

Nghiên cứu

Ứng dụng kỹ thuật Digital PCR trong xét nghiệm đột biến gen tại Bệnh viện Phổi Trung ương: Từ quy trình chuẩn đến kinh nghiệm xử lý sự cố thực tế

Nguyễn Văn Duy*, Phạm Thị Thu Phương, Phan Thị Liên

Bệnh viện Phổi Trung ương

*Tác giả liên hệ (Corresponding author): Nguyễn Văn Duy; Email: duynguyentkyh@gmail.com

Ngày nhận bài (Received): 03/05/2026; Ngày duyệt đăng (Accepted): 20/06/2026; Ngày xuất bản (Published): 10/08/2026

DOI:10.34071/jmp.2026.S-2.23

Tóm tắt

Mục tiêu: Mô tả kết quả triển khai kỹ thuật Digital PCR (dPCR) trong phát hiện đột biến gen ở người bệnh ung thư phổi và tổng kết kinh nghiệm quản lý chất lượng theo tiêu chuẩn ISO 15189:2022 tại Bệnh viện Phổi Trung ương.

Phương pháp: Nghiên cứu mô tả cắt ngang kết hợp tổng kết kinh nghiệm triển khai, dữ liệu vận hành kỹ thuật Digital PCR tại Bệnh viện Phổi Trung ương.

Kết quả: Từ tháng 08/2025 - tháng 04/2026, 441 mẫu (gồm 380 mẫu FFPE và 61 mẫu huyết tương) đã được thực hiện xét nghiệm Digital PCR (dPCR): 1) Tỷ lệ đột biến gen: Tỷ lệ đột biến gen *EGFR* mẫu huyết tương: 56%; Tỷ lệ đột biến gen *EGFR* mẫu FFPE: 52%; Tỷ lệ đột biến gen của mẫu FFPE trên cả 3 Panel ung thư phổi: 29%. 2) Kết quả thực hiện Phê duyệt phương pháp và so sánh liên phòng trên 10 mẫu FFPE đều cho thấy sự phù hợp với các phương pháp tham chiếu. 3) Ghi nhận 12 lỗi trong tổng số 441 xét nghiệm Digital PCR được thực hiện (khoảng 2,7%)

Kết luận: Digital PCR có khả năng phát hiện và định lượng các đột biến gen ở mức siêu nhạy ($VAF < 0,1\%$), giúp tăng khả năng xác định đột biến cho các mẫu sinh thiết nhỏ, huyết tương. Việc triển khai theo tiêu chuẩn ISO 15189:2022 bảo đảm độ tin cậy của xét nghiệm; các sự cố kỹ thuật chủ yếu có thể kiểm soát thông qua chuẩn hóa quy trình tiền phân tích và vận hành.

Từ khóa: PCR kỹ thuật số; ung thư phổi; giải phẫu bệnh; đột biến gen; Bệnh viện Phổi Trung ương.

Application of Digital PCR technique in gene mutation testing at the National Lung Hospital: From standard procedures to practical incident handling experience

Nguyen Van Duy*, Pham Thi Thu Phuong, Phan Thi Lien

National Lung Hospital

Abstract

Objective: To describe the results of implementing Digital PCR (dPCR) in detecting gene mutations in lung cancer patients and to summarize the experience of quality management according to ISO 15189:2022 standards at the National Lung Hospital.

Method: A descriptive cross-sectional study combining the experience of implementation and operational data of Digital PCR at the National Lung Hospital.

Results: Digital PCR (dPCR) testing was performed from August 2025 to April 2026: 1) Gene mutation rate - *EGFR* gene mutation rate in plasma samples: 56%; *EGFR* gene mutation rate in FFPE samples: 52%; Gene mutation rate of FFPE samples across all three lung cancer panels: 29%. 2) Results: Results of Method Approval and Interlaboratory Comparison on 10 FFPE samples showed consistency with reference methods. 3) 12 errors were recorded in the total of 441 Digital PCR tests performed (2.7%)

Conclusion: Digital PCR has the ability to detect and quantify gene mutations at a highly sensitive level ($VAF < 0.1\%$), improving the ability to identify mutations in small biopsy and plasma samples. Implementing the ISO 15189:2022 standard ensures the reliability of the test; major technical issues can be controlled through standardization of pre-analytical and operational procedures.

Keywords: Digital PCR; lung Cancer; pathology; genetic mutation; National Lung Hospital.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư phổi (UTP) đã trở thành căn nguyên có tỷ lệ mắc và tử vong cao hàng đầu trong các ung thư thường gặp [1]. Sự phát triển mạnh mẽ của sinh học phân tử trong những thập kỷ gần đây đã bổ sung các công cụ quan trọng cho chiến lược điều trị ung thư phổi, góp phần chuyển dịch mô hình từ hóa trị liệu truyền thống sang hướng tiếp cận y học chính xác [2]. Tuy nhiên, một thách thức lớn là đa số người bệnh UTP phát hiện bệnh ở giai đoạn muộn, các mẫu mô thu thập qua nội soi phế quản, sinh thiết kim xuyên thành ngực thường có kích thước rất nhỏ, lượng tế bào u ít và bị ảnh hưởng bởi các tế bào viêm hoặc mô lành. Thêm vào đó, việc theo dõi tiến triển của khối u và phát hiện sớm các đột biến kháng thuốc thông qua sinh thiết lỏng (ctDNA) cũng đòi hỏi những kỹ thuật có độ nhạy cao. Các phương pháp Real-time PCR thông thường, với giới hạn phát hiện (LOD) dao động từ 1% đến 5%, thường bộc lộ hạn chế trong việc phát hiện các đột biến ở tần số thấp, dẫn đến nguy cơ âm tính giả và làm mất đi cơ hội điều trị quý giá của người bệnh. Sự ra đời của kỹ thuật Digital PCR (dPCR) đã tạo nên một bước ngoặt mang tính cách mạng trong việc chuyển đổi từ xét nghiệm định tính, bán định lượng sang định lượng tuyệt đối ở cấp độ phân tử [3]. Với nguyên lý chia nhỏ một phản ứng PCR duy nhất thành hàng chục ngàn vi phản ứng độc lập trong các vi giọt, dPCR cho phép định lượng tuyệt đối số lượng bản sao DNA mà không cần sử dụng đường cong chuẩn. Đặc biệt, dPCR thể hiện ưu thế vượt trội trong việc phát hiện các tần số alen đột biến (VAF) ở mức cực thấp (VAF $\leq 0,1\%$). Tại Bệnh viện Phổi Trung ương, chúng tôi đã triển khai hệ thống xét nghiệm dPCR với panel 11 gen (*EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *MET*, *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *HER-2*, *RET*, *NTRK*) trong UTP cho mẫu FFPE và *EGFR* cho mẫu huyết tương. Tuy nhiên, bên cạnh các ưu điểm vượt trội mà kỹ thuật này đem lại thì cũng xuất hiện khá nhiều các sự cố kỹ thuật có thể dẫn đến sự sai lệch kết quả. Bởi vậy, chúng tôi trình bày nghiên cứu này với 3 mục tiêu: 1) Xác định tỷ lệ đột biến gen khi thực hiện kỹ thuật Digital PCR; 2) Mô tả quy trình vận hành và quản lý chất lượng Digital PCR theo tiêu chuẩn ISO 15189:2022; 3) Phân tích các lỗi thường gặp khi vận hành và cách khắc phục phòng ngừa.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả cắt ngang kết hợp tổng kết kinh nghiệm triển khai kỹ thuật Digital PCR trong xét nghiệm đột biến gen tại Trung tâm Giải phẫu bệnh -

Sinh học phân tử, Bệnh viện Phổi Trung ương.

