. Trong phương pháp này, người ta thả một đường thẳng đứng từ cực đại hấp thụ xuống đường tiếp tuyến tùy ý về giữa hai cánh của dải. Chiều cao của vạch này thể hiện giá trị độ hấp thụ thực tế của dải hấp thụ.

- Chỉ số nghiên cứu:

+ Chỉ số xét nghiệm điện di huyết sắc tố xác định thalassemia:

Âm tính: HbA₂ ≤ 3,5%, không có HST bất thường

Dương tính: HbA₂ > 3,5% và hoặc có HST bất thường

+ Chỉ số đo hấp thụ phân tử (Abs) ở các đỉnh tương ứng với các bước sóng 266, 344, 416, 542, 577 là các bước sóng đặc trưng cho hemoglobin [4].

+ Chỉ số xét nghiệm OF:

Âm tính: Quan sát bằng mắt thường thấy dung dịch thuốc thử trong suốt, có thể đọc được chữ sau ống nghiệm

Dương tính: Quan sát bằng mắt thường dung dịch thuốc thử OF vẫn đục, không thể đọc được chữ sau ống nghiệm. Các trường hợp đọc được chữ sau ống nghiệm nhưng chữ bị mờ vẫn được đánh giá như mẫu dương tính.

Giá trị của xét nghiệm sàng lọc: Độ nhạy (%), độ đặc hiệu (%), Diện tích dưới đường cong ROC (AUC).

- Phương pháp phân tích số liệu:

Số liệu được phân tích bằng phần mềm SPSS phiên bản 25.

Tỷ lệ % được sử dụng mô tả biến số định tính. Giá trị trung bình, độ lệch chuẩn dùng cho biến số định lượng. T – test độc lập được dùng để so sánh trung bình độ hấp thụ phân tử của các mẫu xét nghiệm bình thường với mẫu xét nghiệm của người mang gen bệnh thalassemia.

- Thời gian và địa điểm nghiên cứu: Nghiên cứu được thực hiện tại labo Bộ môn Sinh hóa - và labo bộ môn Vật lý – Lý sinh Trường Đại Học Y Dược Thái Nguyên.

- Đạo đức trong nghiên cứu: Nghiên cứu được sự chấp thuận của Hội đồng Y đức của trường Đại học Y Dược Thái Nguyên. Số liệu nghiên cứu được mã hoá và chỉ dùng cho mục đích nghiên cứu.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Bảng 1. Đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu

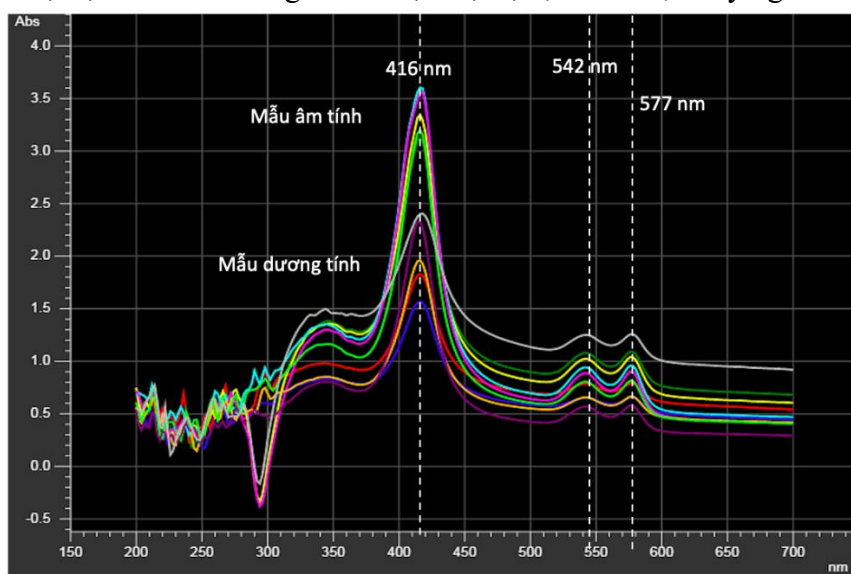
Biến số		n	%
Tuổi trung bình, SD		35±4,5	
Giới	Nam	42	52,5
	Nữ	38	47,5
Dân tộc	Kinh	29	36,2
	Thiểu số	51	63,8

Nhận xét: Tuổi trung bình đối tượng nghiên cứu là 30±4,5.