Nghiên cứu tập trung đánh giá toàn diện quá trình triển khai xét nghiệm dPCR từ xây dựng quy trình vận hành chuẩn, kiểm soát chất lượng xét nghiệm, phê duyệt phương pháp, so sánh liên phòng đến nhận diện và xử lý các sự cố kỹ thuật phát sinh trong thực tế vận hành theo tiêu chuẩn ISO 15189:2022.

2.2. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại Trung tâm Giải phẫu bệnh - Sinh học phân tử, Bệnh viện Phổi Trung ương từ tháng 8 năm 2025 đến tháng 4 năm 2026.

2.3. Đối tượng nghiên cứu

Tổng cộng 441 mẫu bệnh phẩm được thống kê kết quả xét nghiệm bằng kỹ thuật Digital PCR trong thời gian nghiên cứu, bao gồm: 380 mẫu mô FFPE và 61 mẫu huyết tương.

Tiêu chuẩn lựa chọn

- Mẫu bệnh phẩm được chỉ định xét nghiệm Digital PCR, đáp ứng tiêu chuẩn:

- Mẫu FFPE có tỷ lệ tế bào u $\geq 10\%$.
- Mẫu huyết tương được thu thập, bảo quản và xử lý theo đúng quy định tiền phân tích.

Tiêu chuẩn loại trừ

- Mẫu bệnh phẩm không đủ số lượng hoặc không đạt tiêu chuẩn chất lượng theo yêu cầu của bộ kit hoặc hệ thống xét nghiệm.

2.4. Các chỉ tiêu nghiên cứu

- Mô tả quy trình triển khai kỹ thuật Digital PCR tại Bệnh viện Phổi Trung ương.

- Đánh giá kết quả kiểm soát chất lượng, phê duyệt phương pháp, so sánh liên phòng.

- Xác định tỷ lệ phát hiện đột biến gen trên mẫu mô FFPE và mẫu huyết tương.

- Ghi nhận và phân tích các sự cố kỹ thuật phát sinh trong quá trình vận hành.

- Tổng kết kinh nghiệm thực tiễn trong quản lý chất lượng và xử lý sự cố của kỹ thuật dPCR.

2.5. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu này đã được Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học của Bệnh viện Phổi Trung ương thông qua theo quyết định số: 42126/CN-HĐĐĐ-BVPTƯ ngày 11/06/2026.

2.6. Hệ thống máy sử dụng

- D30 Automatic Digital PCR System.

- Nhà sản xuất: Targeting One (Trung Quốc).

- Nguyên lý vận hành:

30 μ L hỗn hợp phản ứng dPCR được chuẩn bị cho mỗi mẫu, bao gồm: 7,5 μ L hỗn hợp PCR, 7,5 μ L hỗn hợp mồi/đầu dò và 15 μ L mẫu DNA. Hỗn hợp phản ứng được thêm vào giếng mẫu của chip vi lưu giọt tích hợp và được bịt kín bằng 50 μ L dầu bao phủ.

Chu trình tạo giọt (Droplet Generation) kéo dài 15 phút phân tách mẫu thành 30.000 - 50.000 vi giọt. Các giọt được PCR với chu trình nhiệt: 95°C trong 30 giây → 40 chu kỳ 94°C trong 10 giây → 57°C trong 30 giây. Cuối cùng, các vi giọt được đẩy nổi lên từ ống phản ứng đến kênh vi mô của chip, tạo thành một hàng giọt và lần lượt đi qua vùng phát hiện để đo cường độ huỳnh quang. Bằng cách áp dụng ngưỡng biên độ huỳnh quang tại điểm cao nhất của cụm giọt âm tính, có thể phân biệt các giọt dương tính chứa sản phẩm khuếch đại với các giọt âm tính. Để phân tích, các phản ứng với hơn 30.000 giọt mỗi giếng, sử dụng thống kê Poisson, số lượng bản sao ban đầu chính xác của các phân tử mục tiêu được tính toán và trình bày dưới dạng bản sao/phản ứng PCR, sau đó được tính toán để phản ánh số bản sao trên mỗi millilit mẫu [4].

2.7. Đặc điểm bộ kit phát hiện các đột biến của ung thư phổi

Tại Bệnh viện Phổi Trung ương, hiện tại đang sử dụng kit phát hiện đột biến:

- Sinh thiết lỏng (ctDNA): *EGFR* (7 biến thể: *Ex19Del*, *L858R*, *T790M*, *L861Q*, *G719X*, *Ex20Ins*, *S768I*).

- Sinh thiết mô (FFPE):

- + *EGFR* (7 biến thể: *Ex19Del*, *L858R*, *T790M*, *L861Q*, *G719X*, *Ex20Ins*, *S768I*).

- + *ALK/ROS1/MET* (*Fusion*).

- + Lung cancer digital PCR panel Plus (*EGFR*, *KRAS*, *NRAS*, *BRAF V600E*, *PIK3CA*, *HER2*, *MET*, *RET*, *ROS1*, *ALK*, *NTRK*).

2.8. Quy trình xét nghiệm (SOP) tại Bệnh viện Phổi Trung ương

2.8.1. Đối với mẫu mô được cố định Formalin và Paraffin (FFPE)

Chúng tôi thực hiện 380 mẫu mô (FFPE) từ tháng 8/2025 - tháng 4/2026 theo các bước như sau:

2.8.1.1. Tách chiết acid Nucleic (DNA, RNA): Sử dụng kit Targeting One Nucleic acid extraction (FFPE TNA)

Yêu cầu: Các mẫu FFPE được bảo quản ở nhiệt độ 22 - 25°C, tránh ánh sáng mặt trời. Thời gian bảo quản không quá 3 năm. Tỷ lệ % tế bào khối u lớn hơn 10%. Cắt 3 - 8 lát mỏng 5 µm.

Quy trình:

- + Bước 1: Tẩy nến: 1 ml Dewaxing Solution → lắc ở mức 1000 rpm trong 3 phút → ly tâm 12000 rpm và loại dịch nổi → thêm 1 ml cồn 100° → lắc ở mức 1000 rpm trong 1 phút → ly tâm 12000 rpm và loại dịch nổi → Làm khô ở 56°C/20 phút.

- + Bước 2: Ly giải: Thêm 200 µl Lysis Buffer và 20 µl protein K, trộn đều → lắc ở mức 1000 rpm ở 56°C trong 30 phút → Ủ 90°C trong 30 phút → Ly tâm

12000 rpm/3 phút, hút hết dịch nổi.

- + Bước 3: Gắn DNA/RNA lên hạt từ: Thêm 470 µl Binding Buffer và 20 µl Magnetic Beads → Lắc nhẹ 500 rpm trong 10 phút → Đặt lên giá từ, loại bỏ dịch nổi.

- + Bước 4: Làm sạch: Lần lượt làm sạch hạt từ bằng 500 µl Washing Buffer 1 và 2 lần 500 µl Washing Buffer2, sau đó để lên giá từ, loại bỏ dịch nổi và mở nắp ống để khô từ 5 - 10 phút.

- + Bước 5: Tách DNA, RNA khỏi hạt từ: Thêm 100 µl Elution Buffer → Lắc 1000 rpm/5 phút và ly tâm nhanh, nhẹ → Đặt lên giá từ và thu thập dịch nổi (Dung dịch chứa DNA, RNA).

2.8.1.2. Mix hỗn hợp phản ứng và chạy máy

- + Đo nồng độ DNA và RNA bằng máy quang phổ kế NanoDrop.

- + Pha loãng DNA về nồng độ 2 - 10 ng/µl, RNA về nồng độ 20 - 30 ng/µl.

- + Mix mẫu:

- Kit *EGFR* mutation detection: 32 µl mẫu + 16 µl PCR A, mix đều hỗn hợp → Nhỏ 24 µl vào mỗi chip (2 chip).

- Kit ARM (*ALK/ROS1/MET*): 32 µl mẫu + 16 µl RTmix (ARM), mix đều hỗn hợp → Nhỏ 24 µl vào mỗi chip (2 chip), ủ 55°C/15 phút.

- Kit Lung cancer Panel Plus:

- DNA: 80 µl mẫu + 40 µl PCR A, mix đều hỗn hợp → Nhỏ 24µl vào mỗi chip tương ứng (5 chip).

- RNA: 50 µl mẫu + 25 µl PCR B, mix đều hỗn hợp → Nhỏ 24 µl vào mỗi chip tương ứng (3 chip).

- Ủ chip ở 55°C/15 phút.

Nhỏ 30 µl hỗn hợp phản ứng trong các chip vào giếng, bao phủ bề mặt giếng bằng 50µl dầu. Nạp vào máy D30 Digital PCR và chọn chương trình tương ứng.

2.8.2. Đối với mẫu huyết tương

Chúng tôi thực hiện 61 mẫu máu tĩnh mạch (chống đông K2EDTA) từ tháng 8/2025 - 4/2026 theo các bước như sau:

2.8.2.1. Tách chiết ctDNA: Sử dụng kit Targeting One Nucleic acid extraction (cfDNA)

Yêu cầu: 10 ml máu tĩnh mạch ngoại vi, thu thập trong ống K2EDTA. Được tách huyết tương trong vòng 4h, bảo quản ở nhiệt độ -70°C, rã đông 30 phút ở nhiệt độ phòng trước khi sử dụng.

Quy trình:

- 1. Ly giải và gắn DNA lên hạt từ: Thêm 2 ml huyết tương + 1 ml Lysis Buffer + 40 µl Protein K + 1800 µl Binding Buffer + 30 µl Magnetic beads vào ống 15 ml, lắc 100 rpm trong 20 phút → Đặt lên giá từ và loại bỏ dịch trong.

- 2. Làm sạch: Rửa hạt từ bằng 2 lần 500 µl Washing

Buffer I và 2 lần 1000 µl cồn 80° → Đặt lên giá từ, loại bỏ dịch trong → mở nắp và để khô trong khoảng 5 - 10 phút.

3. Tách DNA, RNA khỏi hạt từ: Thêm 35 µl Elution Buffer → Lắc 1000 rpm/5 phút và ly tâm nhanh, nhẹ → Đặt lên giá từ và thu thập dịch nổi (Dung dịch chứa ctDNA).

2.8.2.2. Mix hỗn hợp phản ứng và chạy máy

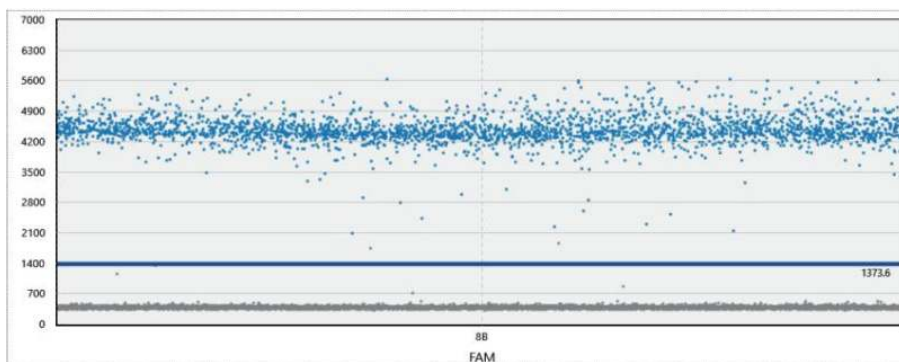
- Ủ dung dịch ctDNA ở 95°C/5 phút.
- Làm lạnh nhanh trong khay đá trong 2 phút.
- Trộn 32 µl mẫu + 16 µl PCR A → Nhỏ 24µl vào mỗi chip (2 chip) → Nhỏ 30µl hỗn hợp từ chip vào giếng phản ứng, phủ 50µl dầu → Chạy máy.

2.8.3. Phân tích kết quả

- Các chất nhuộm huỳnh quang trong mỗi giọt, bao gồm: FAM, VIC, ROX, CY5 và Q705 được đo cường độ phát sáng khi lần lượt đi qua vùng phân tích bằng hệ thống cảm biến quang học đa kênh. Dựa trên cường độ tín hiệu huỳnh quang nhiều cao nhất của mẫu chứng âm, một ngưỡng (threshold) được áp dụng để phân loại các giọt dương tính và âm tính trên mỗi kênh màu.

- Phần mềm phân tích tự động dùng thống kê Poisson để tính toán số lượng DNA đích dựa trên số kết quả phân tích số vi giọt:

- $[Target\ DNA] = -\ln\left(1 - \frac{N_p}{N_t}\right)$. Trong đó: N_p : Số giọt dương tính, N_t : tổng số giọt.



Ảnh 1. Biểu đồ 1D, cường độ huỳnh quang được phân loại âm tính và dương tính trên kênh màu FAM

Dựa trên kết quả cường độ huỳnh quang và °Chùm của vi giọt, phần mềm phân tích nhận diện các giọt âm, dương tính, từ đó tính toán tỷ lệ % alen đột biến VAF%.

Kết luận dương tính hay âm tính với đột biến đích được đưa ra khi đối chiếu với ngưỡng cut off của nhà sản xuất.