Bảng 2. Đặc điểm đo quang phổ hấp phụ phân tử của mẫu nghiên cứu

Bước sóng	Âm tính (n=40)		Dương tính (n=40)		p t test
	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Trung bình	Độ lệch chuẩn	
Abs 266nm	0,96	0,25	0,88	0,12	>0,05
Abs 314nm	1,30	0,23	0,93	0,25	>0,05
Abs 416nm	3,45	0,31	2,1	0,78	<0,05
Abs 542nm	0,53	0,28	0,368	0,017	>0,05
Abs 577nm	0,547	0,28	0,349	0,018	>0,05

Nhận xét: Độ hấp thụ quang trung bình tại đỉnh có bước sóng 416 nm của mẫu âm tính là $3,45 \pm 0,31$, của mẫu dương tính là $2,1 \pm 0,78$, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.



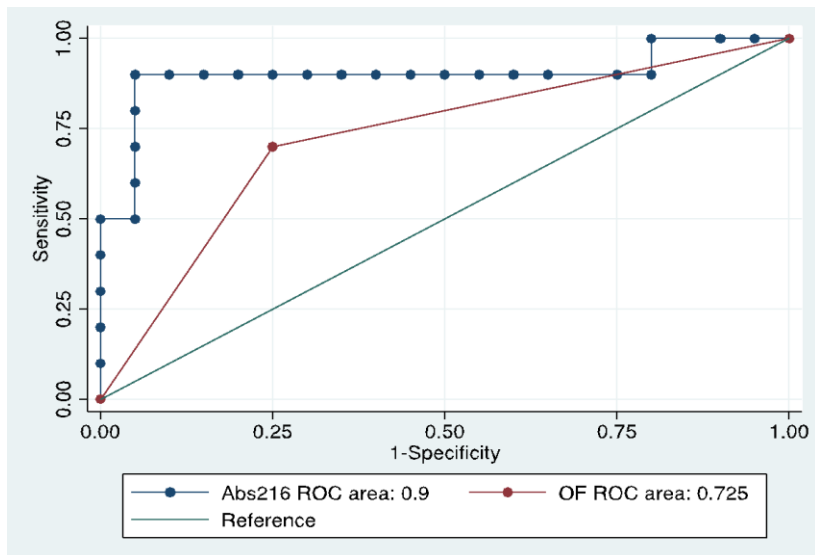
Hình 1. Kết quả đo quang phổ hấp phụ

Hình 1 là quang phổ UV/VIS của hemoglobin đo trên 5 mẫu bình thường và 5 mẫu thalassemia. Sự hiện diện rõ ràng của 3 đỉnh hấp thụ cực đại ở bước sóng 416nm, 542 nm và 577 nm. Dải Soret (màu xanh tím) xuất hiện ở bước sóng 416 nm là do sự chuyển đổi từ $\Pi \rightarrow \Pi^*$ của vòng porphyrin. Hai dải ở khoảng 577 và 542 nm cho thấy sự hiện diện của oxy-hemoglobin (HbO₂) [4],[5],[8],[9]. Các bước sóng khác ở 266nm và 314 nm (đặc trưng cho vòng thơm) khó quan sát trên biểu đồ khi chạy với nhiều mẫu. Trên hình 1, các mẫu dương tính thalassemia có bước sóng 416nm đều trên 3.0Abs trong khi các mẫu âm tính đều có bước sóng 416nm từ 1,5 ~ 2,5 Abs.

Bảng 3. Độ nhạy, đặc hiệu của xét nghiệm OF đơn thuần

Điện di HST OF test	Độ nhạy (%)	Độ đặc hiệu (%)	AUC
OF test	85,2	80,0	0,826
Quang phổ hấp thụ ở 416nm	94,3	98,7	0,900

Nhận xét: OF test cho độ nhạy, độ đặc hiệu và AUC lần lượt là 85,2%, 80,0% và 0,826. Quang phổ hấp thụ ở 416nm cho độ nhạy, độ đặc hiệu và AUC lần lượt là 94,3%, 98,7% và 0,900.



Hình 2. So sánh giá trị chẩn đoán của xét nghiệm đo quang phổ hấp phụ ở bước sóng 416nm với xét nghiệm OF đơn thuần

Nhận xét: Diện tích dưới đường cong ROC (AUC) của Abs416= 0,9; AUC của OF test là 0,725 ($p < 0,05$).