Bảng 1. Ngưỡng cut off các đột biến DNA trong bộ kit Lung cancer dPCR panel plus (11 gen)

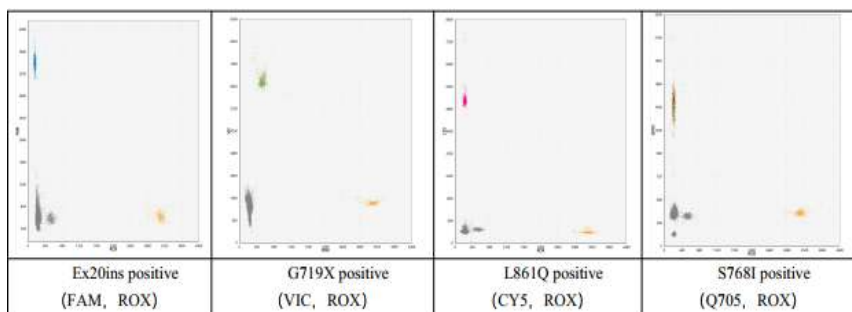
Gen	Tổng số bản sao	Số giọt dương tính (Mu)	Tỷ lệ đột biến $\frac{Mu}{(Mu+WT)}$	Kết quả
EGFR/KRAS/NRAS/	/	≥ 5	$\geq 0,3\%$ (and)	Dương tính
BRAF/	≥ 1000	< 5	$< 0,3\%$ (or)	Âm tính
HER-2/PIK3CA	< 1000	< 5	$< 0,3\%$ (or)	Không hợp lệ

2.9. Quản lý chất lượng xét nghiệm

- Tất cả các xét nghiệm được thực hiện trong hệ thống quản lý chất lượng của Trung tâm Giải phẫu bệnh - Sinh học phân tử theo tiêu chuẩn ISO 15189:2022.

- Mỗi lần chạy xét nghiệm đều được thực hiện đồng thời với mẫu chứng âm và mẫu chứng dương của bộ kit. Kết quả chỉ được chấp nhận khi:

- Kết quả của mẫu chỉ được chấp nhận khi chứng dương và chứng âm đạt yêu cầu [5]:



Ảnh 2. Biểu đồ 2D của mẫu chứng dương *EGFR* (Positive Control)

- Tổng số vi giọt tạo được phải trên 30.000 giọt. Trong đó tỷ lệ các giọt dương tính với gen Wildtype (WT) hay IC (Internal Control) phải trên mức tối thiểu quy định của bộ kit [6].

- Tại Trung tâm Giải phẫu bệnh - Sinh học phân tử - Bệnh viện Phổi Trung ương, xét nghiệm Digital PCR đã được thực hiện “Phê duyệt phương pháp” trên mẫu mô FFPE bằng cách so sánh kết quả với xét nghiệm Đột biến 9 gen trong Ung thư phổi (Kit của AmoyDX: Pan Lung Cancer PCR Panel) và trên mẫu máu tĩnh mạch bằng so sánh với xét nghiệm đột biến gen *EGFR* (Roche: kit *EGFR* Mutation test v2). Các xét nghiệm được Trung tâm đưa ra làm tham chiếu đều chuẩn IVD và đã đạt công nhận tiêu chuẩn ISO 15189:2022.

- Xét nghiệm dPCR đã được thực hiện so sánh liên

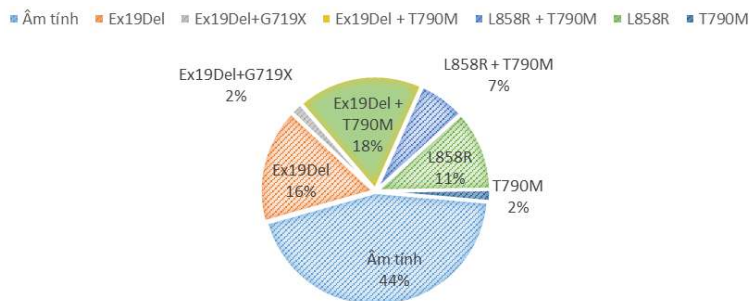
phòng với kỹ thuật Giải trình tự gen Sanger tại Trung tâm Nghiên cứu gen và Protein - Đại học Y Hà Nội nhằm đánh giá độ tương đồng kết quả.

3. KẾT QUẢ

3.1. Tỷ lệ đột biến gen khi thực hiện xét nghiệm Digital PCR tại Bệnh viện Phổi Trung ương

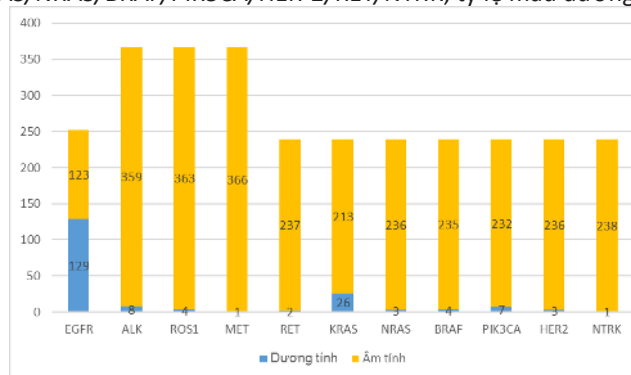
Từ tháng 8/2025 - tháng 4/2026, Trung tâm đã triển khai thực hiện xét nghiệm Digital PCR cho mẫu mô (FFPE) và mẫu sinh thiết lỏng (máu tĩnh mạch):

- Sinh thiết lỏng (đột biến gen *EGFR*): Tổng cộng 61 mẫu, tỷ lệ dương tính 56%. Trong đó tỷ lệ có mang đột biến gen kháng thuốc T790M chiếm khoảng 26%. Hầu hết các mẫu được phát hiện ở tần số alen thấp (< 5%).



Biểu đồ 1. Tỷ lệ đột biến gen *EGFR* trên mẫu huyết tương khi thực hiện kỹ thuật Digital PCR

- Mẫu mô (FFPE): Tổng cộng 380 mẫu đã được thực hiện trên 03 panel: Đơn gen *EGFR*, *ALK/ROS1/MET* và *EGFR/ALK/ROS1/MET/KRAS/NRAS/BRAF/PIK3CA/HER-2/RET/NTRK*, tỷ lệ mẫu dương tính khoảng 29%.



Biểu đồ 2. Tỷ lệ đột biến gen trên mẫu sinh thiết FFPE khi thực hiện kỹ thuật dPCR

3.2. Kết quả phê duyệt phương pháp và so sánh liên phòng

Qua thực hiện phê duyệt phương pháp xét nghiệm Digital PCR trên 10 mẫu mô FFPE và 10 mẫu huyết tương có so sánh với kỹ thuật Giải trình tự gen Sanger và Realtime PCR chúng tôi nhận thấy: Kết quả Digital PCR tương đồng hoàn toàn trong bộ mẫu đánh giá, chưa ghi nhận trường hợp âm tính giả hoặc dương tính giả.

BỆNH VIỆN PHỔI TRUNG ƯƠNG TRUNG TÂM GIẢI PHẪU BỆNH – SINH HỌC PHÂN TỬ

PHIẾU TỔNG HỢP KẾT QUẢ PHÊ DUYỆT PHƯƠNG PHÁP

1. Thông tin chung:

Tên quy trình: Quy trình kỹ thuật xét nghiệm các gen gây ung thư phổi (xét nghiệm phát hiện các đột biến EGFR, ALK, ROS1, MET, KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA, HER-2, RET, NTRK bằng phương pháp PCR kỹ thuật số trên mẫu mô FFPE)

Mã quy trình: GPBSHPT-QTKT69

Loại mẫu: Sinh thiết nhỏ tại phổi/ Khối tế bào dịch màng phổi/ Bệnh phẩm phẫu thuật phổi đã được chẩn đoán là ung thư biểu mô không tế bào nhỏ của phổi, được xét nghiệm tìm đột biến EGFR/ALK/ROS1/RET/KRAS/NRAS/HER2/BRAF/PIK3CA ở mẫu mô ung thư phổi trên hệ thống máy ABCYCLERQ (Hãng AIT Biotech)

Bộ phận thực hiện: Phòng Sinh học phân tử - Trung tâm Giải phẫu bệnh - SHPT – BV Phổi trung ương

Vật liệu sử dụng: Các hóa chất xét nghiệm phát hiện các đột biến EGFR/ALK/ROS1/RET/KRAS/NRAS/HER2/BRAF/PIK3CA ở mẫu mô ung thư phổi trên hệ thống máy ABCYCLERQ (Hãng AIT Biotech)

Người thực hiện: CN Phạm Thị Thu Phương, Ths Nguyễn Văn Duy, KTY Phan Thị Liên

Người đọc kết quả: PGS TS BSCKII Lê Trung Thọ, BSCKII Dương Minh Phương, Ths Bs Trần Thị Tuấn Anh

Ngày thực hiện: Tháng 3 năm 2026

2. Kết quả thực hiện

TT	Thông số đánh giá	Kết quả	Tiêu chuẩn	Nguồn gốc tiêu chuẩn	Đánh giá	Ghi chú
1.	Độ chính xác	100 %	> 90 %	Hệ thống máy ABCYCLERQ (Hãng AIT Biotech)	Đạt	
2.	Độ nhạy	100 %	> 95 %		Đạt	
3.	Độ đặc hiệu	100 %	> 90 %		Đạt	
4.	Tỉ lệ dương tính giả	00	< 10 %		Đạt	
5.	Tỉ lệ âm tính giả	00	< 5 %		Đạt	

3. Phê duyệt

- Đồng ý phê duyệt ☒

- Không đồng ý phê duyệt ☐

Yêu cầu bổ sung: Kết hợp nhiều kit PCR đạt chuẩn IVD làm tiêu chuẩn vàng. Thường xuyên đánh giá mô chứng (Nội kiểm) và đạt yêu cầu các kĩ thuật về Ngoại kiểm.

Người lập

Phụ trách Trung tâm


Ngày: 7 / 4 / 2026


PGS.TS.BS Lê Trung Thọ
Ngày: 7 / 4 / 2026

GPBSHPT-BM23.05

Lần ban hành: 02.24

Ngày ban hành: 08/07/2024

Trang: 1/1

CS Được quét bằng CamScanner

PHIẾU TỔNG HỢP KẾT QUẢ PHÊ DUYỆT PHƯƠNG PHÁP

1. Thông tin chung:

Tên quy trình: Quy trình kỹ thuật xét nghiệm đột biến gen EGFR bằng phương pháp PCR kỹ thuật số trên mẫu huyết tương

Loại mẫu: Mẫu huyết tương của bệnh nhân đã được chẩn đoán là ung thư biểu mô không tế bào nhỏ của phổi, và đã có xét nghiệm gen trên mẫu huyết tương tìm đột biến EGFR bằng phương pháp PCR - Realtime trên hệ thống máy Cobas Z480 (Roche) tại Trung tâm.

Vật liệu sử dụng: Các hóa chất trong quy trình xét nghiệm đột biến gen EGFR bằng phương pháp PCR kỹ thuật số trên mẫu huyết tương

Người đọc kết quả: PGS TS BSKII Lê Trung Thọ, BSKII Dương Minh Phương, Ths Bs Trần Thị Tuấn Anh

Ngày thực hiện: Tháng 4 năm 2026

Mã quy trình:

GPBSHPT-QTKT67

Bộ phận thực hiện:

Phòng Sinh học phân tử -
Trung tâm Giải phẫu bệnh
- SHPT – BV Phổi rung
ương

Người thực hiện: CN

Phạm Thị Thu Phương,

Ths Nguyễn Văn Duy,

KTY Phan Thị Liên

2. Kết quả thực hiện

TT	Thông số đánh giá	Kết quả	Tiêu chuẩn	Nguồn gốc tiêu chuẩn	Đánh giá	Ghi chú
1.	Độ chính xác	100 %	> 90 %	PCR Real Time trên hệ thống Cobas Z480 (Roche) sử dụng KIT đạt IVD	Đạt	
2.	Độ nhạy	100 %	> 95 %		Đạt	
3.	Độ đặc hiệu	100 %	> 90 %		Đạt	
4.	Tỉ lệ dương tính giả	00	< 10 %		Đạt	
5.	Tỉ lệ âm tính giả	00	< 5 %		Đạt	

3. Phê duyệt

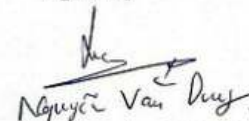
- Đồng ý phê duyệt ☒

- Không đồng ý phê duyệt ☐

Yêu cầu bổ sung: Kết hợp nhiều kit PCR đạt chuẩn IVD làm tiêu chuẩn vàng. Thường xuyên đánh giá mô chứng (Nội kiểm) và đạt yêu cầu các kĩ thuật về Ngoại kiểm.

Người lập

Phụ trách trung tâm

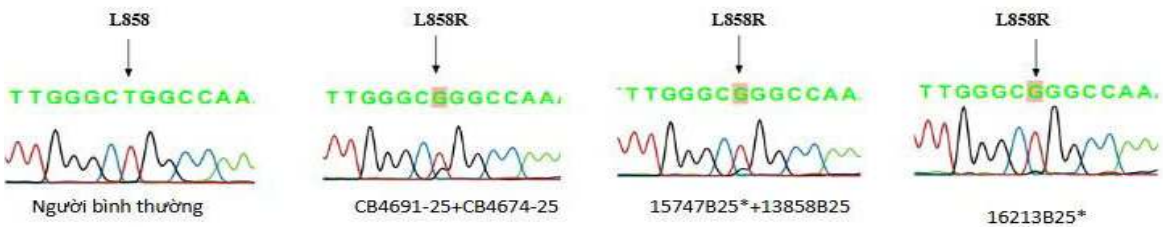

Ngày: ...7.../...4.../...2026...