IV. BÀN LUẬN

Nghiên cứu này đã thực hiện phân tích quang phổ của hemoglobin ở hai nhóm là mẫu máu của người bình thường (không mang gen thalassemia) và người bệnh tan máu bẩm sinh (mang gen thalassemia) nhằm mục đích cải thiện chính xác của xét nghiệm đo sức bền thẩm thấu màng hồng cầu bằng nước muối 1 nồng độ (OF test). OF là 1 xét nghiệm định tính, nhận định kết quả bằng mắt thường. Thuốc thử OF test làm cho tế bào hồng cầu của người bình thường vỡ hoàn toàn sau 1 khoảng thời gian nhất định và giải phóng hemoglobin vào dung môi và được lượng hoá bằng đo hấp phụ quang phổ ở bước sóng 200-700nm, được biết đến là dải hấp thụ đặc trưng của hemoglobin. Với người bệnh thalassemia, hồng cầu có đặc điểm là nhỏ nhược sắc và màng hồng cầu xơ cứng làm cho hồng cầu khó vỡ trong thuốc thử OF, hồng cầu không vỡ này lắng xuống đáy cuvet (dung cụ đựng mẫu đo quang phổ) mang theo một lượng lớn Hb dẫn đến nồng độ Hb tan trong dung dịch thuốc thử OF của người mang gen thalassemia thấp hơn người lành thể hiện qua độ hấp phụ Hb ở các đỉnh tương ứng. Sự khác biệt đó được lượng hoá bằng con số cụ thể sẽ giúp cho việc xác định các ngưỡng chẩn đoán chính xác và khoa học hơn là bằng mắt thường [4].

Qua nghiên cứu 80 mẫu bệnh phẩm, chúng tôi thu được các kết quả được lý giải như sau. Kết quả bảng 1 cho thấy tuổi trung bình của đối tượng nghiên cứu là $35 \pm 4,5$ tuổi, tỷ lệ nam nữ tương đương nhau và dân tộc thiểu số nhiều hơn dân tộc kinh. Nghiên cứu này tập trung vào phân biệt mẫu bình thường và mẫu bệnh nên chúng tôi chủ động chọn nhóm bệnh và nhóm chứng theo tỷ lệ 1:1. Do vậy các kết quả về tuổi, giới, dân tộc trong nghiên cứu không dùng ngoại suy cho quần thể và có thể không tương đồng với các nghiên cứu chọn mẫu ngẫu nhiên. Đồng thời, các mẫu bệnh được chọn trong nghiên cứu đều ở thể người lành mang gen (di hợp tử đơn) nên tuổi trung bình sẽ cao hơn so với các nghiên cứu trên nhóm trẻ bệnh cần điều trị truyền máu thải sắt (thể đồng hợp tử hoặc dị hợp tử kép).

Bảng 3.2 cho và hình 3.1 cho thấy có 5 đỉnh hấp phụ phát hiện được, kết quả này phù hợp với y văn khi đo quang phổ của hemoglobin [10]. Phổ UV/VIS cho thấy năm đỉnh hấp thụ cực đại (Peak) ở các bước sóng 266 nm, 314 nm, 416 nm, 542 nm và 577 nm. Các đỉnh hấp thụ cho thấy sự hiện diện của các nhóm chức C = O trong các vòng thơm của nhân Hem, sự hấp thụ của nhóm chức C = O nằm trong dải bước sóng từ 200-700nm. Kết quả so sánh khi đo mẫu thường và mẫu bệnh được ghi nhận ở bảng 3.2, trong đó đỉnh có bước sóng 416 nm (Soret band) có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê rõ ràng giữa nhóm người bệnh và không bệnh. Cụ thể, nhóm bệnh có độ hấp thụ ($Abs_{416}=2,1\pm 0,78$) thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm người bình thường ($Abs_{416}=3,45\pm 0,31$). Chúng tôi sử dụng giá trị hấp phụ Hb tại các đỉnh trên làm marker cho sàng lọc người mang gen tan máu bẩm sinh bằng cách đối chiếu với kết quả điện di huyết sắc tố. Thiết lập đường cong ROC và tính diện tích dưới đường cong ROC sẽ cho biết giá trị của 1 xét nghiệm sàng lọc so với xét nghiệm chẩn đoán. Kết quả diện tích dưới đường cong ROC chạy từ 0-1 và càng gần giá trị 1, phương pháp xét nghiệm sàng lọc càng cho kết quả tối ưu nhất. Kết quả cho thấy đỉnh hấp phụ ở bước sóng 416 nm cho giá trị tiên lượng tốt nhất với diện tích dưới đường cong ROC = 0,90 trong khi của OF test chỉ đạt 0,826 khi so sánh với đường chuẩn. Sự khác biệt là có ý nghĩa thống kê. (Hình 2)

Qua thực nghiệm và phân tích số liệu đối chiếu với test sàng lọc OF, chúng tôi nhận thấy sử dụng phương pháp đo quang phổ hấp thụ cho giá trị sàng lọc tốt hơn OF test trong việc phát hiện người mang gen thalassemia. Số liệu từ nghiên cứu khuyến cáo ngưỡng $Abs_{416}=2,1\pm 0,78$ được khuyến cáo sàng lọc dương tính với thalassemia.