PGS.TS.BS Lê Trung Thọ
Ngày: ...7.../...4.../...2026...

Ảnh 3. Tổng hợp kết quả Phê duyệt phương pháp cho kỹ thuật dPCR trên mẫu FFPE và huyết tương

Bảng 2. Kết quả so sánh liên phòng với Trung tâm Nghiên cứu gen và Protein – Đại học Y Hà Nội

STT	Mã số	Nồng độ µg/ml	Kết quả Digital PCR (Targeting One)	Kết quả GTTG Sanger
1	CB4691-25+CB4674-25	140	<i>EGFR L858R</i> (VAF: 34,04%)	<i>EGFR L858R</i>
2	17229 B25 *	214	<i>BRAF V600E</i> (VAF: 8,64%)	<i>BRAF V600E</i>
3	15747 B25 * +13858 B25	115	<i>EGFR L858R</i> (VAF: 22,02%)	<i>EGFR L858R</i>
4	16213 B25 *	56	<i>EGFR L858R</i> (VAF: 13,98%)	<i>EGFR L858R</i>
5	19723 B25	8,5	<i>KRAS: KRAS G12C</i> (VAF 8,89%), <i>KRAS G12D</i> (VAF 0,42%)	<i>KRAS G12C & KRAS G12D</i>
6	3880 B26 *	264	Âm tính	Âm tính
7	24984 B25	7,3	Âm tính	Âm tính
8	22746 B25	440	Âm tính	Âm tính
9	22012 B25 *	386	Âm tính	Âm tính
10	16121 B25+16300 B25	40	Âm tính	Âm tính



Ảnh 4. Kết quả Giải trình tự gen Sanger các mẫu dương tính *EGFR L858R*

3.3. Tổng hợp lỗi trong quá trình vận hành dPCR từ tháng 8/2025 – tháng 4/2026

Trong thực tế vận hành xét nghiệm Digital PCR theo tiêu chuẩn ISO 15189:2022, các sự cố xuất hiện với tần suất 12/441 xét nghiệm. Các sự cố gặp phải như sau:

Bảng 3. Thống kê các sự cố gặp trong thời gian thực hiện xét nghiệm Digital PCR

Sự cố	Số lượng	Nguyên nhân	Khắc phục
Đứt gãy DNA/RNA	5	Mẫu cố định không tốt hoặc còn chất ức chế	Thực hiện xét nghiệm thay thế/ Lấy lại mẫu
Nồng độ DNA/RNA cao	2	Giới hạn của phương pháp đo quang với một số mẫu khó	Pha loãng mẫu, thực hiện lại xét nghiệm
Không thể tạo vi giọt	5	Khi nhỏ mẫu tạo nhiều bọt khí, độ nhớt mẫu cao hoặc nhiệt độ, độ ẩm không phù hợp	Kiểm tra về thao tác, điều kiện môi trường. Pha loãng mẫu nếu độ nhớt cao

4. BÀN LUẬN

4.1. Tỷ lệ đột biến gen khi thực hiện xét nghiệm dPCR tại Bệnh viện Phổi Trung ương

Tỷ lệ đột biến gen *EGFR* tại Trung tâm Giải phẫu bệnh - Sinh học phân tử - Bệnh viện Phổi Trung ương trong thời gian từ tháng 8/2025 - tháng 4/2026 của kỹ thuật Digital PCR trên mẫu máu và mẫu mô lần lượt là: 56% và 52%. Trong khi tỷ lệ trên khi thực hiện Realtime PCR trong cùng khoảng thời gian là 43% và 39%. Ý nghĩa quan trọng của xét nghiệm Digital PCR là khả năng phát hiện các trường hợp có tỷ lệ alen đột biến thấp, cứu vãn cơ hội điều trị cho các

người bệnh có thể bị chẩn đoán “âm tính giả” nếu sử dụng kỹ thuật Realtime PCR. Ngoài ra việc phát hiện sớm đột biến kháng thuốc (T790M) trong máu người bệnh ung thư phổi sau thời gian điều trị bằng thuốc điều trị đích cũng đem lại nhiều lợi ích cho việc theo dõi động học và đáp ứng điều trị thuốc, giúp tối ưu hóa điều trị cá thể hóa.

4.2. Quy trình vận hành kỹ thuật Digital PCR tại Bệnh viện Phổi Trung ương

Quy trình vận hành và quản lý chất lượng xét nghiệm được xây dựng theo tiêu chuẩn ISO 15189:2022. Quy trình kỹ thuật và các yếu tố tiền

phân tích đều được xây dựng hướng dẫn chi tiết cụ thể, đánh giá những yếu tố rủi ro và các biện pháp khắc phục phòng ngừa.

Các hoạt động phê duyệt phương pháp, nội kiểm, ngoại kiểm (với Đại học Y Hà Nội) được thực hiện đúng theo quy định và có kết quả đạt yêu cầu.

4.3. Kinh nghiệm khắc phục các lỗi thường gặp của kỹ thuật Digital PCR

4.3.1. Nguyên nhân

- Sự cố về mẫu bệnh phẩm (7 trường hợp)

- Hiện tượng đứt gãy DNA/RNA ở các mẫu mô FFPE cố định không tốt hoặc sự hiện diện của các chất ức chế trong mẫu (Formalin, Hemoglobin, Ethanol) thường xuyên gây hiện tượng nhiễu trên biểu đồ huỳnh quang (khoảng 30% mẫu có hiện tượng nhiễu, 5 mẫu cần thực hiện lại xét nghiệm). Để đánh giá đầu là giọt dương tính thật sự và loại bỏ vùng nhiễu cần kinh nghiệm của kỹ thuật viên và sự am hiểu về các quy trình tiền phân tích tại Trung tâm.

- Nồng độ DNA/RNA đầu vào quá cao (2 trường hợp): Dù với mỗi mẫu đều được thực hiện đo 2 lần và tính giá trị trung bình, sau đó pha loãng để đưa về nồng độ về mức phù hợp. Tuy nhiên, đôi khi do sự đa dạng về tính chất của mẫu và giới hạn của phương pháp thực hiện (NanoDrop), nồng độ của mẫu khi nạp vào quá cao gây hiện tượng “bão giọt dương tính” khiến thuật toán Poisson không thể phân tích kết quả.

- Sự cố kỹ thuật

- Lỗi tạo giọt (5 trường hợp): Không tạo giọt hoặc tạo giọt không đồng nhất do độ nhớt của mẫu cao, có bọt khí khi nhỏ mẫu vào giếng phản ứng.

Với cơ chế phân tách vi giọt phản ứng, Digital PCR ít bị ảnh hưởng bởi các chất ức chế phản ứng PCR hơn so với Realtime PCR, tuy nhiên xét nghiệm này lại bị ảnh hưởng nhiều bởi độ nhớt, tính chất vật lý của mẫu và điều kiện tiền nghi môi trường (ảnh hưởng khả năng tạo giọt). Các lỗi này đòi hỏi cần chuẩn hóa các quy trình tiền phân tích, đồng thời áp dụng tốt các tiêu chuẩn chất lượng Phòng xét nghiệm theo ISO 15189:2022.

4.3.2. Các biện pháp ngăn ngừa lỗi

4.3.2.1. Chống nhiễm chéo

- Xét nghiệm Digital PCR là xét nghiệm có độ nhạy cao, phát hiện các đột biến ở tỷ lệ rất thấp (VAF < 0,1%). Chính vì vậy việc đảm bảo phòng tránh lây nhiễm từ môi trường và lấy nhiễm giữa các mẫu càng đóng vai trò quan trọng, các lây nhiễm dù rất nhỏ (ví dụ từ vi giọt trong không khí... cũng có thể dẫn đến sai lệch kết quả [7, 8]. Một số biện pháp đã được thực hiện tại Bệnh viện Phổi Trung ương để phòng tránh nhiễm chéo:

- Thiết kế phòng xét nghiệm 1 chiều: Phân chia

ng nghiêm ngặt các khu vực: (1) Chuẩn bị hóa chất → (2) Tách chiết/Nạp mẫu → (3) Chạy máy dPCR/Đọc kết quả. Các khu vực được phân tách bằng vách kính cường lực, có hệ thống đèn khử nhiễm và điều hòa riêng biệt.

- Vệ sinh bề mặt: Khử nhiễm cho bề mặt bàn, dụng cụ (dung dịch DNase, RNase...), lau sàn (Javen 4%), chiếu tia UV trong tủ PCR và các vùng khó lau chùi. Các biện pháp trên đều được thực hiện hàng ngày sau khi thực hiện xét nghiệm. Các chip phản ứng sau khi xét nghiệm được bọc kín trong màng bọc nilong, chiếu tia UV và bỏ thùng rác.

- Sử dụng vật tư tiêu hao chuẩn: Đầu tips có lọc (filter tips), ống eppendorf chống bám dính và đạt chuẩn DNA-free, RNase-free.

4.3.2.2. Phòng ngừa lỗi thao tác và vận hành máy

Một trong những ưu việt nhưng cũng là yếu tố dễ bị tác động của kỹ thuật đó là quá trình tạo vi giọt. Các lỗi từ bản thân mẫu, kỹ thuật viên thao tác và môi trường rất dễ gây lỗi cho quá trình này:

- Thao tác Pipetting: Cần rất chú ý trong việc sử dụng Pipet để hút, nhả và mix mẫu, tránh tạo bọt khí – nguyên nhân chính gây ra các lỗi của việc tạo giọt [9].

- Nhiệt độ: Duy trì ở khoảng 20 - 24°C. Nhiệt độ quá cao ảnh hưởng tới độ nhớt của dầu tạo giọt [10].

- Độ ẩm: Duy trì ở khoảng 40 - 60%. Độ ẩm thấp dễ sinh tĩnh điện, khiến vi giọt dính vào thành gây giảm số lượng giọt. Trong khi độ ẩm cao gây ngưng tụ hơi nước, dễ gây sai sót trong bộ phận quang học của máy đọc, làm nhiễu tín hiệu, gây hiện tượng “Rain”.

- Độ rung động của máy: Sự rung động gây xáo trộn quá trình hình thành vi giọt trong kênh vi lưu. Máy D30 Digital PCR có trọng lượng khoảng 50kg, vị trí đặt cần là bàn xét nghiệm chuyên dụng, chịu được trọng tải lớn, không để gần các thiết bị như máy ly tâm công suất lớn, máy lắc, vortex...

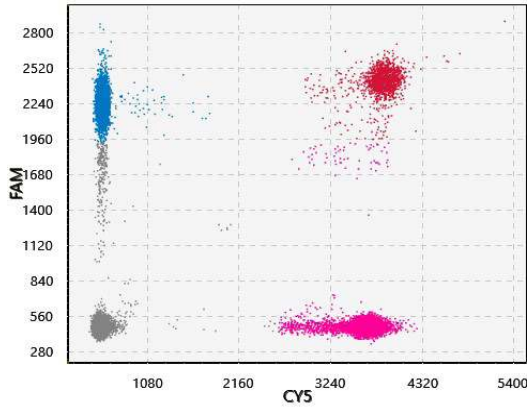
- Bản chất mẫu: Những mẫu sinh thiết, Cellblock, huyết tương mà bản thân mẫu có chất nhầy hoặc độ nhớt cao có thể gây ảnh hưởng đến quá trình tạo giọt. Cần tìm hiểu và loại trừ nguyên nhân đến từ bản chất của mẫu bằng các cách như: khử chất nhầy trong mẫu mô FFPE hoặc lấy máu tĩnh mạch trước ăn (tránh huyết tương đục).

4.3.3. Kinh nghiệm khi xử lý các mẫu “khó”

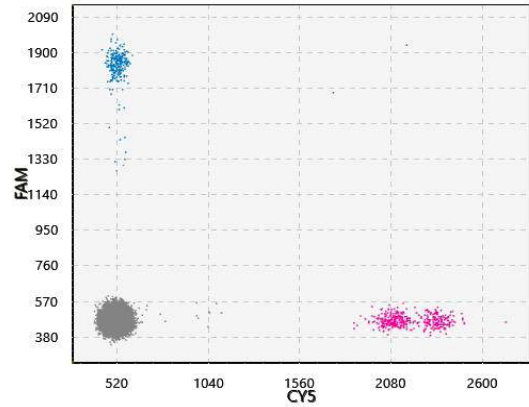
- Trong hệ thống Digital PCR, sự thành công của xét nghiệm không những phụ thuộc vào hiệu suất phản ứng PCR mà còn phụ thuộc tính đồng đều và toàn vẹn vật lý của các vi giọt được bao phủ bởi dầu. Trong thực tế, các mẫu mô FFPE hoặc sinh thiết lỏng đôi khi chứa nhiều yếu tố ức chế, gây ra thách thức kép với xét nghiệm [11].

- Mẫu mô FFPE: Mẫu mô phẫu thuật thường chứa Formalin, xylene, protein K tồn dư sau quá trình tách chiết không chỉ ức chế enzyme Taq polymerase (phản ứng PCR) mà còn làm thay đổi sức căng bề mặt

tại các kênh vi lưu, gây ảnh hưởng quá trình tạo giọt. Các mẫu được cố định quá lâu trong Formalin khiến DNA bị đứt gãy và gây ra hiện tượng nhiễu (Rain) trên biểu đồ.