Nghiên cứu có hạn chế về cỡ mẫu thuận tiện (n=80) đồng thời tiêu chuẩn xác định bệnh mới dừng ở điện di huyết sắc tố vốn chỉ cho biết các thể beta thalassemia và alpha thalassemia thể trung gian hoặc nặng. Phần lớn các thể mang gen alpha thalassemia không thể phát hiện bằng điện di huyết sắc tố. Cần mở rộng nghiên cứu với cỡ mẫu lớn hơn và sử dụng xét nghiệm DNA làm đối chứng với các thể mang gen alpha thalassemia.

V. KẾT LUẬN

Tuổi trung bình đối tượng nghiên cứu là $30\pm 4,5$. Độ hấp thụ quang trung bình tại đỉnh có bước sóng 416 nm của mẫu âm tính là $3,45 \pm 0,31$, của mẫu dương tính là $2,1\pm 0,78$, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. OF test cho độ nhạy và độ đặc hiệu lần lượt là 85,2% và 80,0%. Đỉnh hấp phụ ở bước sóng 416 nm cho giá trị tiên lượng tốt nhất với diện tích dưới đường cong ROC = 0,90 trong khi của OF test chỉ đạt 0,725 khi so sánh với đường chuẩn. Sự khác biệt là có ý nghĩa thống kê.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Weatherall, D.J.C., J. B., Inherited hemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bull World Health Organ.* 2001. 79(8), 704-12, doi: 10.1080/03014460500075480.
2. Trục, D.B., Tình hình bệnh thalassemia và bệnh hemoglobin ở người Mường tại Hòa Bình. *Tạp chí Y Học Việt Nam*, 2010. 2, 47-51.
3. Vân, V.T.B., Nghiên cứu tỷ lệ mang gen beta thalassemia và mối liên hệ với một số chỉ số hồng cầu ngoại vi ở trẻ em dân tộc Tày và Dao huyện Định Hóa tỉnh Thái Nguyên. *Tạp chí Y Học Việt Nam*. 2010. 2, 51-55.
4. Ismail, M. and N.G. Patel, Effectiveness of naked eye single tube osmotic fragility test for screening of β -thalassemia trait from north Maharashtra region. *India*. 2017. 3(5), 6, doi: <https://doi.org/10.18203/2394-6040.ijcmph20161394>.

5. O'Riordan, S., et al., Large scale screening for haemoglobin disorders in southern Vietnam: implications for avoidance and management. *Br J Haematol.* 2010. 150(3), 359-64, doi: 10.1111/j.1365-2141.2010.08237.
 6. Old J, Hartevelde CL, Traeger-Synodinos J, et al. Prevention of Thalassaemias and Other Haemoglobin Disorders: Volume 2: Laboratory Protocols [Internet]. 2nd edition. Nicosia (Cyprus): Thalassaemia International Federation; 2012. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190576>.
 7. Hải, L.X., Nghiên cứu giá trị xét nghiệm sàng lọc thalassemia bằng nước muối 1 nồng độ trong nhóm bệnh nhân và người khám sức khỏe tại Viện Huyết học Truyền máu Trung Ương. *Tạp chí Y học Việt Nam.* 2015. 448, 36-44.
 8. Sangkitporn, S., et al., Validation of osmotic fragility test and dichlorophenol indophenol precipitation test for screening of thalassemia and Hb E. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2005. 36(6), 1538-42, PMID: 16610659.
 9. Khera, R., et al., HPLC in characterization of hemoglobin profile in thalassemia syndromes and hemoglobinopathies: a clinico haematological correlation. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2015. 31(1), 110-5, doi: 10.1007/s12288-014-0409-x.
 10. Khosa, S.M., et al., Comparative analysis of cellulose acetate hemoglobin electrophoresis and high-performance liquid chromatography for quantitative determination of hemoglobin A2. *Blood Res.* 2015. 50(1), 46-50, doi: 10.5045/br.2015.50.1.46.
-