Ảnh 5a. Mẫu dương tính với nhiều giọt nhiễu

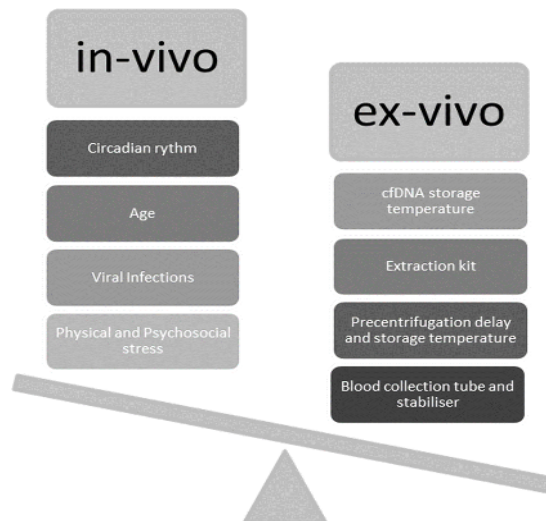


Ảnh 5b. Mẫu dương tính với giọt có °Chạm cao

- Mẫu dịch màng phổi có thể chứa một lượng lớn tế bào trung biểu mô, tế bào viêm, mảnh vụn tế bào, mucin và lipid. Các tạp chất này bị cô đặc sau ly tâm, vì vậy mẫu Cellblock dịch màng phổi sau tách chiết thường chứa một lượng tạp chất lipid hoặc protein gây ảnh hưởng đến độ nhớt của dung dịch và quá trình tạo giọt. Trên thực tế cho thấy các mẫu bị lỗi ở quá trình tạo vi giọt chiếm tỷ lệ rất lớn bởi các mẫu Cellblock. Để tránh tình trạng này, cần theo dõi nồng độ và độ tinh sạch của mẫu qua tỷ số A260/A230 (giá trị chuẩn 2 - 2,2) và A260/A280 (giá trị chuẩn 1,8 - 2), nếu mẫu bị đánh giá là nhiễm nhiều tạp chất có thể

sử dụng cách pha loãng với nước cất (DEPC) về nồng độ thấp hơn (khoảng 5 ng/μl).

- Mẫu sinh thiết lỏng: ctDNA trong máu thường rất thấp, do đó bất kỳ sự hiện diện nào của chất ức chế cũng có thể làm giảm hiệu suất khuếch đại, dẫn đến âm tính giả. Các thành phần như Hemoglobin, Heparin và IgG là những chất ức chế phản ứng PCR, vì vậy cần kiểm soát chặt chẽ giai đoạn tiền phân tích: Thời gian lấy mẫu, tình trạng nhiễm trùng, tình trạng vận động, ống chống đông, tốc độ ly tâm, thời gian tách huyết tương sau nhận mẫu,...[12].



Ảnh 6. Tóm tắt các yếu tố tiền phân tích quan trọng đối với mẫu cfDNA [12]

- ❖ Tránh tình trạng vỡ hồng cầu
- ❖ Lấy mẫu giữa ngày, xa bữa ăn
- ❖ Tránh tình trạng nhiễm trùng, bạch cầu tăng
- ❖ Ưu tiên sử dụng huyết tương so với huyết thanh
- ❖ EDTA là chất chống đông được khuyến cáo sử dụng hơn so với Citrate hoặc Heparin vì EDTA ức chế Dnase nội sinh

- ❖ Máu nên được tách huyết tương trong vòng 3-6h sau khi lấy máu nên để ở nhiệt độ phòng. Nên bảo quản ở 4 °C, có thể kéo dài 8-24h tùy kit tách chiết.

- ❖ Các ống lấy máu được bổ sung chất ổn định Streck, CellSave, Roche, Norgen Biotek hoặc PAXgene ccfDNA có thể bảo quản mẫu đến 7 ngày ở nhiệt độ phòng

- ❖ Tốc độ ly tâm 16000 g, tránh hút phải tế bào máu

Biospecimen Science of Blood for cfDNA Genetic Analyses, F Betsou. 2019

5. KẾT LUẬN

Với khả năng phát hiện đột biến ở mức siêu nhạy (VAF < 0,1%), kỹ thuật Digital PCR giúp tăng khả năng phát hiện đột biến gen ở các mẫu khó như mảnh sinh thiết nhỏ, sinh thiết lỏng.

Việc triển khai xét nghiệm theo tiêu chuẩn ISO 15189:2022 tại Bệnh viện Phổi Trung ương cho kết quả ổn định, phù hợp với các phương pháp so sánh tham chiếu.

Các sự cố kỹ thuật chủ yếu liên quan đến chất lượng DNA/RNA và quá trình tạo vi giọt, có thể được kiểm soát hiệu quả thông qua chuẩn hóa quy trình tiền phân tích và quản lý chất lượng xét nghiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660.
2. Bouchard N. Lung cancer: targeted therapy in 2025. *Curr Oncol*. 2025;32(3):146. doi:10.3390/currenol32030146.
3. Leatham B, McNall K, Subramanian HKK, Jacky L, Alvarado J, Yurk D et al. A rapid, multiplex digital PCR assay to detect gene variants and fusions in non-small cell lung cancer. *Mol Oncol*. 2023 Oct 4;17(11):2221–2234. doi: 10.1002/1878-0261.13523.
4. D30 Automatic Digital PCR System - User Manual, TargetingOne Technology (Beijing) Corporation. Beijing, 31/05/2024.
5. Karlin-Neumann G, Bizouarn F. (eds.), 2018. *Methods in Molecular Biology*, vol. 1768. Humana Press, Springer Verlag, Heidelberg. ISBN: 978-1-4939-7776-5.
6. International Organization for Standardization. *Medical laboratories - Requirements for quality and competence (ISO Standard No. 15189:2022)*. 4th ed.

Geneva: ISO; 2022.

7. Huggett JF, Foy CA, Benes V, Emslie K, Garson JA, Haynes R et al. The digital MIQE guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments. *Clin Chem* 2013 Jun;59(6):892-902. doi: 10.1373/clinchem.2013.206375. Epub 2013 Apr 9.

8. Whale AS, Huggett JF, Tzonev S. Fundamentals of multiplexing with digital PCR. *Biomolecular Detection and Quantification*. 2016 May 27;10:15-23. doi: 10.1016/j.bdq.2016.05.002.

9. Shek RCM, Li PSN, Leung SCM, Chu HT, Hioe F, Tang VWL et al. A Novel Digital PCR Assay for Accurate Detection and Differentiation of Focal and Non-Focal Subtypes of Mesenchymal-Epithelial Transition (MET) Gene Amplification in Lung Cancer. *Cancers (Basel)* 2025 Feb 26;17(5):811. doi: 10.3390/cancers17050811.

10. Quan PL, Sauzade M, Brouzes E. dPCR: A Technology Review. *Sensors* 2018, 18(4), 1271; <https://doi.org/10.3390/s18041271>.

11. Dube S, Qin J, Ramakrishnan R. Mathematical analysis of copy number variation in a DNA sample using digital PCR on a nanofluidic device. *PLoS One*. 2008;3:e2876. doi:10.1371/journal.pone.0002876.

12. Ammerlaan W, Betsou F. Biospecimen science of blood for cfDNA genetic analyses. *Curr Pathobiol Rep*. 2019;7:9-15. doi: 10.1007/s40139-019-00193-7.